

**Минеральные элементы и токсиканты**

УДК 636.085.12:636.087.72

doi: 10.15389/agrobiology.2023.6.1122rus

**БАКТЕРИАЛЬНАЯ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ  
МАРГАНЕЦ- И КОБАЛЬТСОДЕРЖАЩИХ УЛЬТРАДИСПЕРСНЫХ  
ЧАСТИЦ ( $Mn_2O_3$  и  $Co_3O_4$ ) В РУБЦОВОЙ ЖИДКОСТИ\***Д.Е. ШОШИН<sup>1, 2</sup> ✉, Е.А. СИЗОВА<sup>1, 2</sup>, А.М. КАМИРОВА<sup>1</sup>

Наряду с основными нутриентами (белками, жирами и углеводами) важное значение в кормлении сельскохозяйственных животных, включая крупный рогатый скот и птицу, имеют минеральные элементы (Д.В. Машнин с соавт., 2022; Т.М. Окоелова с соавт., 2018). Они включаются в состав премиксов в неорганическом или органическом виде (М.Ю. Мишанин с соавт., 2021; О.С. Кошаева, 2018). Однако более перспективны наноконпозиции, свойства которых могут быть смоделированы посредством изменения формы, путей синтеза и размера ультрадисперсных частиц (УДЧ) (S. Miroshnikov с соавт., 2019). Вместе с тем использование УДЧ имеет ряд ограничений, связанных с их потенциальной токсичностью (Е. Rusakova с соавт., 2015). Также известно, что симбионтная микрофлора формирует многокомпонентную суспензию органических веществ, промежуточных и конечных метаболитов микробиома, способных взаимодействовать с УДЧ (Б.С. Нуржанов с соавт., 2019). В настоящей работе впервые установлена динамика люминесценции бактериального тест-объекта при внесении в питательную среду комплекса УДЧ и рубцовой жидкости. Показано, что эта комбинация нивелирует токсичность наноструктур. Целью нашей работы была оценка свойств ультрадисперсных частиц на примере различных концентраций окиси марганца и кобальта в биохимической среде руминального сообщества на основе метода ингибирования бактериальной люминесценции. Исследование проводили на базе центра «Нанотехнологии в сельском хозяйстве» ФГБУ ФНИЦ БСТ РАН (г. Оренбург) в 2022 году. Химически чистые для анализа (99 %) УДЧ окиси марганца  $Mn_2O_3$  и кобальта  $Co_3O_4$  в количестве 157,8 и 240,7 мг диспергировали ультразвуком частотой 35 кГц в 1 мл дистиллированной воды в течение 30 мин при 25 °С. Отбор рубцовой жидкости (РЖ) проводили через хроническую фистулу рубца ( $d = 80$  мм, «ANKOM Technology Corporation», США) спустя 3 ч после кормления у быка породы казахская белоголовая, основной рацион которого включал 30 % концентратов и 70 % грубых кормов без добавления УДЧ. Использовали люминесцентный бактериальный тест «Эколюм» («НВО ИММУ-НОТЕХ», Россия), представленный лиофилизированной культурой микроорганизмов *Escherichia coli*, несущих гибридную плазмиду pUC19 с клонированными *luxCDABE* генами *P. leioagnathi* 54D10. В биолюминесцентном планшете проводили серию двукратных разбавлений суспензии УДЧ и РЖ, начиная со следующих значений: 50 мкл  $Mn_2O_3$  (1 моль/л) + 50 мкл РЖ; 50 мкл  $Co_3O_4$  (1 моль/л) + 50 мкл РЖ; 50 мкл  $Mn_2O_3$  (1 моль/л) + 50 мкл дистиллированной воды; 50 мкл  $Co_3O_4$  (1 моль/л) + 50 мкл дистиллированной воды; 100 мкл РЖ; 100 мкл дистиллированной воды (контроль). Затем в каждую ячейку добавляли по 100 мкл тест-системы «Эколюм», получая итоговые концентрации УДЧ от 0,25 до 0,00025 моль/л и разведения РЖ от 1:2 до 1:2048 в чистом опыте и от 1:4 до 1:4096 в опыте с УДЧ. Токсичность исследуемых образцов определяли на многофункциональном микропланшетном ридере TECAN Infinite F200 («Tecan Austria GmbH», Австрия), фиксируя значение люминесценции бактериального штамма *E. coli* K12 TG1 в среде с разным содержанием ультрадисперсных частиц и рубцовой жидкости в течение 3 ч с периодом 5 мин. На основе полученных данных строили графики, отражающие динамику ингибирования биолюминесценции, и вычисляли индекс токсичности (Т). Также рассчитывали относительное значение биолюминесценции (А). Установлено, что УДЧ в чистом виде вызывают дозозависимое ингибирование бактериальной люминесценции, подавляя свыше 50 % свечения ( $EC_{50}$ ) даже при разведении в 2048 раз (0,00025 моль/л). Значения индекса токсичности, при вычислении которого контроль принимается за 100 %, наглядно свидетельствуют о снижении ядовитых свойств суспензий с уменьшением в них доли УДЧ. Для  $Mn_2O_3$  эта величина составляла от 89,76 % при концентрации 0,25 моль/л до 38,57 % при 0,00025 моль/л на 1-й мин эксперимента и от 95,16 до 52,85 % в конце 3-го ч; для  $Co_3O_4$  — соответственно 99,44 и 32,80 % на 1-й мин, 99,43 и 54,72 % в конце 3-го ч. Аналогичные показатели в опыте с рубцовой жидкостью проявлялись лишь на первых минутах экспозиции, после чего светимость значительно возрастала, достигая 769,10 % к контролю при 64-кратном разведении. При комбинации рубцовой жидкости с УДЧ наблюдалась регрессия ядовитых свойств последних, хотя максимальные показатели светимости в комплексе с  $Mn_2O_3$  составляли лишь 43,28 % от аналогичных для нативной РЖ, в сочетании с  $Co_3O_4$  — 36,44 %. Наблюдаемые изменения люминесценции были разделены на три типа: контрольный (свечение меняется пропорционально фазам роста бактериальной культуры; без добавок); глубокий (подавление люминесценции на протяжении всего периода экспозиции; с добавлением УДЧ); конкурентный (рост свечения от начала к концу опыта; с добавлением РЖ или комплекса РЖ + УДЧ). Таким

\* Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФ, проект № 22-26-00254.

образом, сочетание рубцовой жидкости с частицами окислов металлов приводит к ингибции их токсичности по отношению к тест-объекту.

**Ключевые слова:** ультрадисперсные частицы, бактериальные клетки, биолюминесценция, оксид марганца, оксид кобальта, рубцовая жидкость.

Наряду с основными нутриентами — белками, жирами и углеводами важное значение в кормлении сельскохозяйственных животных, включая крупный рогатый скот и птицу, имеют минеральные элементы (1, 2). Они входят в состав аксессуарных веществ (дыхательных пигментов, витаминов, гормонов, ферментов и коферментов) и влияют на разнообразные физиологические реакции, что отражается на процессах роста и развития (3, 4). Оптимальное поступление микроэлементов с кормом — один из факторов, опосредующих высокую продуктивность животных (5, 6). В связи с этим актуальна разработка премиксов с минеральными компонентами в различной форме.

Традиционно в составе премиксов используются неорганические и органические соединения (7, 8), однако более перспективны хелаты и наноформы эссенциальных элементов (9-11). Свойства последних могут быть смоделированы посредством изменения формы, путей синтеза и размера частиц (12). Этот более дешевый и высокорентабельный способ обогащения кормов микроэлементами (13, 14) имеет некоторые ограничения. При использовании ультрадисперсных частиц (УДЧ) следует учитывать риски потенциальной токсичности (15). Так, стабильные оксиды металлов абсолютно инертны, а металлические УДЧ с окислительно-восстановительным потенциалом могут быть гено- и цитотоксичными (16) ввиду высокой биодоступности, возможности синергетического эффекта с другими загрязнителями (17) и широкой вариабельности свойств в зависимости от природы, размера, концентрации,  $\zeta$ -потенциала, формы и реакционной среды.

Последнее особенно актуально для жвачных животных, у которых руминальное содержимое, по сути, представляет собой целостную экосистему со множеством связей (18). Симбионтная микрофлора также нуждается в макро- и микроэлементах для поддержания нормального метаболизма и формирует многокомпонентную суспензию органических веществ — промежуточных и конечных метаболитов микробиома, способных взаимодействовать с УДЧ (19). Подобное обстоятельство должно учитываться при определении максимально допустимых доз УДЧ в рационе животных.

В настоящей работе впервые установлена динамика люминесценции бактериального тест-объекта при внесении в питательную среду комплекса УДЧ и рубцовой жидкости. Показано, что эта комбинация нивелирует токсичность наноструктур.

Целью нашей работы была оценка свойств ультрадисперсных частиц на примере различных концентраций окиси марганца и кобальта в биохимической среде руминального сообщества на основе метода ингибирования бактериальной люминесценции.

*Методика.* Исследование проводили на базе центра «Нанотехнологии в сельском хозяйстве» ФГБУ ФНЦ БСТ РАН (г. Оренбург) в 2022 году.

Химически чистые для анализа (99 %) УДЧ окиси марганца  $Mn_2O_3$  и кобальта  $Co_3O_4$  (ИП Хисамутдинов Р.А., Россия) в количестве 157,8 и 240,7 мг (весы лабораторные ВЛА-225М, класс точности I, допускаемая погрешность  $\pm 0,5$  мг, «Госметр», Россия) диспергировали ультразвуком с частотой 35 кГц в 1 мл дистиллированной воды в течение 30 мин при 25 °С.

Отбор рубцовой жидкости (РЖ) проводили через хроническую fistулу рубца ( $d = 80$  мм, «АНКОМ Technology Corporation», США) спустя 3 ч после кормления у быка породы казахская белоголовая (250 кг, 10 мес),

основной рацион которого включал 30 % концентратов и 70 % грубых кормов без добавления УДЧ. Транспортировку осуществляли в течении 30 мин, поддерживая температурный режим 38,5-39,5 °С. Перед использованием РЖ тщательно встряхивали и процеживали.

Подготовку люминесцентного бактериального теста «Эколюм» («НВО ИММУНОТЕХ», Россия), представленного лиофилизированной культурой микроорганизмов *Escherichia coli*, несущих гибридную плазмиду pUC19 с клонированными *luxCDABE* генами *P. leiognathi* 54D10, осуществляли по методике, предложенной Е.С. Алешиной и соавт. (20). К исходному штамму доливали 10 мл дистиллированной воды, охлажденной до 4 °С, и выдерживали суспензию 30 мин при той же температуре.

В биолюминесцентном планшете проводили серию двукратных разбавлений суспензии УДЧ и РЖ, начиная со следующих значений: строка А — 50 мкл  $Mn_2O_3$  (1 моль/л) + 50 мкл РЖ; строка В — 50 мкл  $Co_3O_4$  (1 моль/л) + 50 мкл РЖ; строка С — 50 мкл  $Mn_2O_3$  (1 моль/л) + 50 мкл дистиллированной воды; строка D — 50 мкл  $Co_3O_4$  (1 моль/л) + 50 мкл дистиллированной воды; строка E — 100 мкл РЖ; строка F — 100 мкл дистиллированной воды (контроль). Затем в каждую ячейку добавляли по 100 мкл тест-системы «Эколюм», получая итоговые концентрации УДЧ от 0,25 до 0,00025 моль/л и разведения РЖ от 1:2 до 1:2048 в чистом опыте и от 1:4 до 1:4096 в опыте с УДЧ.

Токсичность исследуемых образцов определяли на многофункциональном микропланшетном ридере TECAN Infinite F200 («Tecan Austria GmbH», Австрия), фиксируя значение люминесценции бактериального штамма *E. coli* K12 TG1 («Эколюм») в среде с разным содержанием ультрадисперсных частиц и рубцовой жидкости в течение 3 ч с периодом 5 мин.

На основе полученных данных строили графики, отражающие динамику ингибирования биолюминесценции, и вычисляли индекс токсичности (Т), по формуле:

$$T = (I_k - I_o) / I_k \times 100 \%,$$

где  $I_k$  — светимость контрольной пробы,  $I_o$  — светимость опытной пробы.

Этот показатель позволяет судить о том, насколько сильно проявляется негативное воздействие исследуемого фактора. Однако, если последний имеет позитивную составляющую и интенсифицирует свечение, рациональнее рассчитать относительное значение биолюминесценции (А), чтобы избежать отрицательных величин:

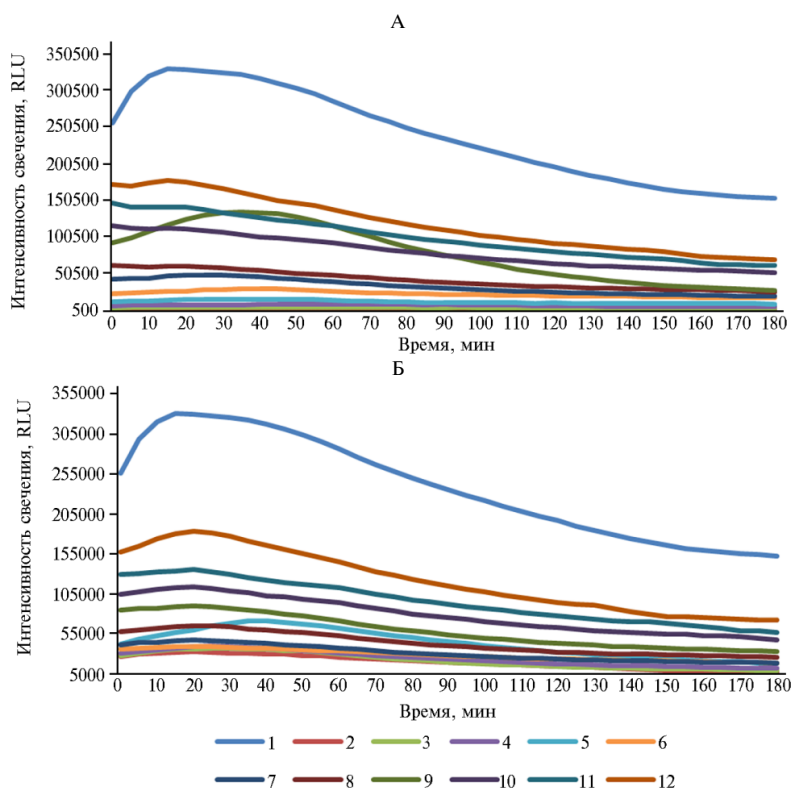
$$A = I_k / I_o \times 100 \%.$$

В сущности, это величина, обратная индексу токсичности, отражает различие в интенсивности свечения контрольной и опытной проб.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного пакета Statistica 12 («Stat Soft Inc.», США) и Microsoft Excel («Microsoft», США). Достоверность различий между абсолютными значениями люминесценции определяли по *t*-критерию Стьюдента с требуемым уровнем значимости  $p \leq 0,01$ . В таблицах указаны относительные значения, соответствующие представленному порогу.

**Результаты.** Марганец и кобальт, наряду с другими переходными металлами (Fe, Ni, Cu, Zn), относятся к необходимым микроэлементам и участвуют в ряде биохимических превращений у бактерий (21, 22), растений (23-25), простейших (26, 27) беспозвоночных (28, 29) и позвоночных (30, 31) животных. В частности, марганец отвечает за метаболизм макроэлементов, формирование костей, системы защиты от свободных радикалов, клиренс аммиака и синтез нейротрансмиттеров в мозге. Он служит кофактором для ферментов, которые расщепляют активные формы кислорода, в основ-

ном для Mn-супероксиддисмутазы (SOD) и Mn-кофакторированных каталаз и пероксидазы (32, 33). Кроме того, Mn заменяет железо в некоторых Fe-моноклеарных ферментах у *E. coli* при окислительном стрессе, защищая их от окислительного повреждения, опосредованного реакцией Фентона, и сохраняя при этом каталитическую активность (34, 35). Для поддержания оптимальной концентрации ионов металла бактерии пользуются импортерами и экспортерами (36, 37).



**Рис. 1.** Динамика биолюминесценции штамма *Escherichia coli* K12TG1 в суспензии ультрадисперсных частиц (УДЧ)  $\text{Co}_3\text{O}_4$  (А) и  $\text{Mn}_2\text{O}_3$  (Б) при разной концентрации: 1 — 0 моль/л (контроль), 2 — 0,25 моль/л, 3 — 0,125 моль/л, 4 — 0,063 моль/л, 5 — 0,031 моль/л, 6 — 0,016 моль/л, 7 — 0,008 моль/л, 8 — 0,004 моль/л, 9 — 0,002 моль/л, 10 — 0,001 моль/л, 11 — 0,0005 моль/л, 12 — 0,00025 моль/л.

Mn — критический компонент в десятках белков и ферментов, он содержится во всех тканях, особенно в богатых митохондриями и меланином. В нормальных условиях максимальные концентрации Mn наблюдаются в печени и поджелудочной железе (38). При его избытке или недостатке в рационе чаще всего возникают нейродегенеративные нарушения (39-41).

Кобальт используется бактериями для синтеза тетрапиррольного кольца, известного как коррин, витамина  $\text{B}_{12}$  ( $\text{C}_{63}\text{H}_{88}\text{O}_{14}\text{N}_{14}\text{PCo}$ ) (42, 21), химическая структура и свойства которого подробно описаны D. Osman с соавт. (43). Кобальт участвует в процессах фиксации азота у растений, служит кофактором аденозилкобаламин-зависимых изомераз, этаноламин-аммиак-лиазы, метилкобаламин-зависимой метилтрансферазы и рибонуклеотидредуктазы, а также ряда металлопротеинов у животных, бактерий и дрожжей (24). У человека Co входит в состав этилмалонил-КоА-мутазы (МСМ) и метионинсинтазы, недостаток которых ведет к метилмалоновой ацидурии и мегалобластной анемии (44), дефектам нервной трубки, инсульту

и деменции, затормаживанию интеллектуального развития у детей (45). При избытке Со проявляет генотоксичные и канцерогенные свойства (46).

Биолюминесценция проб с различным содержанием УДЧ окиси марганца и кобальта без добавления РЖ была обратно пропорциональна их концентрации (рис. 1). В начале эксперимента светимость контрольного образца за счет интенсивного расходования питательного субстрата увеличивалась на 22,5 % за 15 мин, после чего постепенно снижалась до 59,6 % от исходного значения. В самом большом разбавлении 0,00025 моль/л светимость бактериального штамма в суспензии  $Mn_2O_3$  и  $Co_3O_4$  на первой секунде составляла соответственно 61,4 и 67,2 % от аналогичного показателя контрольной пробы, а при 0,25 моль/л — всего 10,2 и 0,5 %.

**1. Индекс токсичности (Т, %) суспензии ультрадисперсных частиц (УДЧ)  $Co_3O_4$  при разной концентрации УДЧ в зависимости от времени контакта с клетками люминесцирующего штамма *Escherichia coli* K12TG1 в дистиллированной воде**

Время, мин	Концентрация УДЧ, моль $\times 10^{-3}$											
	250	125	63	31	16	8	4	2	1	0,5	0,25	
0	99,4/А	99,0/А	97,8/А	95,6/А	91,5/А	83,5/А	76,1/А	64,0/Б	54,8/Б	43,0/В	32,8/В	
30	99,7/А	99,0/А	97,8/А	95,5/А	91,3/А	85,3/А	82,3/А	59,1/Б	67,2/Б	58,9/Б	49,0/В	
60	99,7/А	99,0/А	97,3/А	95,3/А	91,0/А	86,5/А	83,5/А	59,8/Б	67,9/Б	59,7/Б	51,8/Б	
90	99,7/А	98,8/А	96,9/А	95,6/А	90,8/А	87,4/А	84,0/А	68,0/Б	68,2/Б	60,1/Б	53,4/Б	
120	99,6/А	98,6/А	97,1/А	95,2/А	90,3/А	87,4/А	83,7/А	75,1/А	67,5/Б	59,6/Б	53,6/Б	
150	99,5/А	98,5/А	97,2/А	94,6/А	89,1/А	87,0/А	83,1/А	79,5/А	65,8/Б	57,6/Б	51,9/Б	
180	98,4/А	98,4/А	97,3/А	94,6/А	89,3/А	87,8/А	83,8/А	82,7/А	66,7/Б	60,2/Б	54,7/Б	

Примечание. А — ЕС70, Б — ЕС50, В — ЕС20, то есть концентрации УДЧ, вызывающие свыше 75, 50 и 20 % тушения биосенсора по сравнению с контролем.

Значения индекса Т, при вычислении которых контроль принимался за 100 %, наглядно свидетельствовали о снижении токсичных свойств суспензии с уменьшением в ней доли УДЧ. Для  $Mn_2O_3$  индекс Т составлял от 89,76 % при концентрации 0,25 моль/л до 38,57 % при 0,00025 моль/л на 1-й мин эксперимента и от 95,16 до 52,85 % в конце 3-го ч (табл. 1). Для  $Co_3O_4$  индекс Т был равен соответственно 99,44 и 32,80 % на 1-й мин, 99,43 и 54,72 % в конце 3-го ч (табл. 2).

**2. Индекс токсичности (Т, %) суспензии ультрадисперсных частиц (УДЧ)  $Mn_2O_3$  при разной концентрации УДЧ в зависимости от времени контакта с клетками люминесцирующего штамма *Escherichia coli* K12TG1 в дистиллированной воде**

Время, мин	Концентрация УДЧ, моль $\times 10^{-3}$											
	250	125	63	31	16	8	4	2	1	0,5	0,25	
0	89,8/А	89,0/А	87,9/А	83,7/А	85,9/А	83,8/А	77,3/А	66,7/Б	59,0/Б	49,3/Б	38,6/В	
30	90,4/А	88,7/А	88,0/А	79,0/А	88,3/А	86,1/А	80,5/А	73,3/Б	66,4/Б	60,2/Б	45,5/Б	
60	91,0/А	89,6/А	89,1/А	78,5/А	88,2/А	86,9/А	81,7/А	75,0/Б	67,1/Б	60,7/Б	49,4/Б	
90	91,7/А	91,6/А	90,1/А	80,9/А	88,3/А	87,7/А	83,1/А	77,0/А	68,1/Б	61,0/Б	51,0/Б	
120	92,5/А	92,7/А	91,0/А	83,7/А	88,1/А	88,0/А	83,6/А	78,0/А	68,1/Б	60,7/Б	52,2/Б	
150	94,3/А	93,4/А	91,3/А	86,0/А	87,4/А	87,4/А	82,6/А	77,5/А	66,8/Б	59,0/Б	53,6/Б	
180	95,2/А	94,0/А	92,1/А	88,3/А	87,8/А	87,9/А	83,4/А	78,5/А	68,8/Б	62,5/Б	52,9/Б	

Примечание. А — ЕС70, Б — ЕС50, В — ЕС20, то есть концентрации УДЧ, вызывающие свыше 75, 50 и 20 % тушения биосенсора по сравнению с контролем.

В опыте с рубцовой жидкостью без контаминации УДЧ относительное значение биолюминесценции колебалось от 25,29 до 769,10 % с тенденцией к росту. Так, первая проба с внесением нативного руминального содержимого в течение первых 30 мин описывалась критериями ЕС70 и ЕС30, то есть ингибированием соответственно 70 и 30 % свечения люминесцирующего штамма. Однако, начиная со 2-го ч, образец не мог оцениваться как токсичный, более того, его показатели к концу опыта превышали контрольные в 3,5 раза (рис. 2). Во втором разведении (1:4) интенсивность биолюминесценции на первой секунде соответствовала показателю ЕС 50, после чего возрастала в 6,8 раза (или в 5,27 раза относительно контроля). В целом, светимость проб была обратно-пропорциональна концентрации рубцовой

жидкости до разведений 1:32-1:64 включительно, после чего тенденция менялась. При этом в пределах одной концентрации значения биолюминесценции росли в течение 3 ч до 128-го разведения, далее (1:256-1:2048) в первые 30 мин регистрировался рост с последующим падением свечения ниже исходных показателей. Общая динамика демонстрировала резкое увеличение светимости в первые 20-30 мин с последующим замедлением (разбавления в 4-128 раз) или медленным снижением уровня биолюминесценции (разбавления в 256-2048 раз) (табл. 3).

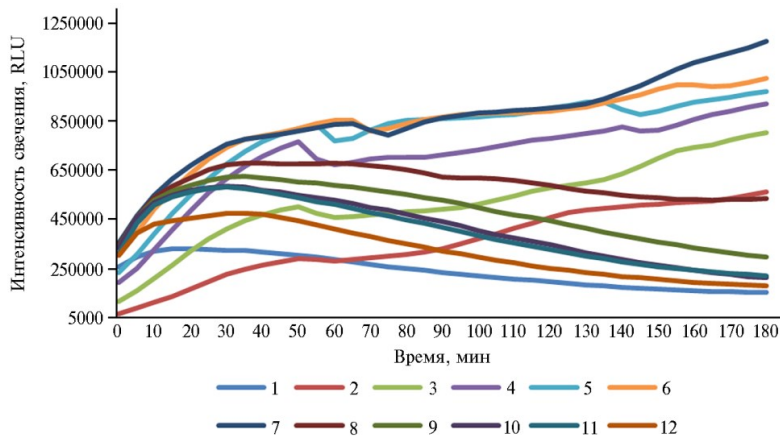


Рис. 2. Динамика биолюминесценции штамма *Escherichia coli* K12TG1 в рубцовой жидкости быка породы казахская белоголовая при разном разведении: 1 — контроль (дистиллированная вода), 2 — в 2 раза, 3 — в 4 раза, 4 — в 8 раз, 5 — в 16 раз, 6 — в 32 раза, 7 — в 64 раза, 8 — в 128 раз, 9 — в 256 раз, 10 — в 512 раз, 11 — в 1024 раза, 12 — в 2048 раз.

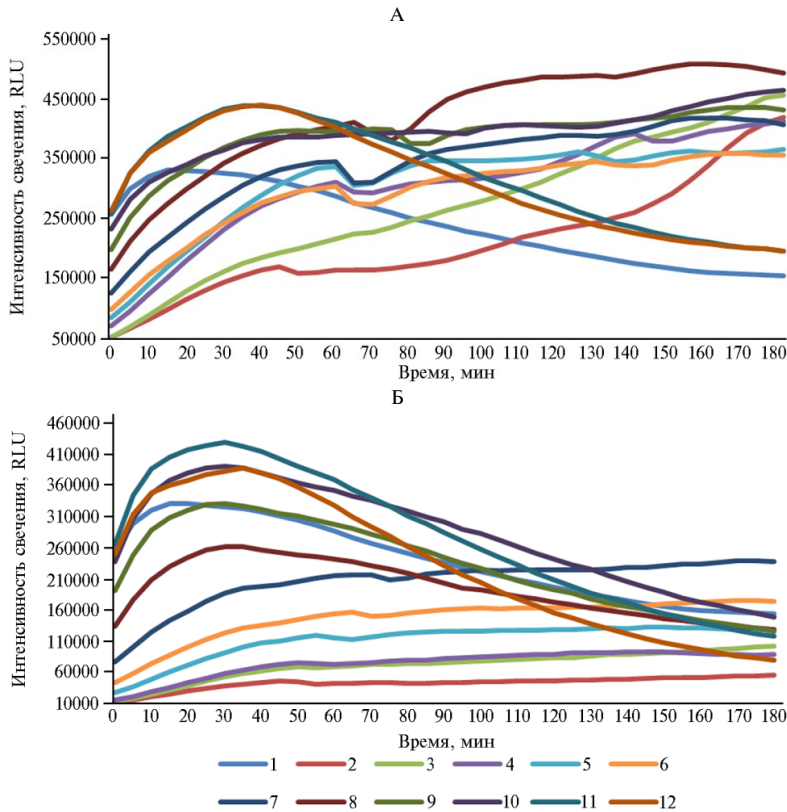
### 3. Относительные значения биолюминесценции (А, %) проб с разным содержанием рубцовой жидкости (РЖ) быка породы казахская белоголовая в зависимости от времени контакта с клетками люминесцирующего штамма *Escherichia coli* K12TG1

Время, мин	Разведение РЖ, кратность										
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
0	25,2/А	45,9/Б	75,19/В	91,3/Г	118,4/Д	138,1/Д	134,4/Д	132,0/Д	130,7/Д	121,1/Д	118,7/Д
30	69,6/В	126,9/Д	189,3/Д	207,7/Д	228,4/Д	232,2/Д	207,3/Д	191,3/Д	179,9/Д	178,6/Д	145,8/Д
60	98,5/Г	160,7/Д	235,2/Д	269,6/Д	298,6/Д	292,2/Д	237,0/Д	206,4/Д	184,3/Д	178,4/Д	144,3/Д
90	140,6/Д	208,6/Д	303,3/Д	366,0/Д	369,0/Д	366,7/Д	264,6/Д	224,4/Д	187,4/Д	177,9/Д	136,9/Д
120	233,4/Д	294,9/Д	397,5/Д	459,8/Д	453,8/Д	459,8/Д	300,4/Д	226,0/Д	176,7/Д	167,5/Д	128,2/Д
150	309,6/Д	423,41/Д	491,7/Д	538,0/Д	592,6/Д	622,1/Д	324,9/Д	216,6/Д	160,1/Д	156,4/Д	124,6/Д
180	368,7/Д	526,73/Д	603,2/Д	636,7/Д	670,1/Д	769,1/Д	349,8/Д	193,7/Д	139,0/Д	144,2/Д	117,2/Д

Примечание. А — ЕС70, Б — ЕС50, В — ЕС20, Г — NTOX, Д — NTOX+, то есть концентрации УДЧ, вызывающие свыше 75, 50 и 20 % тушения биосенсора по сравнению с контролем, нетоксичные и интенсифицирующие свечение концентрации.

При комбинации рубцовой жидкости с ультрадисперсными частицами окиси марганца и кобальта наблюдалась регрессия токсичных свойств последних, вследствие чего графическое отображение динамики биолюминесценции приближалось к аналогичному для рубцовой жидкости (рис. 3), хотя максимальные показатели светимости в комплексе с  $Mn_2O_3$  составляли лишь 43,28 % от аналогичных для нативной РЖ, в сочетании с  $Co_3O_4$  — 36,44 %. В первом случае образцы с концентрацией УДЧ 0,00025 и 0,0005 моль/л повторяли изменения в контроле, но превышали его по уровню свечения, все остальные пробы изначально уступали по биолюминесценции суспензии без УДЧ, но обгоняли ее в различные интервалы времени, превышая к концу эксперимента в 2,32-3,22 раза. Во втором случае динамику в контроле повторяли, но не превышали значения

пробы с концентрациями УДЧ 0,004 и 0,002 моль/л. Напротив, разведения 0,001-0,0002 моль/л, имея ту же динамику, превышали контрольные значения, 0,25-0,031 моль/л — не достигали их, а 0,016 и 0,008 моль/л — превышали всего в 1,14-1,55 раза.



**Рис. 3.** Динамика биолюминесценции штамма *Escherichia coli* K12TG1 в рубцовой жидкости быка породы казахская белоголовая при различном разведении и разных концентрациях УДЧ Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (А) и Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (Б): 1 — 0 моль/л (дистиллированная вода) (контроль), 2 — 0,25 моль/л (разведение в 2 раза), 3 — 0,125 моль/л (в 4 раза), 4 — 0,063 моль/л (в 8 раз), 5 — 0,031 моль/л (в 16 раз), 6 — 0,016 моль/л (в 32 раза), 7 — 0,008 моль/л (в 64 раза), 8 — 0,004 моль/л (в 128 раз), 9 — 0,002 моль/л (в 256 раз), 10 — 0,001 моль/л (в 512 раз), 11 — 0,0005 моль/л (в 1024 раза), 12 — 0,00025 моль/л (в 2048 раз).

**4. Относительные значения биолюминесценции (А, %) проб с разными разведениями рубцовой жидкости (РЖ) быка породы казахская белоголовая и разной концентрацией ультрадисперсных частиц (УДЧ) Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub> в зависимости от времени контакта с клетками люминесцирующего штамма *Escherichia coli* K12TG1**

Время, мин	Концентрация УДЧ, моль/л × 10 <sup>-3</sup> (разведение РЖ, кратность)										
	250 (1:2)	125 (1:4)	63 (1:8)	31 (1:16)	16 (1:32)	8 (1:64)	4 (1:128)	2 (1:256)	1 (1:512)	0,5 (1:1024)	0,25 (1:2048)
0	19,6/А	19,6/А	27,1/А	32,1/Б	37,6/Б	48,4/Б	64,3/В	77,1/В	90,2/Г	99,9/Г	102,4/Г
30	43,6/Б	49,4/Б	70,6/В	74,9/В	74,0/В	87,7/Г	105,1/Г	113,1/Г	112,0/Г	132,8/Д	132,0/Д
60	56,8/В	75,2/В	108,3/Г	117,4/Г	106,0/Г	120,5/Д	141,0/Д	138,0/Д	136,0/Д	143,3/Д	140,6/Д
90	76,4/В	111,8/Г	132,7/Д	146,9/Д	135,6/Д	154,9/Д	191,0/Д	165,4/Д	166,7/Д	146,5/Д	137,6/Д
120	117,6/Г	164,6/Д	175,2/Д	181,0/Д	172,2/Д	197,9/Д	247,6/Д	206,6/Д	205,7/Д	138,7/Д	129,8/Д
150	175,5/Д	238,0/Д	228,8/Д	217,7/Д	210,1/Д	249,6/Д	304,7/Д	254,2/Д	259,6/Д	132,6/Д	129,3/Д
180	273,7/Д	298,4/Д	269,5/Д	238,5/Д	232,8/Д	265,8/Д	322,5/Д	281,9/Д	304,0/Д	127,5/Д	127,7/Д

Примечание. А — ЕС70, Б — ЕС50, В — ЕС20, Г — ЕС10, Д — НТОХ, то есть концентрации УДЧ, вызывающие свыше 75, 50 и 20 % тушения биосенсора по сравнению с контролем, нетоксичные и интенсифицирующие свечение концентрации.

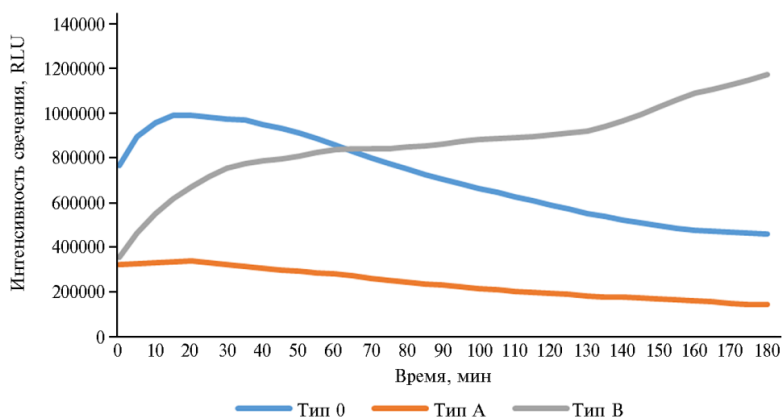
Это свидетельствует о большей токсичности окиси кобальта в сравнении с окисью марганца, что подтвердилось при расчете относительного

значения биолюминесценции (табл. 4, 5). Отсюда же выводятся субтоксичные концентрации УДЧ, то есть такое их количество, которое на протяжении всего опыта не вызывало более 20 % гашения биолюминесценции: для  $Mn_2O_3$  и  $Co_3O_4$  эта величина составляла 0,001 моль/л в 1024-кратном разбавлении рубцовой жидкости.

**5. Относительные значения биолюминесценции (А, %) проб с разными разведениями рубцовой жидкости (РЖ) быка породы казахская белоголовая и разной концентрацией ультрадисперсных частиц (УДЧ)  $Co_3O_4$  в зависимости от времени контакта с клетками люминесцирующего штамма *Escherichia coli* K12TG1**

Время, мин	Концентрация УДЧ, моль $\times 10^{-3}$ (разведение РЖ, кратность)										
	250 (1:2)	125 (1:4)	63 (1:8)	31 (1:16)	16 (1:32)	8 (1:64)	4 (1:128)	2 (1:256)	1 (1:512)	0,5 (1:1024)	0,25 (1:2048)
0	4,5/А	5,0/А	5,9/А	10,3/А	17,0/А	29,5/Б	51,9/В	74,5/В	92,8/Г	103,7/Г	97,1/Г
30	11,5/А	16,0/А	17,5/А	27,9/Б	37,8/Б	57,2/В	80,5/Г	101,6/Г	120,1/Д	131,7/Д	117,6/Г
60	14,4/А	24,0/Б	25,1/Б	40,2/Б	53,5/В	75,0/В	84,4/Г	103,9/Г	122,8/Д	128,8/Д	114,5/Г
90	18,2/А	32,0/Б	34,3/Б	53,2/В	68,2/В	93,6/Г	86,2/Г	103,8/Г	127,7/Д	120,6/Д	98,0/Г
120	23,5/Б	41,8/Б	44,9/Б	65,2/В	82,9/Г	114,2/Г	87,6/Г	97,7/Г	122,5/Д	105,9/Г	79,0/В
150	30,6/Б	54,9/В	55,5/В	79,5/В	102,3/Г	139,1/Д	88,1/Г	92,8/Г	113,6/Г	93,1/Г	64,6/В
180	35,7/Б	66,0/В	57,3/В	83,4/Г	113,8/Г	155,1/Д	83,7/Г	82,4/Г	97,1/Г	76,6/В	51,5/В

Примечание. А — ЕС70, Б — ЕС50, В — ЕС20, Г — NTOX, Д — NTOX+, то есть концентрации УДЧ, вызывающие свыше 75, 50 и 20 % тушения биосенсора по сравнению с контролем, нетоксичные и интенсифицирующие свечение концентрации.



**Рис. 4. Динамика биолюминесценции клеток штамма *Escherichia coli* K12TG1 при контакте с разными образцами:** тип 0 — контроль (динамика люминесценции соответствует фазам роста культуры бактерий), тип А — глубокий (подавление свечения при внесении ультрадисперсных частиц на протяжении всего опыта), тип В — конкурентный (рост свечения от отрицательных значений к положительным в среде с рубцовой жидкостью быка породы казахская белоголовая или комплексом УДЧ + РЖ на протяжении всего опыта).

Согласно полученным в настоящей работе данным, все динамические процессы можно было разделить на несколько типов (рис. 4).

Тип 0 (контроль) — при отсутствии в среде УДЧ и РЖ светимость *E. coli* K12 TG1 была пропорциональна скорости развития культуры и соответствовала фазам логарифмического роста, отрицательного ускорения, стационарной фазе и фазе отмирания (лаг-фаза и период положительного ускорения проходили во время подготовки проб к анализу).

Тип А (глубокий) — в присутствии УДЧ оксидов марганца и кобальта биолюминесценция препарата снижалась на протяжении всего периода экспозиции, что иллюстрировало глубокое дегенеративное воздействие, степень которого уменьшалась вместе с концентрацией УДЧ в суспензии. В проведенном эксперименте она не достигла допустимых значений ( $T < 20\%$ ) даже при разбавлении в 1024 раза (0,00025 моль/л), что было связано с реакционной способностью и физико-химической динамикой УДЧ



(47), высокая цито- и генотоксичность которых подтверждена в ряде работ. Так, F. Ameen с соавт. (48), используя в качестве объекта исследования почвенную ризофлору, включающую бактерии родов *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Thiobacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* и микоризные грибы, указал на негативные эффекты металлических УДЧ: индукцию апоптоза, структурные повреждения клеточной стенки, ингибирование биологической фиксации азота, процессов нитрификации, ферментов уреазы, N-ацетилглюкозаминидазы, глицин-аминопептидазы, арилсульфатазы, полифенолоксидазы и пероксидазы, что дестабилизирует почвенное сообщество.

Что касается непосредственно марганца и кобальта, то их токсические свойства были оценены на млекопитающих (49, 50), растениях (51-53), рыбах (29), беспозвоночных (54) и протейных, включая реснитчатых рубца (26) и паразитических лейшманий (55). S. Rana с соавт. (56), изучая консорциум водорослей и бактерий, выделили следующие этапы воздействия УДЧ: изменение проницаемости мембран, поверхностная адсорбция, повреждение транспортных белков; проникновение внутрь бактериальной клетки; взаимодействие с клеточными органеллами; генерация активных форм кислорода (АФК); начало дегенеративных изменений. Подобный эффект связан со способностью металлов переменной валентности осуществлять процессы перекисного окисления липидов и образовывать вещества, блокирующие активные центры ферментов (57), включая люциферазу, ответственную за биолюминесценцию (58).

При этом большинство исследователей сходятся во мнении, что причиной токсичности УДЧ становится окислительный стресс, сопровождаемый выработкой АФК, снижением содержания восстановленного глутатиона, повышением перекисного окисления липидов и высвобождением ионов металла, вызывающих коагуляцию белка и агрегацию бактерий. Другим механизмом токсичности может выступать иммобилизация УДЧ на плазмалемме клетки, описанная, в частности, Thabitha P. Dasari с соавт. (59) на примере *E. coli*. При этом в их работе УДЧ располагались по степени токсичности в следующем порядке:  $ZnO < CuO < Co_3O_4 < TiO_2$  в темноте и  $ZnO < CuO < TiO_2 < Co_3O_4$  при освещении.

Тип В (конкурентный) — в пробах с руминальным содержимым без контаминации УДЧ и при их добавлении наблюдалось минимальное излучение в начале опыта с последующим ростом. Такую динамику можно объяснить, исходя из состава рубцового содержимого, главный компонент которого — симбионтная микробиальная масса. Она в основном состоит из бактерий, простейших, грибов, архей и небольшой доли фагов, находящихся в динамическом равновесии (60). По сути, это отдельная экосистема со своими консументами и редуцентами, каждый из которых выполняет определенную роль — разрушение растительных клеточных стенок, сбраживание органических компонентов и утилизацию продуктов обмена.

Бактерии представлены главным образом анаэробными лигноцеллюлозолитическими *Prevotella*, *Butyrivibrio*, *Ruminococcus*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidales* и *Clostridiales* (61), археи — метаногенными *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera* и *Methamassilicoccus* (62), грибы — *Neocalimastix*, *Caecomyces*, *Piromyces*, *Anaeromyces*, *Oorpinomyces* и *Cyllumyces* (63), реснитчатые и жгутиковые простейшие — *Entodinium* и *Epidinium* (64). Различные микроорганизмы секретируют пищеварительные ферменты, такие как целлюлазы, гемицеллюлазы и лигниназы. С их помощью микроорганизмы рубца превращают целлюлозу, гемицеллюлозу и лигнины в моносахариды, которые могут быть дополнительно преобразованы в летучие жирные кислоты,  $CH_4$  и другие продукты (18, 65).

В работе по оценке влияния нормального компонентного состава рубцовой жидкости на свечение биосенсора Е.А. Дроздова с соавт. (57) предположили, что пониженная светимость обусловлена наличием в РЖ свободных ионов водорода, ферментов и аммиака, а также отдельно исследовали эффекты глюкозы, пропионовой, молочной, янтарной, уксусной кислоты и 10 % раствора аммиака, в результате чего были выявлены интенсификация свечения в первом случае, незначительное ее подавление во втором-четвертом и сильное — в двух последних. Это согласуется с представленной далее экологической моделью динамических процессов в рубце.

Низкую светимость биолюминесцентного штамма на первых минутах нашего эксперимента можно объяснить его адаптацией к химическому содержанию рубцовой жидкости и конкуренцией с анаэробными представителями, доля которых на воздухе будет непременно снижаться. При этом замедляются процессы брожения и, как следствие, синтез короткоцепочечных жирных кислот, аммиака и водорода и далее метана. Иными словами, снимается серия негативных факторов, ингибирующих культуру кишечной палочки. При этом в среде остается достаточно много глюкозы, а единственной угрозой для роста и развития *E. coli* K12 TG1 выступают инфузории, изменяется структура нативного сообщества.

Подобные выводы подтверждаются нашими данными (см. рис. 2, табл. 4), следовательно, можно постулировать экологическую модель динамики биолюминесценции в руминальном содержимом (табл. 6).

#### 6. Экологическая модель взаимодействия рубцовой жидкости быка породы казахская белоголовая с биолюминесцентным штаммом *Escherichia coli* K12TG1

Фактор	Этап	Разведение										
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
Negative	S	[шaded]										
	F	[шaded]										
Positive	S	[шaded]										
	F	[шaded]										
BL	S	[шaded]										
	F	[шaded]										
M	S	[шaded]										
	F	[шaded]										
A		↑	↑	↑	↑	↑	↑	con	con	↓	↓	↓
B		3,69	5,27	6,03	6,37	6,70	7,69	3,50	1,94	1,39	1,44	1,17
		8,70	6,84	4,79	4,16	3,38	3,32	1,55	0,88	0,63	0,71	0,59

Примечание. Negative — отрицательные факторы среды (H<sup>+</sup>, ЛЖК, NH<sub>3</sub>, CH<sub>4</sub>, хищные простейшие, конкурентные анаэробы), positive — питательные субстраты (включая глюкозу), BL — интенсивность биолюминесценции, A — отношение светимости опытной пробы к светимости в контрольной в конце эксперимента, B — отношение светимости в конце эксперимента к светимости в начале; S (start) — начало опыта, F (finish) — конец опыта, M (movement) — динамика биолюминесценции; [шaded] — низкое содержание, [шaded] — высокое содержание, [шaded] — промежуточное значение компонента в среде; ↓ — снижение, ↑ — рост, con — поддержание на одном уровне биолюминесценции.

Исходя из этой модели определяется «экологический оптимум» соотношения биолюминесцентный штамм/степень разведения рубцовой жидкости, который соответствует 100 мкл бактериальной суспензии на 100 мкл РЖ в разбавлении 1:64, когда светимость биосенсора растет на протяжении всего эксперимента (критерий B > 1) и превышает контрольные значения (критерий A = Max).

Последний опыт, в котором изучалось взаимодействие УДЧ и РЖ, по сути был усреднением опытов 1 и 2 с динамическими типами А и В. Высвобождаемые ионы металлов связываются жирными кислотами с образованием нетоксичных солей — ацетата, пропионата и др., а также могут ассоциироваться с протеином РЖ с образованием белковой короны (37, 66), использоваться в метаболизме бактерий рубца (67) и инактивироваться грибами (68). В связи с этим изначально низкие при высоких концентрациях УДЧ относительные значения биолюминесценции к концу опыта

превышали контрольные показатели (см. табл. 4, 5). Однако отмечались различия между оксидами марганца и кобальта: в первом случае восстановление и рост светимости происходили значительно быстрее, что может быть связано с химической природой самих элементов (59), степенью их дисперсности или возможностью образования крупных агрегатов (69) и согласуется с данными первого опыта.

Таким образом, ультрадисперсные частицы  $Mn_2O_3$  и  $Co_3O_4$  в чистом виде дозозависимо, а также пропорционально времени экспозиции ингибируют бактериальную люминесценцию штамма *Escherichia coli* K12TG1, подавляя свыше 50 % ( $EC_{50}$ ) свечения при разведении даже в 2048 раз (0,00025 моль/л). Так, индекс токсичности для УДЧ  $Mn_2O_3$  составлял от 89,76 % при концентрации 0,25 моль/л до 38,57 % при 0,00025 моль/л на 1-й мин эксперимента и от 95,16 до 52,85 % в конце 3-го ч; для  $Co_3O_4$  — соответственно 99,44 и 32,80 % на 1-й мин, 99,43 и 54,72 % в конце 3-го ч. Рубцовая жидкость, полученная от быка породы казахская белоголовая, в свою очередь, подавляет свечение лишь на первых минутах взаимодействия, что может быть опосредовано наличием в ней «конкурирующих» анаэробных микроорганизмов, а также постепенно улечивающихся токсичных продуктов обмена веществ (аммиак), после чего выступает как дополнительный питательный субстрат, интенсифицируя люминесценцию более чем в 7 раз при разведении 1:64. Сочетание рубцовой жидкости с частицами окислов металлов приводит к ингибированию их токсичности по отношению к тест-объекту, хотя максимальные значения относительной люминесценции все же уступают таковым для нативной рубцовой жидкости, что говорит о взаимном связывании компонентов среды с УДЧ. На основании полученных результатов можно утверждать, что использование ультрадисперсных частиц как источников микроэлементов в кормлении жвачных животных перспективно и требует дальнейших исследований.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Машнин Д.В., Пилипчук В.К., Авдеюк К.С., Красноголовый В.С. Кормление крупного рогатого скота. Содержание минеральных элементов в кормах, их значение в рационе. *Сб. статей IV Межд. науч.-практ. конф. «Наука и современное образование: актуальные вопросы, достижения и инновации»*. Пенза, 2022: 64-66.
2. Околелова Т.М., Шарипов Р.И., Шарипов Т.Р. *Болезни, возникающие при неправильном кормлении и содержании птицы*. Алматы, 2018.
3. Зубкова А.С., Давыдова М.Н., Мошкина С.В. Организация минерального питания коров и последствия несбалансированного минерального питания. *Мат. 70-й Межд. науч.-практ. конф. «Вклад университетской аграрной науки в инновационное развитие агропромышленного комплекса»*. Рязань, 2019: 60-63.
4. Глушенко Н.Н., Богословская О.А., Байтукалов Т.А., Ольховская И.П. Наночастицы металлов в биоэлектронике. *Микроэлементы в медицине*, 2008, 1-2: 52.
5. Рязанцева К.В., Нечитайло К.С., Сизова Е.А. Нормирование минерального питания цыплят-бройлеров (обзор). *Животноводство и кормопроизводство*, 2021, 1: 119-137 (doi: 10.33284/2658-3135-104-1-119).
6. Лютых О. Большая роль микроэлементов. *Эффективное животноводство*, 2020, 4(161): 95-99.
7. Мишанин М.Ю., Мишанин Ю.Ф., Хворостова Т.В., Мишанин А.Ю. Зависимость молочной продуктивности и показателей обмена веществ при введении в рацион коров микроэлементов. *Материалы Межд. науч.-практ. конф. «Совершенствование технологии консервирования сырья растительного и животного происхождения»*. Краснодар, 2021: 192-196.
8. Кошаева О.С. Роль органических микроэлементов в кормлении животных. *Мат. I Межд. науч.-практ. конф. «Приоритетные векторы развития промышленности и сельского хозяйства»*. Макеевка, 2018: 100-105.
9. Фролов А.Н., Филиппова О.Б. Хелатные соединения микроэлементов в премиксах для телят. *Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки*, 2009, 1: 151-153.

10. Gangadoo S., Stanley D., Hughes R.J., Moore R.J., Chapman J. Nanoparticles in feed: Progress and prospects in poultry research. *Trends in Food Science & Technology*, 2016, 58: 115-126 (doi: 10.1016/j.tifs.2016.10.013).
11. Козинец А., Козинец Т., Азизбекян С. Нанотехнологии в кормлении коров. *Животноводство России*, 2020, 3: 35-38 (doi: 10.25701/ZZR.2019.55.61.020).
12. Miroshnikov S., Sizova E., Yausheva E., Uimin M., Konev A., Minin A., Yermakov A., Nikiyan H. Comparative toxicity of CuZn nanoparticles with different physical and chemical characteristics. *Oriental Journal of Chemistry*, 2019, 3: 973 (doi: 10.13005/ojc/350308)
13. Boltianska N.I., Manita I., Podashevskaya H. Application of nanotechnology in technological processes of animal husbandry in Ukraine. *Engineering of Nature Management*, 2020, 2(16): 33-37 (doi: 10.37700/enm.2020.2(16).33-37).
14. Kumar I., Bhattacharya J. Assessment of the role of silver nanoparticles in reducing poultry mortality, risk and economic benefits. *Applied Nanoscience*, 2019, 9: 1293-1307 (doi: 10.1007/s13204-018-00942-x).
15. Rusakova E., Kosyan D., Sizova E., Miroshnikov S., Sipaylova O. Comparative evaluation of acute toxicity of nanoparticles of zinc, copper and their nanosystems using *Stylonychia mytilus*. *Oriental Journal of Chemistry*, 2015, 31(4): 105 (doi: 10.13005/ojc/31.Special-Issue1.13).
16. Kumar V., Kumari A., Guleria P., Yadav S.K. Evaluating the toxicity of selected types of nanochemicals. In: *Reviews of environmental contamination and toxicology, Vol. 215 /D. Whitacre (ed.)*. Springer, New York, NY, 2012: 39-121 (doi: 10.1007/978-1-4614-1463-6\_2).
17. Turan N.B., Erkan H.S., Engin G.O., Bilgili M.S. Nanoparticles in the aquatic environment: Usage, properties, transformation and toxicity — a review. *Process Safety and Environmental Protection*, 2019, 130: 238-249 (doi: 10.1016/j.psep.2019.08.014).
18. Liang J., Fang W., Wang Q., Zubair M., Zhang G., Ma W., Zhang P. Metagenomic analysis of community, enzymes and metabolic pathways during corn straw fermentation with rumen microorganisms for volatile fatty acid production. *Bioresource Technology*, 2021, 342: 126004 (doi: 10.1016/j.biortech.2021.126004).
19. Нуржанов Б.С., Левяхин Ю.И., Рысаев А.Ф. Изменение качественных показателей рубцовой жидкости при введении жировой добавки совместно с наночастицами. В сб.: *Фундаментальные основы технологического развития сельского хозяйства: материалы российской научно-практической конференции с международным участием*. Оренбург, 2019: 277-280.
20. Алешина Е.С. Каримов И.Ф., Дерябин Д.Г. *Методы биолюминесцентного тестирования: Методические указания к лабораторному практикуму*. Оренбург, 2011.
21. Hawco N.J., McIlvin M.M., Bundy R.M., Tagliabue A., Goepfert T.J., Moran D.M., Valentin-Alvarado L., DiTullio G.R., Saito M.A. Minimal cobalt metabolism in the marine cyanobacterium *Prochlorococcus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020, 117(27): 15740-15747 (doi: 10.1073/pnas.2001393117).
22. Bosma E.F., Rau M.H., van Gijtenbeek L.A., Siedler S. Regulation and distinct physiological roles of manganese in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(6): fuab028 (doi: 10.1093/femsre/fuab028).
23. Roychoudhury A., Chakraborty S. Cobalt and molybdenum: deficiency, toxicity, and nutritional role in plant growth and development. In: *Plant nutrition and food security in the era of climate change /V. Kumar, A.K. Srivastava, P. Suprasanna (eds.)*. Academic Press, 2022: 255-270 (doi: 10.1016/B978-0-12-822916-3.00021-4).
24. Hu X., Wei X., Ling J., Chen J. Cobalt: an essential micronutrient for plant growth. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 768523 (doi: 10.3389/fpls.2021.768523).
25. Alejandro S., Höller S., Meier B., Peiter E. Manganese in plants: from acquisition to subcellular allocation. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 300 (doi: 10.3389/fpls.2020.00300).
26. Bonhomme A., Durand M., Quintana C., Halpern S. Influence du cobalt et de la vitamine B12 sur la croissance et la survie des ciliés du rumen in vitro, en fonction de la population bactérienne. *Reproduction Nutrition Développement*, 1982, 22(1A): 107-122 (doi: 10.1051/rnd:19820109).
27. Hai Y., Dugery R.J., Healy D., Christianson D.W. Formiminoglutamase from *Trypanosoma cruzi* is an arginase-like manganese metalloenzyme. *Biochemistry*, 2013, 52(51): 9294-9309 (doi: 10.1021/bi401352h).
28. Li A.-H., Na B.-K., Song K.-J., Lim S.-B., Chong C.-K., Park Y.-K., Kim T.-S. Identification and characterization of a mitochondrial manganese superoxide dismutase of *Spirometra erinacei*. *Journal of Parasitology*, 2011, 97(6): 1106-1112 (doi: 10.1645/GE-2753.1).
29. Nechev J., Stefanov K., Popov S. Effect of cobalt ions on lipid and sterol metabolism in the marine invertebrates *Mytilus galloprovincialis* and *Actinia equine*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2006, 144(1): 112-118 (doi: 10.1016/j.cbpa.2006.02.022).
30. Tajchman K., Ukalska-Jaruga A., Bogdaszewski M., Pecio M., Janiszewski P. Comparison of the accumulation of macro- and microelements in the bone marrow and bone of wild and farmed red deer (*Cervus elaphus*). *BMC Veterinary Research*, 2021, 17(1): 1-11 (doi: 10.1186/s12917-021-03041-2).
31. Liu Y., Zhang J., Wang C., Liu Q., Guo G., Huo W., Chen L., Zhang Y., C. Pei C., Zhang S.

- Effects of folic acid and cobalt sulphate supplementation on growth performance, nutrient digestion, rumen fermentation and blood metabolites in Holstein calves. *British Journal of Nutrition*, 2022, 127(9): 1313-1319 (doi: 10.1017/S000711452100221X).
32. Archibald F.S., Fridovich I. The scavenging of superoxide radical by manganous complexes: in vitro. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1982, 214(2): 452-463 (doi: 10.1016/0003-9861(82)90049-2).
  33. Barnese K., Gralla E.B., Valentine J.S., Cabelli D.E. Biologically relevant mechanism for catalytic superoxide removal by simple manganese compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(18): 6892-6897 (doi: 10.1073/pnas.1203051109).
  34. Anjem A., Imlay J.A. Mononuclear iron enzymes are primary targets of hydrogen peroxide stress. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(19): 15544-15556 (doi: 10.1074/jbc.M111.330365).
  35. Sobota J.M., Imlay J.A. Iron enzyme ribulose-5-phosphate 3-epimerase in *Escherichia coli* is rapidly damaged by hydrogen peroxide but can be protected by manganese. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(13): 5402-5407 (doi: 10.1073/pnas.1100410108).
  36. Zeinert R., Martinez E., Schmitz J., Senn K., Usman B., Anantharaman V., Aravind L., Waters L.S. Structure—function analysis of manganese exporter proteins across bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(15): 5715-5730 (doi: 10.1074/jbc.M117.790717).
  37. Waters L.S. Bacterial manganese sensing and homeostasis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2020, 55: 96-102 (doi: 10.1016/j.cbpa.2020.01.003).
  38. Smith A.D., Warren M.J., Refsum H. Vitamin B<sub>12</sub>. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2018, 83: 215-279 (doi: 10.1016/bs.afnr.2017.11.005).
  39. Erikson K.M., Aschner M. 10. Manganese: its role in disease and health. In: *Essential metals in medicine: therapeutic use and toxicity of metal ions in the clinic* /P.L. Carver (ed.). De Gruyter, Berlin, Boston, 2019: 253-266 (doi: 10.1515/9783110527872-010).
  40. Balachandran R.C., Mukhopadhyay S., McBride D., Veevers J., Harrison F.E., Aschner M., Haynes E.N., Bowman A.B. Brain manganese and the balance between essential roles and neurotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(19): 6312-6329 (doi: 10.1074/jbc.REV119.009453).
  41. Martins Jr. A.C., Gubert P., Villas Boas G.R., Meirelles Paes M., Santamaria A., Lee E., Tinkov A.A., Bowman A.B., Aschner M. Manganese-induced neurodegenerative diseases and possible therapeutic approaches. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 2020, 20(11): 1109-1121 (doi: 10.1080/14737175.2020.1807330).
  42. Warren M.J., Raux E., Schubert H.L., Escalante-Semerena J.C. The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B<sub>12</sub>). *Natural Product Reports*, 2002, 19(4): 390-412 (doi: 10.1039/b108967f).
  43. Osman D., Cooke A., Young T.R., Deery E., Robinson N.J., Warren M.J. The requirement for cobalt in vitamin B<sub>12</sub>: a paradigm for protein metalation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2021, 1868(1), 118896 (doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118896).
  44. Tjong E., Dimri M., Mohiuddin S.S. *Biochemistry, Tetrahydrofolate*. StatPearls Publishing, 2021.
  45. Budinger D., Barral S., Soo A.K., Kurian M.A. The role of manganese dysregulation in neurological disease: emerging evidence. *The Lancet Neurology*, 2021, 20(11): 956-968 (doi: 10.1016/S1474-4422(21)00238-6).
  46. Lison D., Van Den Brule S., Van Maele-Fabry G. Cobalt and its compounds: update on genotoxic and carcinogenic activities. *Critical Reviews in Toxicology*, 2018, 48(7): 522-539 (doi: 10.1080/10408444.2018.1491023).
  47. Mauter M.S., Zucker I., Perreault F., Werber J.R., Kim J.H., Elimelech M. The role of nanotechnology in tackling global water challenges. *Nature Sustainability*, 2018, 1(4): 166-175 (doi: 10.1038/s41893-018-0046-8).
  48. Ameen F., Alsamhary K., Alabdullatif J.A., ALNadhari S. A review on metal-based nanoparticles and their toxicity to beneficial soil bacteria and fungi. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 213: 112027 (doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112027).
  49. Danzeisen R., Weight D., Blakeney M., Boyle D. A tiered approach to investigate the inhalation toxicity of cobalt substances. Introduction: Cobalt's essential role in nature and technology. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2022, 130: 105125 (doi: 10.1016/j.yrtph.2022.105125).
  50. Leyssens L., Vinck B., Van Der Straeten C., Wuyts F., Maes L. Cobalt toxicity in humans — a review of the potential sources and systemic health effects. *Toxicology*, 2017, 387: 43-56 (doi: 10.1016/j.tox.2017.05.015).
  51. Yang S., Ling G., Li Q., Yi K., Tang X., Zhang M., Li X. Manganese toxicity-induced chlorosis in sugarcane seedlings involves inhibition of chlorophyll biosynthesis. *The Crop Journal*, 2022, 10(6): 1674-1682 (doi: 10.1016/j.cj.2022.04.008).
  52. Noor I., Sohail H., Hasanuzzaman M., Hussain S., Li G., Liu J. Phosphorus confers tolerance against manganese toxicity in *Prunus persica* by reducing oxidative stress and improving chloroplast ultrastructure. *Chemosphere*, 2022, 291(part 3): 132999 (doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.132999).
  53. Tang T., Tao F., Li W. Characterisation of manganese toxicity tolerance in *Arabidopsis paniculata*. *Plant Diversity*, 2021, 43(2): 163-172 (doi: 10.1016/j.pld.2020.07.002).
  54. Ali Z., Yousafzai A.M., Sher N., Muhammad I., Nayab G.E., Aqeel S.A.M., Shah S.T., Aschner M., Khan I., Khan H. Toxicity and bioaccumulation of manganese and chromium in

- different organs of common carp (*Cyprinus carpio*) fish. *Toxicology Reports*, 2021, 8: 343-348 (doi: 10.1016/j.toxrep.2021.02.003).
55. Tavakoli P., Ghaffarifar F., Delavari H., Shahpari N. Efficacy of manganese oxide (Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles against *Leishmania major* in vitro and in vivo. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2019, 56: 162-168 (doi: 10.1016/j.jtemb.2019.08.003).
  56. Rana S., Kumar A. Toxicity of nanoparticles to algae-bacterial co-culture: knowns and unknowns. *Algal Research*, 2022, 62: 102641 (doi: 10.1016/j.algal.2022.102641).
  57. Дроздова Е.А., Каримов И.Ф. Влияние нормального компонентного состава рубцовой жидкости на уровень свечения биосенсора. *Вестник Оренбургского государственного университета*, 2014, 6(167): 104-107.
  58. Liu Y.-J. Understanding the complete bioluminescence cycle from a multiscale computational perspective: a review. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 2022, 52: 100537 (doi: 10.1016/j.jphotochemrev.2022.100537).
  59. Dasari T.P., Pathakoti K., Hwang H.M. Determination of the mechanism of photoinduced toxicity of selected metal oxide nanoparticles (ZnO, CuO, Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and TiO<sub>2</sub>) to *E. coli* bacteria. *Journal of Environmental Sciences*, 2013, 25(5): 882-888 (doi: 10.1016/S1001-0742(12)60152-1).
  60. Weimer P.J. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentations. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 296 (doi: 10.3389/fmicb.2015.00296).
  61. Henderson G., Cox F., Ganesh S., Jonker A., Young W., Global Rumen Census Collaborators, Janssen P.H. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 14567 (doi: 10.1038/srep14567).
  62. Lan W., Yang C. Ruminal methane production: Associated microorganisms and the potential of applying hydrogen-utilizing bacteria for mitigation. *Science of the Total Environment*, 2019, 654: 1270-1283 (doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.11.180).
  63. Fliegerova K., Kaerger K., Kirk P., Voigt K. Rumen fungi. In: *Rumen microbiology: from evolution to revolution* /A. Puniya, R. Singh, D. Kamra (eds.). Springer, New Delhi, 2015: 97-112 (doi: 10.1007/978-81-322-2401-3\_7).
  64. Newbold C.J., De la Fuente G., Belanche A., Ramos-Morales E., McEwan N.R. The role of ciliate protozoa in the rumen. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1313 (doi: 10.3389/fmicb.2015.01313).
  65. Liang J., Nabi M., Zhang P., Zhang G., Cai Y., Wang Q., Ding Y. Promising biological conversion of lignocellulosic biomass to renewable energy with rumen microorganisms: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2020, 134: 110335 (doi: 10.1016/j.rser.2020.110335).
  66. Saptarshi S.R., Duschl A., Lopata A.L. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *Journal of Nanobiotechnology*, 2013, 11(1): 26 (doi: 10.1186/1477-3155-11-26).
  67. Spagnoletti F.N., Kronberg F., Spedalieri C., Munarriz E., Giacometti R. Protein corona on biogenic silver nanoparticles provides higher stability and protects cells from toxicity in comparison to chemical nanoparticles. *Journal of Environmental Management*, 2021, 297: 113434 (doi: 10.1016/j.jenvman.2021.113434).
  68. Galindo T.P.S., Pereira R., Freitas A.C., Santos-Rocha T.A.P., Rasteiro M.G., Antunes F., Rodrigues D., Soares A.M.V.M., Gonçalves F., Duarte A.C., Lopes I. Toxicity of organic and inorganic nanoparticles to four species of white-rot fungi. *Science of the Total Environment*, 2013, 458-460: 290-297 (doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.04.019).
  69. Parsai T., Kumar A. Effect of seawater acidification and plasticizer (Bisphenol-A) on aggregation of nanoparticles. *Environmental Research*, 2021, 201: 111498 (doi: 10.1016/j.envres.2021.111498).

<sup>1</sup>ФГБНУ ФНЦ Биологических систем  
и агротехнологий РАН,  
460000 Россия, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29,  
e-mail: daniilshoshin@mail.ru ✉, sizova.178@yandex.ru,  
ayna.makaeva@mail.ru;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Оренбургский государственный  
университет,  
460018 Россия, г. Оренбург, пр. Победы, 13

Поступила в редакцию  
5 июня 2023 года

*Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2023, V. 58, № 6, pp. 1122-1136

## BACTERIAL LUMINESCENCE OF MANGANESE- AND COBALT-CONTAINING ULTRAFINE PARTICLES (Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) IN THE RUMEN FLUID

D.E. Shoshin<sup>1, 2</sup> ✉, E.A. Sizova<sup>1, 2</sup>, A.M. Kamirova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies RAS, 29, ul. 9 Yanvarya, Orenburg, 460000,

## Abstract

Along with the main nutrients, proteins, fats and carbohydrates, mineral elements are important in feeding farm animals, including cattle and poultry (D.V. Mashnin et al., 2022; T.M. Okolelova et al., 2018). Their inorganic or organic forms are components of premixes (M.Y. Mishanin et al., 2021; O.S. Koschaeva 2018). However, nanocompositions are more promising, the properties of which can be modeled by changing the shape, synthesis paths and size of ultrafine particles (UFP) (S. Miroshnikov et al., 2019). However, the use of UFPs has a number of limitations related to their potential toxicity (E. Rusakova et al., 2015). It is also known that the symbiotic microflora forms a multicomponent suspension of organic substances, intermediate and final metabolites of the microbiome, capable of interacting with UFP (B.S. Nurzhanov et al., 2019). In this work, the dynamics of luminescence of a bacterial test object was established for the first time when a complex of UFPs and rumen fluid was introduced into the nutrient medium. This combination has been shown to neutralize the toxicity of nano-structures. The purpose of our work was to evaluate the properties of ultrafine particles using the example of various concentrations of manganese and cobalt oxide in the biochemical environment of the ruminal community based on the method of inhibition of bacterial luminescence. The study was conducted on the basis of the center Nanotechnology in Agriculture of the FRC BST RAS (Orenburg) in 2022. Chemically pure manganese oxides  $Mn_2O_3$  and cobalt  $Co_3O_4$  (99 %) for analysis in the amount of 157.8 and 240.7 mg were dispersed by ultrasound at a frequency of 35 kHz in 1 ml of distilled water for 30 minutes at 25 °C. The rumen fluid (RF) was collected through a chronic rumen fistula (d = 80 mm, ANKOM Technology Corporation, USA) 3 hours after feeding in a Kazakh white-headed bull, whose main diet was 30 % concentrates and 70 % coarse feed without the addition of UFP. The luminescent bacterial test Ecolum (a lyophilized culture of *Escherichia coli* microorganisms carrying a hybrid plasmid pUC19 with *luxCDABE* cloned *P. leiognathi* 54D10 genes, SIS IMMUNOTECH, Russia) was used. In a bioluminescent plan, a series of double dilutions of the UFP and RF suspension was prepared starting from 50  $\mu$ l  $Mn_2O_3$  (1 mol/l) + 50  $\mu$ l RF; 50  $\mu$ l  $Co_3O_4$  (1 mol/l) + 50  $\mu$ l RF; 50  $\mu$ l  $Mn_2O_3$  (1 mol/l) + 50  $\mu$ l distilled water; 50  $\mu$ l  $Co_3O_4$  (1 mol/l) + 50  $\mu$ l distilled water; 100  $\mu$ l RF; 100  $\mu$ l distilled water (control). Then 100  $\mu$ l of the Ecolum test system were added to each cell to a total concentrations of UFPs from 0.25 to 0.00025 mol/l and dilution of RF from 1\_2 to 1:2048 in a pure test and from 1:4 to 1:4096 in the test with UFPs. The toxicity of the studied samples was determined on a multifunctional micro-lancet reader TECAN Infinite F200 (Tecan Austria GmbH, Austria), fixing the luminescence value of the bacterial strain *E. coli* K12 TG1 at different concentrations of ultrafine particles and rumen fluid for 3 hours with a period of 5 minutes. Based on the obtained data, graphs reflecting the dynamics of bioluminescence inhibition were constructed and the toxicity index (T) and the relative value of bioluminescence (A) was calculated. It was found that UFPs in their pure form cause dose-dependent inhibition of bacterial luminescence, suppressing over 50 % of the luminescence ( $EC_{50}$ ) even when diluted by 2048 times (0.00025 mol/l). The values of the toxicity index, when calculating which the control is taken as 100 %, clearly indicate a decrease in the toxic properties of suspensions with a decrease in the proportion of UFPs in them. For  $Mn_2O_3$ , this value ranged from 89.76 % at a concentration of 0.25 mol/l to 38.57 % at 0.00025 mol/l at the 1st minute of the exposure and from 95.16 to 52.85 % at the end of the 3rd hour; for  $Co_3O_4$  — 99.44 and 32.80 %, respectively, at the 1st minute, and 99.43 and 54.72 % at the end of the 3rd hour. Similar indicators in the experiment with rumen fluid appeared only in the first minutes of exposure, after which the luminosity increased significantly, reaching 769.10 % to the control at 64-fold dilution. When combining rumen fluid with UFPs, a regression of the toxic properties of the latter was observed, although the maximum luminosity in combination with  $Mn_2O_3$  was only 43.28 % of those for native RF, in combination with  $Co_3O_4$  36.44 %. The observed changes in luminescence were divided into three types. The first type is control (luminescence changes in proportion to the growth phases of the bacterial culture; without additives). The second type corresponds to deep changes (suppression of luminescence throughout the entire exposure period; with the addition of UFPs), and the third type is competitive (increase in luminescence from the beginning to the end of the experiment; with the addition of RF or a complex of RF+UFP). Thus, the combination of rumen fluid with metal oxide particles leads to an inhibition of their toxicity to the test object.

Keywords: ultrafine particles, bacterial cells, bioluminescence, manganese oxide, cobalt oxide, rumen fluid.