

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ И КОРМОПРОИЗВОДСТВЕ

Научная статья

УДК 577.15:577.17

doi:10.33284/2658-3135-106-1-8

Оценка биологической активности комплекса ультрадисперсных частиц меди и ферментативной добавки с использованием бактериальной тест-системы

Ксения Сергеевна Нечитайло¹, Елена Анатольевна Сизова^{2,3}, Даниил Евгеньевич Шошин⁴

^{1,2,4}Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук, Оренбург, Россия

³Оренбургский государственный университет, Оренбург, Россия

¹k.nechit@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8755-414X>

^{2,3}sizova.L78@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5125-5981>

⁴daniilshoshin@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3086-681X>

Аннотация. По мере роста антибиотикорезистентности требуются альтернативные стратегии наращивания продуктивности, свободные от применения антибиотиков и широко внедряемые в практику животноводства. Помимо этого, важнейшим критерием использования данной стратегии является отсутствие конфликта, влияющего на эффективность и безопасность других добавок. Ультрадисперсные частицы являются потенциальным решением проблемы распространения множественной лекарственной устойчивости, но из-за многоцелевого механизма действия требуются дополнительные исследования. В связи с этим целью исследований стало проведение сравнительной оценки биологической активности комплекса ультрадисперсных частиц меди и ферментативной добавки с использованием биосенсора. В результате выявлено, что сочетанное воздействие фермента 0,05 % и 0,00078 М ультрадисперсных частиц меди стимулирует интенсивность люминесценции иммобилизованных клеток *Echerichia coli K12 TG1*, что вероятно связано с системой генерации свечения бактерий, в частности с действием люциферазы. При этом введение ультрадисперсных частиц меди отдельно, в диапазоне концентраций от 1 М до 0,1 М, проявляло высокую биологическую активность с полным тушением биосенсора, свидетельствуя о гибели бактериальных клеток-мишеней. Концентрация 0,00078 М способствовала снижению свечения в самом начале контакта, далее наблюдаемый эффект нивелировался и ингибирование на 90 минуте контакта составило 20 %, к концу воздействия (180 минут) эффект не обнаружен. Работа является частью комплексного исследования по разработке инновационного стимулятора роста цыплят-бройлеров как эффективной альтернативы кормовым антибиотикам.

Ключевые слова: биолоуминесценция, биологическая активность, ультрадисперсные частицы, медь, ферменты, амилаза, ксиланаза, протеаза, биобезопасность, бактериальная клетка

Благодарности: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 22-26-00253.

Для цитирования: Нечитайло К.С., Сизова Е.А., Шошин Д.Е. Оценка биологической активности комплекса ультрадисперсных частиц меди и ферментативной добавки с использованием бактериальной тест-системы // Животноводство и кормопроизводство. 2023. Т. 106, № 1. С. 8-20. <https://doi.org/10.33284/2658-3135-106-1-8>

Original article

Evaluation of the biological activity of a complex of ultrafine copper particles and an enzymatic additive using bacterial test system

Ksenia S Nechitailo¹, Elena A Sizova^{2,3}, Daniil E Shoshin⁴

^{1,2,4}Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russia

³Orenburg State University, Orenburg, Russia

¹k.nechit@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8755-414X>

^{2,3}sizova.L78@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5125-5981>

⁴daniilshoshin@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3086-681X>

Abstract. As antibiotic resistance grows, alternative strategies for increasing productivity are required, free from the use of antibiotics and widely implemented in animal husbandry. In addition, the most important criterion for the use of this strategy is the absence of conflict that affects the effectiveness and safety of other additives. Ultrafine particles are a potential solution to the problem of the spread of multi-drug resistance, but due to the multipurpose mechanism of action, more research is required. In this regard, the purpose of the research was to conduct a comparative assessment of the biological activity of a complex of ultrafine copper particles and an enzymatic additive using a biosensor. As a result, it was found that the combined effect of the enzyme 0.05% and 0.00078 M ultrafine copper particles stimulates the luminescence intensity of immobilized *Echerichia coli* K12 TG1 cells, which is probably associated with the bacterial luminescence generation system, in particular, with the action of luciferase. At the same time, the introduction of ultrafine copper particles separately, in the concentration range from 1 M to 0.1 M, showed high biological activity with complete quenching of the biosensor, indicating the death of bacterial target cells. A concentration of 0.00078 M contributed to a decrease in luminescence at the very beginning of contact, then the observed effect was leveled and inhibition at the 90th minute of contact was 20%, by the end of exposure (180 minutes) the effect was not detected. The work is part of a comprehensive study on the development of an innovative growth stimulant for broiler chickens as an effective alternative to feed antibiotics.

Keywords: bioluminescence, biological activity, ultrafine particles, copper, enzymes, amylase, xylanase, protease, biosafety, bacterial cell

Acknowledgments: the work was supported by the Russian Science Foundation, Project No. 22-26-00253.

For citation: Nechitailo KS, Sizova EA, Shoshin DE. Evaluation of the biological activity of a complex of ultrafine copper particles and an enzymatic additive using bacterial test system. *Animal Husbandry and Fodder Production*. 2023;106(1):8-20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33284/2658-3135-106-1-8>

Введение.

В связи с повышением резистентности к антибиотикам необходимы альтернативные стратегии антибактериальных стимуляторов роста. Известно, что ультрадисперсные частицы обладают высокой противомикробной активностью (Макаева А.М., 2019). Имея отличительные от макроразмерных частиц свойства, такие как физико-химический состав поверхности, ультрадисперсные частицы способны ингибировать рост бактерий и, следовательно, использоваться в качестве инструмента для борьбы с патогенными микроорганизмами (Ermini ML and Voliani V, 2021). Медь является хорошо известным противомикробным средством, однако лежащие в основе молекулярные механизмы, вызывающие гибель клеток, ещё полностью не изучены (Zuily L et al., 2022). К тому же довольно часто возникает необходимость во введении в рацион животных агентов различной природы, стимулирующих или угнетающих действия друг друга (Макаева А.М., 2019; Рязанцева К.В. и др., 2021). В исследованиях Muszyński S с коллегами (2018) установлено, что введение органической формы меди в рацион бройлеров в сочетании с фитазой оказывает положительное влияние на метаболизм в костной ткани и улучшает развитие хрящевой ткани. Помимо этого, в рацион живот-

ных производители вынуждены вводить энзиматические добавки (Околелова Т.М. и Салимов Т.М., 2020). Являясь неспецифическим ингибитором, медь влияет на активность ряда ферментов (Purov S et al., 2020). Опираясь на тот факт, что ферменты ответственны за большинство поддерживающих жизнь биохимических процессов, нарушение энзиматической активности наносит большой ущерб живым системам. Бактерии, будучи мелкими одиночными клетками, ещё более подвержены снижению ферментативной активности (Saphier M et al., 2021). Поэтому, учитывая возникновение ряда побочных реакций при сочетанном применении веществ различной природы, перед нами возник вопрос оценки влияния меди и комплекса, состоящего из эндо-1,4-бета-ксилазы, альфа-амилазы и субтилизина, на активность с системой генерации свечения бактерий.

Цель исследования.

Сравнительная оценка биологической активности комплекса ультрадисперсных частиц меди и ферментативной добавки с использованием бактериальной тест-системы.

Материалы и методы исследований.

Объекты исследования. Генно-инженерные люминесцирующие бактерии *Echerichia coli K12 TG1*, конститутивно экспрессирующие *luxCDABE*-гены природного морского микроорганизма *Photobacterium leiognathi* 54D10 (НВО «Иммунотех», г. Москва, Россия) в лиофилизированном состоянии под коммерческим названием «Эколюм 10».

Схема эксперимента. Люминесцентный бактериальный тест проводился в соответствии с рекомендациями производителя (НВО «Иммунотех», Россия). Перед началом исследования осуществляли регидратацию препарата лиофилизированных бактерий *Echerichia coli K12 TG1* путём вскрытия флакона с биореагентом и добавления 10 мл дистиллированной воды. Оценка степени ингибирования динамики свечения бактерий осуществляли путём внесения в ячейки планшета исследуемого вещества и суспензии люминесцирующих бактерий в соотношении 1:1. Далее планшет помещали в измерительный блок анализатора. Для регистрации фонового свечения бактерий были использованы контрольные пробы с внесением в ячейки дистиллированной воды. Результаты влияния исследуемых веществ на интенсивность бактериальной биолюминесценции (I) оценивали с

использованием формулы:
$$I = \frac{I_{k0 \text{ мин}} \times I_{on \text{ мин}}}{I_{kn \text{ мин}} \times I_{o0 \text{ мин}}}$$

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

Учитывали 3 пороговых уровня токсичности:

- меньше 20 – образец «не токсичен» (тушение люминесценции ≤ 20 %);
- от 20 до 50 – образец относительно токсичен (тушение люминесценции 50 %);
- равно или больше 50 – образец токсичен (тушение люминесценции ≥ 50 %) (Сизова Е.А. и др., 2019).

За критерий оценки биологической активности принимали изменение интенсивности биолюминесценции тестируемого объекта в анализируемом образце по сравнению с контрольным образцом, исключая токсические агенты.

Физико-химические характеристики суспензии ультрадисперсных частиц меди (ООО «Платина», Москва): доля меди – 99,7 %; гидродинамический радиус – $127 \pm 24,3$ нм; дзета-потенциал – $31 \pm 0,1$ мВ. Готовили на дистиллированной воде. Точные навески перед диспергированием помещали в дисперсионный носитель и перемешивали. Исходная концентрация меди в растворах составила 1 М. Дальнейшее приготовление осуществляли методом ступенчатого разведения дистиллированной водой. В качестве ферментной добавки была использована мультиэнзимная композиция, содержащая в составе эндо-1,4-бета-ксилазу – 4000 ед./г, альфа-амилазу – 400 ед./г и субтилизина – 8000 ед./г (ООО «Данзим», Россия). Навеску аналогичным способом суспендировали в дистиллированной воде (1 %).

Оборудование и технические средства. Исследования выполнены в центре «Нанотехнологии в сельском хозяйстве» с использованием приборной базы ЦКП БСТ РАН <http://цкп-бст.рф>. Микропланшетный анализатор Infinite 200 PRO ("Tecan Austria GmbH", Австрия) с программным обеспечением Magellan ("Tecan Austria GmbH", Австрия) и ультразвуковой процессор UP50H (Helischer Ultrasonics, Германия). Точные навески определяли на аналитических весах ВЛА-135 М (ООО «НПП «ГОСМЕТР», Россия). Планшеты 96-луночные из непрозрачного пластика (PP; F-образные; «Greiner», Германия).

Статистическая обработка. Обработку экспериментальных данных производили с помощью статистического анализа с использованием программного пакета «Statistica 12» («Stat Soft Inc.», США) и «Microsoft Excel» («Microsoft», США). Проверка на нормальность распределения данных была проведена с помощью критерия согласия Колмогорова-Смирнова. Для оценки статистической значимости использовали параметрический t- критерий Стьюдента независимых групп.

Результаты исследований.

Оценка конститутивного характера свечения люминесцентных бактерий позволила выявить общую биологическую активность исследуемых образцов. Так, в ходе анализа установлено, что медь в ультрадисперсной форме в диапазоне концентраций от 1 М до 0,1 М проявляла высокую биологическую активность с полным тушением биосенсора (рис. 1), свидетельствуя о гибели бактериальных клеток-мишеней. Дальнейшее разведение, в частности до 0,0015 М, формировало люминесцентный отклик в 50 % в первые минуты контакта и заканчивалось полным ингибированием. Концентрация 0,00078 М способствовала снижению свечения в самом начале контакта, далее наблюдаемый эффект нивелировался и ингибирование на 90 минуте контакта составило 20 %, к концу воздействия (180 минут) эффект не обнаружен. Таким образом, медь в ультрадисперсной форме обладает выраженным бактерицидным эффектом, безопасное применение данного микроэлемента на макрообъекте допустимо в концентрации 0,00078 М. Соответственно, сочетанное применение ультрадисперсной меди с ферментной добавкой также будем рассматривать, начиная с концентрации микроэлемента 0,00078 М.

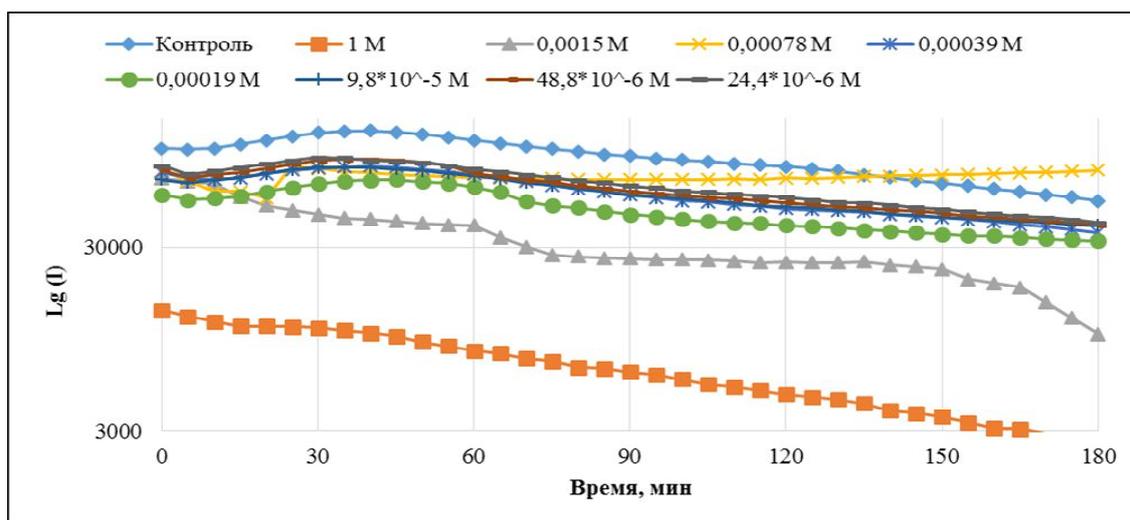


Рис. 1 – Динамика свечения *E. coli* K12 TG1 с клонированными *lux CDABE*-генами *P. leiongnathi* 54 D10 при контакте с ультрадисперсными частицами меди
Figure 1 – Luminescence dynamics of *E. coli* K12 TG1 with cloned *P. leiongnathi* 54 D10 *lux CDABE* genes upon contact with ultrafine copper particles

Ферментная добавка не оказывала ингибирующего эффекта на параметры свечения. При этом установлено относительное стимулирующее действие на люминесцентный отклик рекомбинантного штамма *E. coli* K12 TG1 в концентрациях добавки 0,1 % и 0,05 %. Об этом свидетельствует непосредственно динамика свечения (рис. 2) и показатели относительной биолюминесценции (табл. 1).

Спустя 180 минут контакта наблюдалось незначительное снижение бактериального свечения в контрольных и опытных ячейках на фоне истощения люминесцентного потенциала биосенсора.

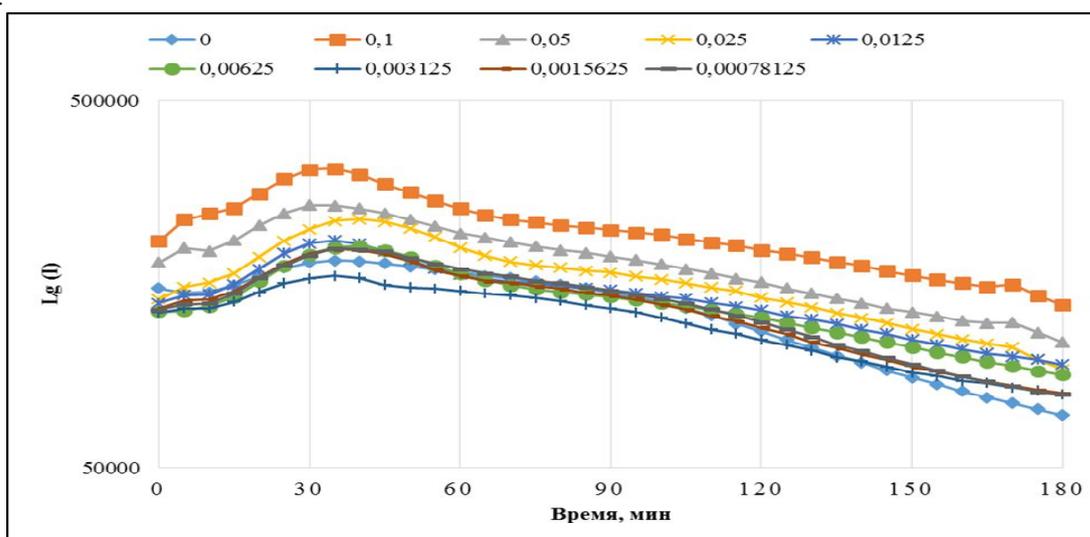


Рис. 2 – Динамика свечения *E. coli* K12 TG1 с клонированными *lux CDABE*-генами *P.leiognathi* 54 D10 при контакте с ферментной добавкой 0,1 (%)

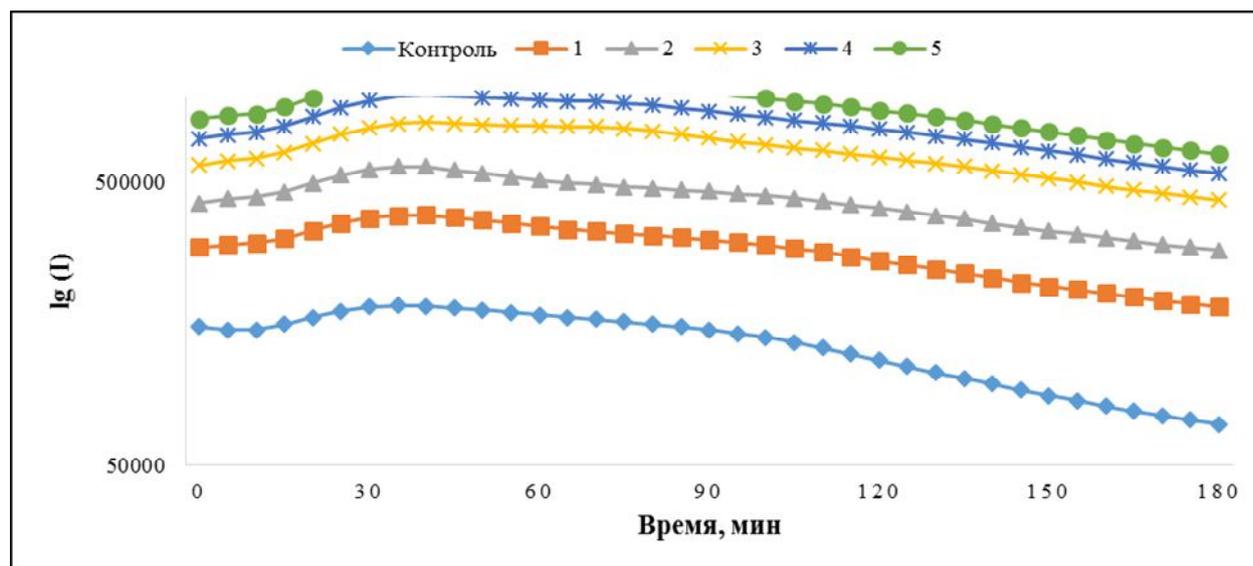
Figure 2 – Dynamics of luminescence of *E. coli* K12 TG1 with cloned *lux CDABE* genes of *P.leiognathi* 54 D10 upon contact with an enzyme additive 0.1 (%)

Таблица 1. Относительное значение биолюминесценции (%) при контакте люминесцирующего штамма *E. coli* K12 TG1 с ферментной добавкой

Table 1. Relative value of bioluminescence (%) upon contact of the luminescent strain *E. coli* K12 TG1 with an enzyme additive

Время (мин) / Time (min)	Концентрация (%) / Concentration (%)								
	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625	0,003125	0,001563	0,000781	0,000391
0	133,91±7,1	117,31±5,6	93,18±5,1	91,14±5,3	86,04±4,2	85,77±4,6	87,93±4,9	87,19±6,3	86,66±3,4
30	179,61±8,6	143,37±8,2	123,48±6,2	112,79±5,6	105,15±5,5	90,67±5,3	105,81±7,8	104,63±5,2	97,16±6,4
60	149,37±9,4	127,90±6,5	116,79±6,3	98,98±5,1	99,27±5,1	89,28±5,5	97,87±8,3	102,12±6,1	96,71±7,5
90	147,46±7,5	124,89±6,1	113,08±5,8	101,37±5,7	97,35±4,9	90,20±6,4	97,95±7,4	101,29±4,5	94,83±6,7
120	165,96±7,8	136,08±6,3	123,78±6,2	114,34±6,7	108,96±5,6	95±7,1	102,33±6,8	105,79±6,3	94,74±5,3
150	189,71±10,1	150,56±6,8	135,32±7,1	126,71±7,3	120,96±6,3	103,36±9,2	107,01±6,5	108,82±7,4	95,68±4,8
180	199,26±10,5	157,64±8,2	133,41±8,6	137,59±7,2	129,01±6,6	113,81±4,3	114,38±5,3	113,67±6,2	98,74±7,1

Далее анализировали комплексы веществ с целью установления синергизма или антагонизма между ними. Так, комплекс меди в ультрадисперсной форме в концентрации 0,00078 М и ферментной добавки 0,5 % не сопровождался отрицательными эффектами в отношении биолюминесценции штамма *Escherichia coli K12 TG1 pFI* (рис. 3). При этом показатель относительной биолюминесценции был выше значений контроля на 40-60 %, что подтверждает синергизм действия на метаболизм бактерий.



Примечание: 1 – соотношение меди в ультрадисперсной форме в концентрации 0,0015 М и ферментной добавки 0,5 % 1:1; 2-5 – последующая серия двукратных разведений

Note: 1 – the ratio of copper in the ultrafine form at a concentration of 0.0015 M and the enzyme additive 0.5% 1:1; 2-5 – subsequent series of two-fold dilutions

Рис. 3 – Динамика свечения *E. coli K12 TG1* с клонированными *lux CDABE*-генами *P.leiognathi 54 D10* при контакте с комплексом ферментной добавки (0,1 %) и меди в ультрадисперсной форме в концентрации 0,0015 М

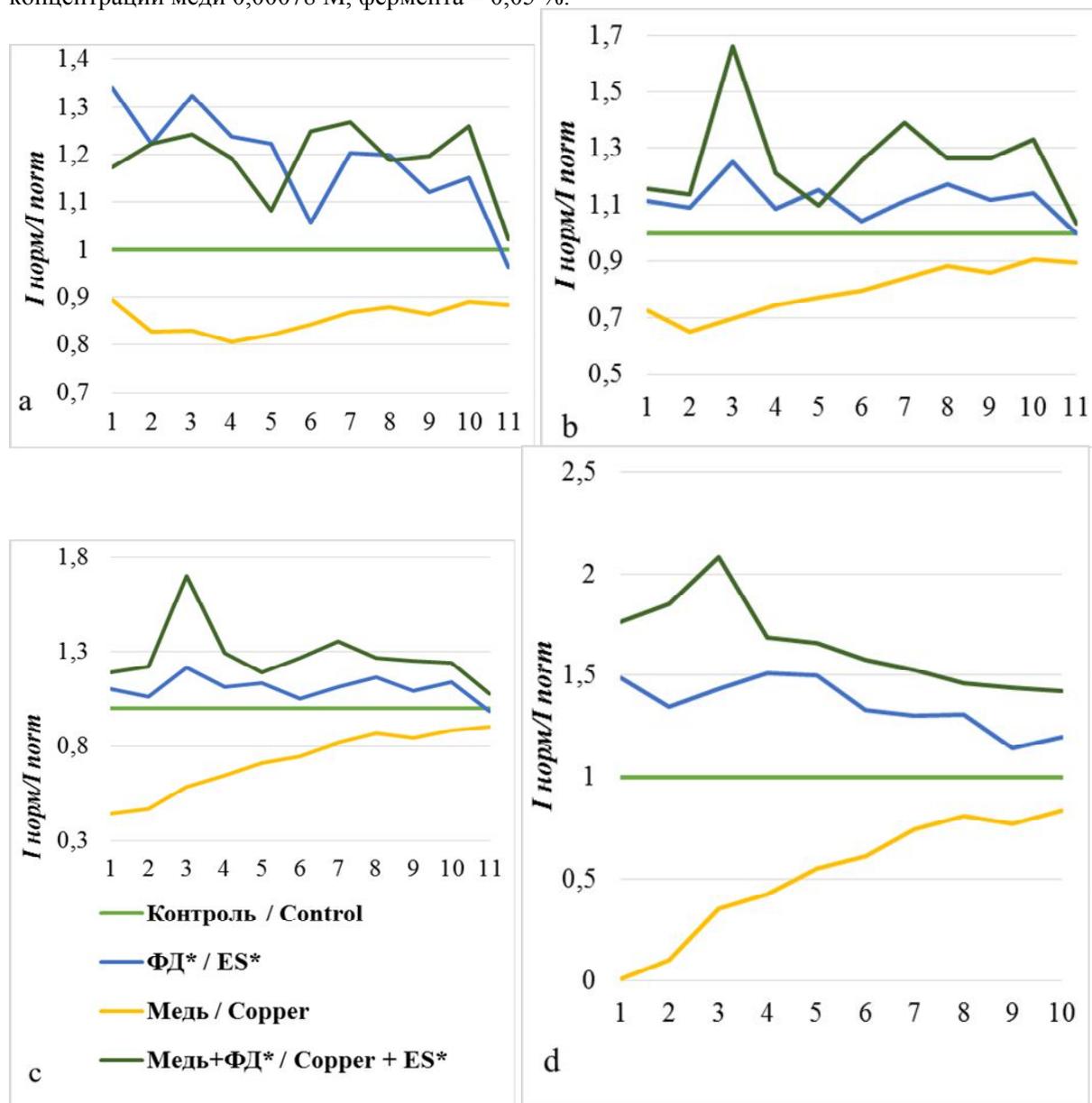
Figure 3 – Dynamics of luminescence of *E. coli K12 TG1* with cloned *lux CDABE* genes of *P.leiognathi 54 D10* upon contact with a complex of an enzyme additive (0.1%) and copper in ultrafine form at a concentration of 0.0015 M

При этом при сравнении нормализованной люминесценции был выявлен ярко выраженный биологический эффект во времени (рис. 4) в зависимости от сочетания веществ. Так, в первые минуты контакта исследуемых агентов с биосенсором отметим скачкообразный характер динамики свечения при использовании отдельно фермента и комплекса фермент+медь в зависимости от степени разведения. При этом нормализованная люминесценция исключительно меди была ниже контроля вне зависимости от концентрации активного агента.

Увеличение дальнейшего контакта до 60 и 90 минут характеризовалось пиковым свечением комплекса фермент+медь в точке 2, что соответствует концентрации меди 0,00078 М и фермента 0,5 %. Серия двукратных разведений способствовала снижению свечения в связи с соответствующим уменьшением активных компонентов. Особенность свечения бактерий при добавлении меди в данном отрезке времени характеризовалась восстановлением интенсивности биолюминесценции до контрольных значений.

Характер свечения биосенсора в конце контакта (180 мин) отражал схожую динамику люминесценции спустя 60 и 90 мин. Биосенсор реагировал на введение меди в концентрации 0,0015 М полным ингибированием свечения, дальнейшее разведение способствовало восстановлению биолюминесценции до уровня контроля. Эксперимент показал, что фермент и комплекс фермент+медь

приводили к интенсификации свечения, что также наглядно демонстрирует высокую биологическую активность данного образца, пик люминесценции наблюдался в точке 2, что соответствует концентрации меди 0,00078 М, фермента – 0,05 %.



Примечание: * ФД – ферментная добавка; по оси X указана серия двукратных разведений образцов (1-11), начиная с меди 0,0015 М, ферментной добавки 0,1 %, соотношение 1:1
Note: * ES – Enzyme supplement; the X-axis shows a series of two-fold dilutions of samples (1-11) starting with copper 0.0015 M, enzyme supplement 0.1%, ratio 1:1

Рис. 4 – Зависимость нормализованного индекса свечения (I_{norm}) *E. coli* K12 TG1 от концентрации и сочетания исследуемых образцов, а – время контакта 30 мин, б – 60 мин, с – 90 мин, д – 180 мин

Figure 4 – Dependence of the normalized luminescence index (I_{norm}) of *E. coli* K12 TG1 on the concentration and combination of the studied samples, а – contact time 30 min., б – 60 min., с – 90 min., д – 180 min.

Обсуждение полученных результатов.

В зависимости от условия среды изменяется интенсивность свечения биосенсора посредством высокой чувствительности к pH, присутствию химических агентов, температуры и т. д. (Dunlap P, 2014). В ходе исследования установлено, что ферментная добавка не оказывала токсического эффекта на тест-систему и, как следствие, параметры свечения. При этом установлено стиmulирующее действие на люминесцентный отклик в концентрациях 0,1 % и 0,05 %, что свидетельствует о включения исследуемого вещества в метаболический аппарат бактериальной клетки.

По сравнению с другими металлами, используемыми в антимикробных целях, медь способна быстрее и легче окисляться, переходя в раствор в виде ионов (Ermini ML and Voliani V, 2021). Учитывая тот факт, что биологическая активность ультрадисперсных частиц зависит от соотношения большей площади поверхности к объёму, а также повышенных реакционных свойств, степень токсичности можно контролировать концентрацией активного агента (Vimbela GV et al., 2017; Шошин Д.Е. и др., 2022). Так, в нашем исследовании медь в ультрадисперсной форме проявляла высокую биологическую активность по отношению к биосенсору, осуществляя прогрессирующее ингибирование жизнедеятельности бактерий пропорционально увеличению концентрации.

В частности, высокая концентрация вещества в суспензии от 1 М до 0,1 М приводила к полному ингибированию люминесценции. Это обусловлено особенностями строения и физико-химических свойств частиц (Pohanka M, 2019). Адсорбируясь на поверхности бактериальной клетки, ультрадисперсные части в определённой концентрации приводят к повреждению мембраны, предполагая дальнейшее проникновение внутрь клетки. Исследователи утверждают, что основной токсический эффект ультрадисперсных частиц заключается прежде всего в повреждении клеточной стенки (Babayevska N et al., 2022). Адсорбция частиц приводит к деполяризации клеточной стенки, что делает её более проницаемой. Основу биосенсора составляют грамотрицательные бактерии *Escherichia coli*, покрытые слоем липополисахаридов (толщиной 1-3 мкм) и пептидогликанов (толщиной ~8 нм). Такое строение, в частности отсутствие толстого слоя пептидогликана, способствует проникновению высвобождаемых ионов из ультрадисперсных частиц в клетку (Slavin YN et al., 2017).

Кроме этого, высокая восприимчивость грамотрицательных бактерий к ультрадисперсным частицам заключается в том, что бактерии покрыты молекулами липополисахаридов, несущими отрицательные заряд (Sperandeo P et al., 2019). Отрицательно заряженные молекулы имеют более высокое сродство к положительным ионам, что приводит к накоплению и увеличению поглощения ионов, вызывающих внутриклеточное повреждение. Таким образом, обобщая вышесказанное, предполагаем, пропорционально увеличению концентрации ультрадисперсной меди в растворе происходило высвобождение ионов Cu^{2+} (Salah I et al., 2021). Дальнейший контакт с бактерией посредством электростатических взаимодействий положительно заряженных ионов меди с адсорбцией на отрицательно заряженной поверхности *E. Coli* создавал прочные связи для последующей деформации клеточной стенки (Sperandeo P et al., 2019). В целом увеличивалась проницаемость, и медь легко проникала внутрь клетки. Кроме этого, металл уменьшал разность потенциалов и вызывал деполяризацию. Приближение разности потенциалов к нулю приводит к утечке внутриклеточного содержимого и даже разрыву мембраны с обнаружением клеточных компонентов, что в конечном итоге вызывает гибель клетки (Ma X et al., 2022). Ещё одним возможным механизмом ингибирования свечения под действием меди являлась генерация активных форм кислорода (Xu VW et al., 2022). Медь, выступая в качестве переходного металла, генерирует активные интермедиаты кислорода посредством реакций типа Фентона и реакции Габера-Вейсса. В ходе этих реакций медь принимает и отдаёт электрон во время циклического переключения между степенями окисления Cu^+ и Cu^{2+} , образуя $\text{O}_2 \cdot$ и гидроксил $\text{OH}\cdot$, обладающие высокой реакционной способностью и сильным повреждающим потенциалом, что в конечном итоге приводит к перекисному окислению

липидов, окислению белков и повреждению ДНК (Ma X et al., 2022). При этом, опираясь на ряд других исследований, установлено, что группа белковых кофакторов, в частности железосерные кластеры в металлоферментах, участвующих в синтезе аминокислот с разветвлённой цепью, являются основными мишенями токсичности меди в *E. coli* через Cu – опосредованное замещение Fe (Fu Y et al., 2014).

При рассмотрении комплекса фермент+медь отмечено увеличение интенсивности свечения бактериальных клеток. Медь в ультрадисперсной форме в искомой концентрации не оказывала отрицательного действия на эффективность и биобезопасность ферментного комплекса. Нарушение ферментативной активности бактериальной клетки наносит ущерб живой системе (Brodl E et al., 2018). Основные гены, *luxCDABE*, кодируют все ферменты, участвующие в сложном механизме, обеспечивающем биолюминесценцию. В биолюминесцентных бактериях гетеродимерный фермент люцифераза (*LuxAB*) катализирует моноокисигенирование алифатических альдегидов в соответствующие кислоты с использованием восстановленного мононуклеотида флавина в качестве окислительно-восстановительного кофактора (Brodl E et al., 2018; Tinikul R et al., 2021). Таким образом, субстратом для бактериальной люциферазы выступают длинноцепочечный альдегид, восстановленный флавинонуклеотид и кислород (Tinikul R et al., 2020). Увеличение интенсивности люминесценции свидетельствует о возможном увеличении регенерирующих субстратов для люциферазы (Dunlap P, 2014).

В состав исследуемого ферментного комплекса входили: ЕС 3.2.1.1 – относится к классу гликозидгидролаз (Paul JS et al., 2021), субтилизин, эндо-1,4-бета-ксилаза. В биологических системах медь, являясь неспецифическим ингибитором, может связываться с аминогруппами, органической серой, ненасыщенными или ароматическими веществами. Особенно важен тот факт, что медь может образовывать комплекс с АТФ, в котором ион металла связан как с азотистым основанием, так и с отрицательно заряженным кислородом в фосфатных группах (Saphier M et al., 2021). Данный комплекс способен ингибировать ферментативные системы, зависящие от АТФ. Кроме этого, известно, что медь влияет на дисульфидную связь в белках (Popov S et al., 2020). Вероятно, в нашем исследовании медь взаимодействует с ферментами посредством формирования комплекса с сульфгидрильными группами в аминокислотных остатках, далее дисульфидные мостики дестабилизируются, модифицируя третичную структуру фермента (Fass D and Thorpe C, 2018). Таким образом, часть меди связана с ферментативной структурой, доля оставшейся приводит к генерации активных интермедиатов кислорода, выступающих субстратом для люциферазы, что обуславливает увеличение люминесценции (Tinikul R et al., 2020).

Помимо этого, стоит отметить, что гомеостаз металлов представляет собой тонкий баланс, обеспечивающий, с одной стороны, клетку основными микроэлементами для нормального протекания метаболических процессов и, с другой, ограничивающий количество металла в структурах клетки с целью предотвращения гибели. Гомеостатическая способность к распределению металлов определяется наличием или отсутствием металлотранспортных систем (Rensing C et al., 2018).

Точный механизм, посредством которого наблюдалась биолюминесцентная активность, является лишь гипотезой и нуждается в дальнейшем изучении внутримолекулярного распределения ионов и включения микроэлемента в метаболический аппарат клетки.

Заключение.

В ходе работы выявлено, что интенсивность люминесценции иммобилизованных клеток градуально связана с содержанием исследуемых веществ в суспензиях. В частности, выявлено, что комплекс фермент+медь приводил к максимальной интенсификации свечения, что наглядно демонстрирует высокую биологическую активность данного образца, пик люминесценции соответствует концентрации меди 0,00078 М, фермента – 0,05 %. Вероятно, ферментный комплекс в сочетании с медью влияет на систему генерации свечения бактерий, в частности на регенерирующий субстрат для действия люциферазы, что обуславливает увеличение люминесценции.

Список источников

1. Макаева А.М. Биологическая экспертиза перспективных для использования в животноводстве препаратов ультрадисперсных частиц микроэлементов // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2019. № 2(76). С. 236-239. [Makaeva AM. Biological expert examination of ultrafine particles of microelements that are promising for use in animal husbandry. Izvestia Orenburg State Agrarian University. 2019;2(76):236-239. (In Russ)].
2. Околелова Т.М., Салимов Т.М. Актуальные вопросы кормления сельскохозяйственной птицы: монография. Душанбе: Суфра, 2020. 272 с. [Okolelova TM, Salimov TM. Topical issues of poultry feeding: monograph. Dushanbe: Sufra; 2020:272 p. (In Russ.)].
3. Рязанцева К.В., Нечитайло К.С., Сизова Е.А. Нормирование минерального питания цыплят-бройлеров (обзор) // Животноводство и кормопроизводство. 2021. № 104(1). С. 119-137. [Ryazantseva KV, Nechitailo KS, Sizova EA. Broiler chickens mineral nutrition rationing (review). Animal Husbandry and Fodder Production. 2021;104(1):119-137. (In Russ.)]. doi: 10.33284/2658-3135-104-1-119
4. Сравнительная характеристика токсичности ультрадисперсных частиц меди, цинка и их сплавов в тесте ингибирования бактериальной биолюминесценции / Е.А. Сизова, Е.В. Яушева, К.С. Нечитайло, А.П. Иванищева // Животноводство и кормопроизводство. 2019. № 102(4). С. 10-22. [Sizova EA, Yausheva EV, Nechitailo KS, Ivanishcheva AP. Comparative characteristics of the toxicity of ultrafine particles of copper, zinc and their alloys in the test of inhibition of bacterial bioluminescence. Animal Husbandry and Fodder Production. 2019;102(4):10-22. (In Russ.)]. doi: 10.33284/2658-3135-102-4-10
5. Шошин Д.Е., Сизова Е.А., Камирова А.М. Взаимодействие ультрадисперсных частиц оксида кобальта Co_3O_4 с экстрактом травы душицы *Origanum vulgare* // Животноводство и кормопроизводство. 2022. № 105(4). С. 35-48. [Shoshin DE, Sizova EA, Kamirova AM. Interaction of Co_3O_4 cobalt oxide ultrafine particles with oregano herb extract *Origanum vulgare*. Animal Husbandry and Fodder Production. 2022;105(4):35-48. (In Russ.)]. doi: 10.33284/2658-3135-105-4-35
6. Babayevska N, Przysiecka Ł, Iatsunskiy I, Nowaczyk G, Jarek M, Janiszewska E, Jurga S. ZnO size and shape effect on antibacterial activity and cytotoxicity profile. *Sci Rep.* 2022;12(1):8148. doi: 10.1038/s41598-022-12134-3
7. Brodl E, Winkler A, Macheroux P. Molecular mechanisms of bacterial bioluminescence. *Comput Struct Biotechnol J.* 2018;16(1):551-564. doi: 10.1016/j.csbj.2018.11.003
8. Dunlap P. Biochemistry and genetics of bacterial bioluminescence. In: Thouand G, Marks R, editors. *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology - Volume 1. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology.* Berlin, Heidelberg: Springer. 2014;144:37-64. doi: 10.1007/978-3-662-43385-0_2
9. Ermini ML, Voliani V. Antimicrobial Nano-Agents: The Copper Age. *ACS Nano.* 2021;15(4):6008-6029. doi: 10.1021/acsnano.0c10756
10. Fass D, Thorpe C. Chemistry and enzymology of disulfide cross-linking in proteins. *Chem Rev.* 2018;118(3):1169-1198. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00123
11. Fu Y, Chang FM, Giedroc DP. Copper transport and trafficking at the host-bacterial pathogen interface. *Acc Chem Res.* 2014;47(12):3605-3613. doi: 10.1021/ar500300n
12. Ma X, Zhou S, Xu X, Du Q. Copper-containing nanoparticles: Mechanism of antimicrobial effect and application in dentistry—a narrative review. *Front Surg.* 2022;9:905892. doi: 10.3389/fsurg.2022.905892
13. Muszyński S, Tomaszewska E, Kwiecień M, Dobrowolski P, Tomczyk A. Effect of dietary phytase supplementation on bone and hyaline cartilage development of broilers fed with organically complexed copper in a Cu-deficient diet. *Biol Trace Elem Res.* 2018;182(2):339-353. doi: 10.1007/s12011-017-1092-1
14. Paul JS, Gupta N, Beliya E, Tiwari S, Jadhav SK. Aspects and recent trends in microbial α -Amylase: a review. *Appl Biochem Biotechnol.* 2021;193(8):2649-2698. doi: 10.1007/s12010-021-03546-4
15. Pohanka M. Copper and copper nanoparticles toxicity and their impact on basic functions in the body. *Bratisl Med J.* 2019;120(6):397-409. doi: 10.4149/BLL_2019_065

16. Popov S, Saphier O, Popov M, Marina Shenker M, Entus S, Shotland Y, Saphier M. Factors enhancing the antibacterial effect of monovalent copper ions. *Curr Microbiol.* 2020;77(1):361-368. doi: 10.1007/s00284-019-01794-6
17. Rensing C, Moodley A, Cavaco LM, McDevitt SF. Resistance to metals used in agricultural production. *Microbiol Spectr.* 2018;6(2). doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0025-2017
18. Salah I, Parkin IP, Allan E. Copper as an antimicrobial agent: recent advances. *RSC Adv.* 2021;11(30):18179-18186. doi: 10.1039/d1ra02149d
19. Saphier M, Moshkovich L, Popov S, Shotland Y, Silberstein E, Saphier O. Monovalent copper ions inhibit enzymatic systems. *Research Square.* [Preprint] 2021. doi: 10.21203/rs.3.rs-1153129/v1
20. Slavin YN, Asnis J, Häfeli UO, Bach H. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J Nanobiotechnology.* 2017;15(1):65. doi: 10.1186/s12951-017-0308-z
21. Sperandeo P, Martorana AM, Polissi A. Lipopolysaccharide biosynthesis and transport to the outer membrane of gram-negative bacteria. In: Kuhn A, editor. *Bacterial Cell Walls and Membranes. Subcellular Biochemistry.* Cham: Springer. 2019;92:9-37. doi: 10.1007/978-3-030-18768-2_2
22. Tinikul R, Chunthaboon P, Phonbuppha J, Paladkong T. Bacterial luciferase: Molecular mechanisms and applications. *The Enzymes.* 2020;47:427-455. doi: 10.1016/bs.enz.2020.06.001
23. Tinikul R, Lawan N, Akeratchatapan N, Pimviriyakul P, Chinantuya W, Suadee C, Sucharitakul J, Chenprakhon P, Ballou DP, Entsch B, Chaiyen P. Protonation status and control mechanism of flavin-oxygen intermediates in the reaction of bacterial luciferase. *FEBS J.* 2021;288(10):3246-3260. doi: 10.1111/febs.15653
24. Vimbela GV, Ngo SM, Frazee C, Yang L, Stout DA. Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:3941-3965. doi: 10.2147/IJN.S134526
25. Xu VW, Nizami MZI, Yin IX, Yu OY, Lung CYK, Chu CH. Application of copper nanoparticles in dentistry. *Nanomaterials (Basel).* 2022;12(5):805. doi: 10.3390/nano12050805
26. Zuily L, Lahrach N, Fassler R, Genest O, Faller P, Sénéque O, Denis Y, Castanié-Cornet MP, Genevaux P, Jakob U, Reichmann D, Giudici-Orticoni MT, Ilbert M. Copper induces protein aggregation, a toxic process compensated by molecular chaperones. *mBio.* 2022;13(2):e0325121. doi: 10.1128/mbio.03251-21

References

1. Makaeva AM. Biological expert examination of ultrafine particles of microelements that are promising for use in animal husbandry. *Izvestia Orenburg State Agrarian University.* 2019;2(76):236-239.
2. Okolelova TM, Salimov TM. Topical issues of poultry feeding: monograph. Dushanbe: Sufra; 2020:272 p.
3. Ryazantseva KV, Nechitailo KS, Sizova EA. Broiler chickens mineral nutrition rationing (review). *Animal Husbandry and Fodder Production.* 2021;104(1):119-137. doi: 10.33284/2658-3135-104-1-119
4. Sizova EA, Yausheva EV, Nechitailo KS, Ivanishcheva AP. Comparative characteristics of the toxicity of ultrafine particles of copper, zinc and their alloys in the test of inhibition of bacterial bioluminescence. *Animal Husbandry and Fodder Production.* 2019;102(4):10-22. doi: 10.33284/2658-3135-102-4-10
5. Shoshin DE, Sizova EA, Kamirova AM. Interaction of Co₃O₄ cobalt oxide ultrafine particles with oregano herb extract *Origanum vulgare*. *Animal Husbandry and Fodder Production.* 2022;105(4):35-48. doi: 10.33284/2658-3135-105-4-35
6. Babayevska N, Przysiecka Ł, Iatsunskyi I, Nowaczyk G, Jarek M, Janiszewska E, Jurga S. ZnO size and shape effect on antibacterial activity and cytotoxicity profile. *Sci Rep.* 2022;12(1):8148. doi: 10.1038/s41598-022-12134-3
7. Brodl E, Winkler A, Macheroux P. Molecular mechanisms of bacterial bioluminescence. *Comput Struct Biotechnol J.* 2018;16(1):551-564. doi: 10.1016/j.csbj.2018.11.003

8. Dunlap P. Biochemistry and genetics of bacterial bioluminescence. In: Thouand G, Marks R, editors. *Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology - Volume 1. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer. 2014;144:37-64. doi: 10.1007/978-3-662-43385-0_2
9. Ermini ML, Voliani V. Antimicrobial Nano-Agents: The Copper Age. *ACS Nano*. 2021;15(4):6008-6029. doi: 10.1021/acsnano.0c10756
10. Fass D, Thorpe C. Chemistry and enzymology of disulfide cross-linking in proteins. *Chem Rev*. 2018;118(3):1169-1198. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00123
11. Fu Y, Chang FM, Giedroc DP. Copper transport and trafficking at the host-bacterial pathogen interface. *Acc Chem Res*. 2014;47(12):3605-3613. doi: 10.1021/ar500300n
12. Ma X, Zhou S, Xu X, Du Q. Copper-containing nanoparticles: Mechanism of antimicrobial effect and application in dentistry-a narrative review. *Front Surg*. 2022;9:905892. doi: 10.3389/fsurg.2022.905892
13. Muszyński S, Tomaszewska E, Kwiecień M, Dobrowolski P, Tomczyk A. Effect of dietary phytase supplementation on bone and hyaline cartilage development of broilers fed with organically complexed copper in a cu-deficient diet. *Biol Trace Elem Res*. 2018;182(2):339-353. doi: 10.1007/s12011-017-1092-1
14. Paul JS, Gupta N, Beliya E, Tiwari S, Jadhav SK. Aspects and recent trends in microbial α -Amylase: a review. *Appl Biochem Biotechnol*. 2021;193(8):2649-2698. doi: 10.1007/s12010-021-03546-4
15. Pohanka M. Copper and copper nanoparticles toxicity and their impact on basic functions in the body. *Bratisl Med J*. 2019;120(6):397-409. doi: 10.4149/BLL_2019_065
16. Popov S, Saphier O, Popov M, Marina Shenker M, Entus S, Shotland Y, Saphier M. Factors enhancing the antibacterial effect of monovalent copper ions. *Curr Microbiol*. 2020;77(1):361-368. doi: 10.1007/s00284-019-01794-6
17. Rensing C, Moodley A, Cavaco LM, McDevitt SF. Resistance to metals used in agricultural production. *Microbiol Spectr*. 2018;6(2). doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0025-2017
18. Salah I, Parkin IP, Allan E. Copper as an antimicrobial agent: recent advances. *RSC Adv*. 2021;11(30):18179-18186. doi: 10.1039/d1ra02149d
19. Saphier M, Moshkovich L, Popov S, Shotland Y, Silberstein E, Saphier O. Monovalent copper ions inhibit enzymatic systems. *Research Square*. [Preprint] 2021. doi: 10.21203/rs.3.rs-1153129/v1
20. Slavin YN, Asnis J, Häfeli UO, Bach H. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J Nanobiotechnology*. 2017;15(1):65. doi: 10.1186/s12951-017-0308-z
21. Sperandeo P, Martorana AM, Polissi A. Lipopolysaccharide biosynthesis and transport to the outer membrane of gram-negative bacteria. In: Kuhn A, editor. *Bacterial Cell Walls and Membranes. Subcellular Biochemistry*. Cham: Springer. 2019;92:9-37. doi: 10.1007/978-3-030-18768-2_2
22. Tinikul R, Chunthaboon P, Phonbuppha J, Paladkong T. Bacterial luciferase: Molecular mechanisms and applications. *The Enzymes*. 2020;47:427-455. doi: 10.1016/bs.enz.2020.06.001
23. Tinikul R, Lawan N, Akeratchatapan N, Pimviriyakul P, Chinantuya W, Suadee C, Sucharitakul J, Chenprakhon P, Ballou DP, Entsch B, Chaiyen P. Protonation status and control mechanism of flavin-oxygen intermediates in the reaction of bacterial luciferase. *FEBS J*. 2021;288(10):3246-3260. doi: 10.1111/febs.15653
24. Vimbela GV, Ngo SM, Frazee C, Yang L, Stout DA. Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:3941-3965. doi: 10.2147/IJN.S134526
25. Xu VW, Nizami MZI, Yin IX, Yu OY, Lung CYK, Chu CH. Application of copper nanoparticles in dentistry. *Nanomaterials (Basel)*. 2022;12(5):805. doi: 10.3390/nano12050805
26. Zuily L, Lahrach N, Fassler R, Genest O, Faller P, Sénèque O, Denis Y, Castanié-Cornet MP, Genevaux P, Jakob U, Reichmann D, Giudici-Orticoni MT, Ilbert M. Copper induces protein aggregation, a toxic process compensated by molecular chaperones. *mBio*. 2022;13(2):e0325121. doi: 10.1128/mbio.03251-21

Информация об авторах:

Ксения Сергеевна Нечитайло, научный сотрудник центра «Нанотехнологии в сельском хозяйстве», Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук, 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, д. 29, тел.: 8-905-893-55-99.

Елена Анатольевна Сизова, доктор биологических наук, руководитель центра «Нанотехнологии в сельском хозяйстве», Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук, 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, д. 29; профессор кафедры биологии и почвоведения, Оренбургский государственный университет, 460018, г. Оренбург, просп. Победы, д. 13 тел.: 8-912-344-99-07.

Даниил Евгеньевич Шошин, магистр, лаборант-исследователь центра «Нанотехнологии в сельском хозяйстве», Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук, 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, д. 29, тел.: 8-965-932-53-67.

Information about the authors:

Ksenia S Nechitailo, Researcher at the Centre for Nanotechnologies in Agriculture, Federal Research Centre for Biological Systems and Agricultural Technologies of the Russian Academy of Sciences, 29 9 Yanvaryaya St., Orenburg, 460000, tel.: 8-905-893-55-99.

Elena A Sizova, Dr. Sci. (Biology), Head of the Centre "Nanotechnologies in Agriculture", Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences, 29 9 Yanvaryaya St., Orenburg, 460000; Professor of the Department of Biology and Soil Science, Orenburg State University, 13 Prospect Pobedy, Orenburg, 460018 Russia, tel.: 8-912-344-99-07.

Daniil E Shoshin, Master, Laboratory Researcher of the Centre for Nanotechnologies in Agriculture, Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences, 29 9 Yanvaryaya St., Orenburg, 460000, tel.: 8-965-932-53-67.

Статья поступила в редакцию 16.02.2023; одобрена после рецензирования 22.02.2023; принята к публикации 20.03.2023.

The article was submitted 16.02.2023; approved after reviewing 22.02.2023; accepted for publication 20.03.2023.