

Животноводство и кормопроизводство. 2026. Т. 109. № 3. С. 8-22.
Animal Husbandry and Fodder Production. 2026. Vol. 109. No. 3. P. 8-22.

ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ

Научная статья
УДК 577.17.049:546.47
doi: 10.33284/2658-3135-109-3-8

Биотоксичность ультрадисперсных частиц цинка как фактор, ограничивающий их применение в сельском хозяйстве

Елена Анатольевна Сизова¹, Елена Владимировна Яушева², Даниил Евгеньевич Шошин³,
Ксения Сергеевна Нечитайло⁴

^{1,2,3,4}Оренбургский государственный университет имени В.А. Бондаренко, Оренбург, Россия

¹sizova.178@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5125-5981>

²vasilena56@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1589-2211>

³daniilshoshin@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3086-681X>

⁴k.nechit@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8755-414X>

Аннотация. Активное внедрение ультрадисперсных частиц (УДЧ) металлов в сельскохозяйственную практику, обусловленное их уникальными физико-химическими свойствами, сопровождается нарастающими экологическими рисками, связанными с их биотоксичностью и способностью к биоаккумуляции. Одним из наиболее востребованных элементов в агро сфере является цинк, однако вариабельность биологического ответа тест-объектов в зависимости от размера частиц и их коллоидного поведения остается недостаточно изученной, особенно в субмикронном диапазоне, превышающем наноразмерный. Целью представленной работы стало установление взаимосвязи между гидродинамическим диаметром УДЧ ZnO ($458,41 \pm 0,95$ нм и $153,96 \pm 2,57$ нм) и их токсичностью с использованием двух модельных систем – бактериального штамма *Escherichia coli* K12 TG1 и инфузорий *Stylonychia mytilus*. Полученные результаты демонстрируют выраженную размер-зависимую биотоксичность: частицы с меньшим диаметром (153,9 нм) проявляли более продолжительное ингибирующее действие на бактериальную люминесценцию в широком диапазоне низких концентраций и вызывали более глубокое подавление ферментов антиоксидантной системы (глутатионпероксидазы, каталазы и супероксиддисмутазы) у инфузорий по сравнению с более крупными частицами. В то же время на уровне интегральных показателей выживаемости и содержания нуклеиновых кислот и белка у *S. mytilus* размерный эффект нивелировался, уступая место общему токсическому воздействию. Установлено, что даже в субингибиторных концентрациях УДЧ ZnO вызывают критический окислительный стресс, характеризуемый трехкратным увеличением концентрации глутатиона и почти пятикратным снижением активности ключевых антиоксидантных ферментов, что свидетельствует об истощении защитных механизмов клетки. Таким образом, несмотря на снижение токсичности с увеличением размера частиц, высокий окислительный потенциал УДЧ цинка остается ограничивающим фактором для их широкого применения в сельском хозяйстве, обосновывая необходимость разработки компенсирующих стратегий и регламентов безопасного использования.

Ключевые слова: ультрадисперсные частицы, *Escherichia coli*, *Stylonychia mytilus*, биолюминесценция, окислительный стресс, цинк

Благодарности: работа выполнена при финансовой поддержке гранта на проведение крупных научных проектов по приоритетным направлениям научно-технического развития (№ 075-15-2024-550).

Для цитирования: Биотоксичность ультрадисперсных частиц цинка как фактор, ограничивающий их применение в сельском хозяйстве / Е.А. Сизова, Е.В. Яушева, Д.Е. Шошин, К.С. Нечитайло // Животноводство и кормопроизводство. 2026. Т. 109. № 3. С. 8-22. [Sizova EA, Yausheva EV, Shoshin DE, Nechitailo KS. Biototoxicity of ultrafine zinc particles as a factor limiting their use in agriculture. Animal Husbandry and Fodder Production. 2026;109(3):8-22. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.33284/2658-3135-109-3-8>

PHYSIOLOGY OF ANIMALS

Original article

Biotoxicity of ultrafine zinc particles as a factor limiting their use in agriculture

Elena A Sizova¹, Elena V Yausheva², Daniil E Shoshin³, Ksenia S Nechitailo⁴

^{1,2,3,4}Orenburg State University named after VA Bondarenko, Orenburg, Russia

¹sizova.178@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5125-5981>

²vasilena56@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1589-2211>

³daniilshoshin@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3086-681X>

⁴k.nechit@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8755-414X>

Abstract. The widespread use of ultrafine metal particles (UFP) in agricultural practices, driven by their unique physicochemical properties, is accompanied by increasing environmental risks associated with their biotoxicity and bioaccumulation. Zinc is one of the most in-demand elements in agriculture, but the variability of the biological response of test samples depending on particle size and their colloidal behavior remains poorly understood, particularly in the submicron range, which exceeds the nanoscale. The aim of this study was to establish the relationship between the hydrodynamic diameter of ZnO UFP (458.41 ± 0.95 nm and 153.96 ± 2.57 nm) and their toxicity using two model systems: the bacterial strain *Escherichia coli* K12 TG1 and the ciliate *Stylonychia mytilus*. The results demonstrate pronounced size-dependent biotoxicity: particles with a smaller diameter (153.9 nm) exhibited a more prolonged inhibitory effect on bacterial luminescence over a wide range of low concentrations and caused more profound suppression of antioxidant enzymes (glutathione peroxidase, catalase, and superoxide dismutase) in ciliates compared to larger particles. At the same time, at the level of integrated indicators of survival and nucleic acid and protein content in *S. mytilus*, the size effect was neutralized, giving way to an overall toxic effect. It was found that even at subinhibitory concentrations, ZnO ultrafine particles induce critical oxidative stress, characterized by a threefold increase in glutathione concentration and an almost fivefold decrease in the activity of key antioxidant enzymes, indicating depletion of cellular defense mechanisms. Thus, despite the decrease in toxicity with increasing particle size, the high oxidative potential of zinc UFP remains a limiting factor for their widespread use in agriculture, justifying the need to develop compensatory strategies and regulations for safe use.

Keywords: ultrafine particles, *Escherichia coli*, *Stylonychia mytilus*, bioluminescence, oxidative stress, zinc

Acknowledgments: the research was carried out with the support of a grant for major scientific projects in priority areas of scientific and technological development (No. 075-15-2024-550).

For citation: Sizova EA, Yausheva EV, Shoshin DE, Nechitailo KS. Biotoxicity of ultrafine zinc particles as a factor limiting their use in agriculture. Animal Husbandry and Fodder Production. 2026;109(3):8-22. (In Russ.). <https://doi.org/10.33284/2658-3135-109-3-8>

Введение.

Одними из наиболее часто используемых УДЧ металлов в сельском хозяйстве являются препараты цинка. УДЧ цинка применяются в агрономии в составе удобрений для повышения устойчивости к заболеваниям, повышения урожайности и усвоения питательных веществ (Kumar S et al., 2025). В то же время показана перспектива использования УДЧ цинка в животноводстве в качестве биологически активных веществ, повышающих эффективность использования корма, альтернативы антибиотикам и источника микроэлементов для улучшения показателей продуктивности (Fatima A et al., 2024; Zarghami A et al., 2025).

Несмотря на это, ограничивающим фактором широкого применения УДЧ цинка в сельском хозяйстве являются многочисленные исследования, показывающие их высокую биотоксичность (Muzammil S et al., 2023). Описано генотоксическое действие и развитие окислительного стресса

при контакте ультрадисперсных частиц цинка с клетками бактерий, которое приводило к развитию бактерицидного эффект (Gharpure S and Ankamwar B, 2020). Это вызывает опасения, так как активное использование ультрадисперсных частиц цинка приводит к неизбежному их попаданию в окружающую среду и воздействию на биоту (Islam S, 2025).

Неоднозначность исследований в отношении биотоксичности ультрадисперсных частиц цинка и их применения в сельском хозяйстве обусловлена изменчивостью биологического ответа живых организмов в зависимости от физико-химических характеристик частиц и их концентрации. Среди факторов, определяющих токсичность ультрадисперсных частиц металлов в качестве наиболее значимых выделяют их размер и концентрацию (Lin X et al., 2014; Garncarek-Musiał M, 2024). Показана зависимость токсического воздействия ультрадисперсных частиц цинка в зависимости от их размера как для прокариотических, так и для эукариотических клеток (Nair S et al., 2009). Однако большинство исследований сосредоточено на ультрадисперсных частицах с размером менее 100 нм. Тем не менее, попадая в окружающую среду, ультрадисперсные частицы металлов вступают в физико-химические взаимодействия, такие как агломерация и адсорбция (Lavagna E et al., 2020). Процесс агломерации приводит к формированию частиц более крупного размера, бионакоплению в экосистеме и изменению их биотоксичности (Dai H et al., 2020). Существует ограниченное количество исследований, отражающих уровень токсичности ультрадисперсных частиц металлов, в частности цинка, для более крупных частиц, превышающих наноразмерный диапазон (Li J et al., 2017; Kang M et al., 2024).

Цель исследования.

Определение взаимосвязи между гидродинамическим диаметром и токсичностью ультрадисперсных частиц цинка с использованием *Escherichia coli* и *Styloynchia mytilus* в качестве модельных тест-организмов.

Материалы и методы исследований.

Объект исследования. Ультрадисперсные частицы ZnO с различным гидродинамическим диаметром ($458,41 \pm 0,95$ нм и $153,96 \pm 2,57$ нм).

Обслуживание животных и экспериментальные исследования были выполнены в соответствии с Модельным законом Межпарламентской Ассамблеи государств - участников Содружества Независимых Государств «Об обращении с животными», статья 20 (постановление 29 Межпарламентской Ассамблеи государств-участников СНГ N 29-17 от 31 октября 2007 года). Методика проведения исследований одобрена этическим комитетом ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет» (Протокол № 2 от 10.03.2024).

Схема эксперимента. Исследование проведено на базе Научно-образовательного центра «Биологические системы и нанотехнологии» Оренбургского государственного университета имени В.А. Бондаренко в 2025 г. В исследовании были использованы УДЧ цинка различного гидродинамического диаметра (табл. 1).

Таблица 1. Гидродинамический диаметр и ζ -потенциал ультрадисперсных частиц оксида цинка

Table 1. Hydrodynamic diameter and ζ -potential of ultrafine zinc oxide particles

УДЧ / UFP	Гидродинамический диаметр, нм / <i>Hydrodynamic diameter, nm</i>	ζ -потенциал, мВ / <i>ζ-potential, mV</i>
ZnO_1	$458,41 \pm 0,95$	$3,89 \pm 0,33$
ZnO_2	$153,96 \pm 2,57$	$11,03 \pm 0,77$

УДЧ цинка были получены в лаборатории синтеза наноструктур Оренбургского государственного университета имени В.А. Бондаренко. Пробоподготовка суспензий УДЧ цинка включала

ультразвуковую обработку (время – 35 мин, частота – 35 кГц) в УЗВ «Сапфир» 4.0 (Россия). Определение гидродинамического диаметра и ζ -потенциала проводили методом динамического рассеяния света (DLS) на лазерном анализаторе Microtrac NANOTRAC WAVE II (ООО «Микротрак», Россия).

В качестве модельных микроорганизмов выступали конститутивно люминесцирующий бактериальный штамм *Escherichia coli* K12 TG1 (коммерческое название «Эколюм», «НВО ИММУНОТЕХ», Россия) и инфузории *Stylonychia mytilus* («Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», г. Москва).

Общая биотоксичность. Для оценки общей биотоксичности в 96-луночных культуральных планшетах готовили серии двукратных разведений имеющихся частиц в концентрациях от 100 до $1,19 \times 10^{-5}$ мг/мл объемом по 100 мкл. После чего к ним вносили идентичное количество суспензии конститутивно люминесцирующего бактериального штамма *Escherichia coli* K12 TG1. Фиксацию интенсивности свечения осуществляли на многофункциональном микропланшетном ридере TECAN Infinite F200 (Tecan Austria GmbH, Австрия) в относительных приборных единицах (RLU) в течение 3-х часов с периодичностью 5 минут. Нормализованное относительное значение биолюминесценции определяли по формуле:

$$I = \frac{Ik_0 \times Io_n}{Ik_n \times Io_0} \times 100 \%,$$

где Ik_0 – светимость контрольной пробы на 0-й минуте;
 Io_n – светимость опытной пробы на n-й минуте;
 Ik_n – светимость контрольной пробы на n-й минуте;
 Io_0 – светимость опытной пробы на 0-й минуте.

В результате устанавливали эффективные концентрации (ЕС), подавляющие 80 %, 50 % и 20 % интенсивности свечения, приравниваемые соответственно к токсичным, условно токсичным и субингибиторным дозам. В некоторых случаях также выводили стимулирующие концентрации по эффекту гормезиса или иным механизмам.

Общую биотоксичность в отношении инфузорий оценивали по ГОСТ 31674-2012. Для оценки выживаемости использовали концентрации УДЧ, соответствующие показателям ЕС₈₀, ЕС₅₀ и ЕС₂₀, установленным в методе ингибирования бактериальной люминесценции, либо же занимающие диапазон между последней ингибирующей и нетоксичной дозой.

Концентрация белка и нуклеиновых кислот, активность антиоксидантной системы. Определение концентрации белка и нуклеиновых кислот, а также оценку активности антиоксидантной системы проводили на модели *Stylonychia mytilus* при концентрациях УДЧ, соответствующих показателю ЕС₂₀.

Суммарное содержание нуклеиновых кислот в культуре *Stylonychia mytilus* определяли по методу Спирина (ОФС.1.7.2.0018.15) путем экстракции суммы РНК и ДНК горячей хлорной кислотой при нагревании с последующим фотометрированием ($\lambda=270$ и 290 нм). Концентрацию белка устанавливали с помощью биуретовой реакции по калибровочному графику. Для построения последнего и анализа проб заранее готовили реактив Бенедикта, стандартные пробы с различным содержанием сывороточного альбумина (0,1; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2 мг) и 10 % раствор NaOH. Калибровочный график строили путем фотометрирования прореагировавших стандартных проб. Для этого к белку добавляли дистиллированной воды (дН₂O) до 2 мл, 2 мл 10 % раствора NaOH и раствор Бенедикта (0,2 мл), после чего содержимое пробирок перемешивали и выдерживали 15 мин при +22 °С. Далее замеряли оптическую плотность при $\lambda=330$ нм (СФ 2000, ОКБ «Спектр», Россия) против контрольного раствора (2 мл дН₂O; 2,0 мл р-р NaOH; 0,2 мл р-р Бенедикта). В опытных образцах вместо альбумина использовали гомогенат культуры инфузорий в количестве 0,5 мл.

Концентрацию восстановленного глутатиона и активность глутатионпероксидазы определяли с помощью реактива Элмана (5,5'-дитиобис-2-нитробензойная кислота) по методикам, по-

дробно описанным в работах (Sattar AA et al., 2024; Ayeleso TB et al., 2018). Для этого анализа культуру инфузорий гомогенизировали в холодном 0,25 М трис-НСl-буфере при pH 7,4 в соотношении 1:1. Для осаждения белка в приготовленный гомогенат добавляли 0,3 мл 10 % раствора ТХУ, пробы тщательно перемешивали и центрифугировали 10 мин при 3000 об./мин (Центрифуга СМ-12, ИК «Техно-Ком», Россия), при тестировании использовали супернатант.

Метод определения общей активности каталазы был основан на измерении концентрации неразложившегося H_2O_2 после инкубации его с гомогенизированной в 1 мл трис-НСl (разведение 1:1) культурой инфузорий при последующей спектрофотометрической регистрации окрашенного продукта реакции H_2O_2 с молибдатом аммония (Hadwan MH and Abed HN, 2016). Общую активность супероксиддисмутазы устанавливали по степени торможения ферментом реакции аутоокисления кверцетина (3,5,7,3',4'-пентагидрооксифлавонол) (Костюк В.А. и др., 1990). Для последнего метода культуру инфузорий гомогенизировали в холодном 0,025 М трис-НСl буфере (pH 7,4) на льду с разведением 1:1 (0,5 мл культуры и 0,5 мл 0,025 М трис-НСl). Гомогенат центрифугировали 30 минут 3000 об./мин (Центрифуга СМ-12, ИК «Техно-Ком», Россия). Супернатант использовали в дальнейшем.

Оборудование и технические средства. Исследования выполнены с использованием приборной базы научно-образовательного центра «Биологические системы и нанотехнологии» Оренбургский государственный университет имени В.А. Бондаренко. Многофункциональный микропланшетный ридер TECAN Infinite F200 («Tecan Austria GmbH», Австрия), баня водяная LOIP LB-160 (АО «Лабораторное Оборудование и Приборы»), весы лабораторные ВЛА (ООО «НПП «Госметр», г. Санкт-Петербург), УЗВ «Сапфир» 4.0 (Россия), лазерный анализатор размеров Microtrac NANOTRAC WAVE II (ООО «Микротрак», Россия), Центрифуга СМ-12 (ИК «Техно-Ком», Россия).

Статистическая обработка. Экспериментальные данные обрабатывали с помощью офисного программного комплекса «Microsoft Office» («Microsoft», США) с применением «Excel» («Microsoft», США) с обработкой данных в «Statistica 10.0» («StatSoft Inc.», США). Рассчитывали среднее (M), среднеквадратичное отклонение ($\pm\sigma$), стандартную ошибку ($\pm SE$). Для сравнения вариантов использовали непараметрический метод анализа (U-критерий Манна-Уитни). Различия считали статистически значимыми при * – $P \leq 0,05$, ** – $P \leq 0,01$; *** – $P \leq 0,001$.

Результаты исследования.

В ходе анализа образца УДЧ ZnO_1 было выявлено, что в концентрации $4,88 \times 10^{-2}$ мг/мл относительное значение биолюминесценции составило 1,3 % через 30 мин контакта, что соответствует тушению биосенсора на 98,7 % (табл. 2). Дальнейшая экспозиция привела к снижению до диапазона 0,3-0,5 % через 180 мин контакта, что являлось признаком необратимого подавления метаболической активности и, вероятно, гибели клеток.

При разведении в 2 и 4 раза ($2,44 \times 10^{-2}$ и $1,22 \times 10^{-2}$ мг/мл) тушение на 30 мин достигало 98,1 % и 96,3 % и к 90 мин – более 99 %, что указывало на высокую скорость развития токсического эффекта. В диапазоне $6,1 \times 10^{-3}$ - $3,05 \times 10^{-3}$ мг/мл наблюдалось аналогичное ингибирование: на 30 мин – тушение на 81,2-90,8 %, однако к 180 мин эффект усиливался – 97,3-99,1 %. Критически важно отметить, что в концентрациях $4,88 \times 10^{-2}$ - $1,52 \times 10^{-3}$ относительное значение биолюминесценции не восстанавливалось до уровня 80 % и выше. Относительное значение биолюминесценции при концентрации образца УДЧ ZnO_1 $3,81 \times 10^{-4}$ мг/мл снижалось от 113,7 % (экспозиция – 30 мин) до 78,6 % (экспозиция – 180 мин, тушение – на 21,4%). При концентрации $1,91 \times 10^{-4}$ мг/мл наблюдалась стабильная стимуляция метаболической активности: значения находились в пределах 94,3-128,0 %. Возможно, подобный эффект развивается вследствие временного усиления антиоксидантных систем или адаптивного ответа на низкий уровень стресса. При концентрации $9,54 \times 10^{-5}$ мг/мл и ниже значения находились в пределах 113,7-144,9 %, что указывало на выраженную стимуляцию метаболической активности клетки.

Таблица 2. Нормализованное значение относительной биолуминесценции *Escherichia coli* K12 TG1 в среде с различным содержанием УДЧ ZnO_1Table 2. Normalized value of relative bioluminescence of *Escherichia coli* K12 TG1 in a medium with different content of UFP ZnO_1

Время, мин/ Time, min	Концентрация, мг/мл / Concentration, mg/ml											
	4,8× 10 ⁻²	2,4× 10 ⁻²	1,2× 10 ⁻²	6,1× 10 ⁻³	3,1× 10 ⁻³	1,5× 10 ⁻³	7,6× 10 ⁻⁴	3,8× 10 ⁻⁴	1,9× 10 ⁻⁴	9,5× 10 ⁻⁵	4,7× 10 ⁻⁵	2,3× 10 ⁻⁵
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
30	1,3	1,9	3,7	9,2	18,8	51,1	89,5	113,7	125,0	131,3	134,2	137,9
60	0,3	0,3	0,3	1,7	5,9	27,0	72,9	115,1	128,0	136,1	141,4	144,8
90	0,3	0,2	0,1	0,3	1,9	15,6	57,7	103,1	115,5	126,7	135,5	144,9
120	0,3	0,3	0,2	0,1	0,7	10,1	47,6	92,6	104,7	118,1	127,6	138,7
150	0,4	0,3	0,2	0,1	0,4	6,7	40,1	83,9	97,3	113,7	124,2	136,1
180	0,5	0,3	0,2	0,1	0,3	4,2	33,0	78,6	94,3	113,8	123,9	137,3
Среднее / Average	0,5	0,5	0,7	1,9	4,7	19,1	56,8	97,8	110,8	123,3	131,1	139,9

Примечание: Числовые значения соответствуют величине нормализованного относительного значения биолуминесценции A (%), а именно показателям Tox, EC₈₀, EC₅₀, EC₂₀, NTOX, NTOX⁺, NTOX²⁺ то есть концентрациям УДЧ, вызывающим свыше 95, 80, 50 и 20 % тушения биосенсора, а также нетоксичным по сравнению с контролем и индуцирующим свечение более чем на 5 и 25 %.

Note: The numerical values correspond to the value of the normalized relative bioluminescence value A (%), namely the indicators Tox, EC₈₀, EC₅₀, EC₂₀, NTOX, NTOX⁺, NTOX²⁺, that is, the concentrations of UFP that cause over 95, 80, 50 and 20% quenching of the biosensor, as well as non-toxic compared to the control and inducing luminescence by more than 5 and 25%.

В ходе анализа образца УДЧ ZnO_2 было выявлено, что при концентрациях выше 6,10×10⁻³ мг/мл уже через 30 минут экспозиции биолуминесценция подавлялась на 97,6-99,7 %, что свидетельствовало о необратимом ингибировании метаболической активности и, вероятно, гибели клеток (табл. 3).

Таблица 3. Нормализованное значение относительной биолуминесценции *Escherichia coli* K12 TG1 в среде с различным содержанием УДЧ ZnO_2Table 3. Normalized value of relative bioluminescence of *Escherichia coli* K12 TG1 in a medium with different content of UFP ZnO_2

Время, мин/ Time, min	Концентрация, мг/мл / Concentration, mg/ml											
	4,8× 10 ⁻²	2,4× 10 ⁻²	4,8× 10 ⁻²	6,1× 10 ⁻³	4,8× 10 ⁻²	1,5× 10 ⁻³	4,8× 10 ⁻²	3,8× 10 ⁻⁴	4,8× 10 ⁻²	9,5× 10 ⁻⁵	4,8× 10 ⁻²	2,3× 10 ⁻⁵
	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
30	0,3	0,3	0,7	2,4	8,1	26,3	57,0	74,4	94,9	98,1	98,6	99,6
60	0,2	0,2	0,1	0,3	1,8	9,8	43,2	68,6	92,7	100,1	96,3	100,1
90	0,1	0,1	0,1	0,1	0,5	5,3	34,7	63,5	87,4	94,9	90,2	96,3
120	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	3,2	30,4	59,4	81,0	87,3	83,6	90,7
150	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	2,0	27,0	55,7	74,9	81,4	77,5	84,9
180	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	1,6	26,4	53,2	71,5	78,2	74,3	83,0
Среднее / Average	0,2	0,2	0,2	0,5	1,8	8,0	36,5	62,4	83,7	90,0	86,8	92,4

Примечание: Числовые значения соответствуют величине нормализованного относительного значения биолуминесценции A (%), а именно показателям Tox, EC₈₀, EC₅₀, EC₂₀, NTOX, NTOX⁺, NTOX²⁺ то есть концентрациям УДЧ, вызывающим свыше 95, 80, 50 и 20 % тушения биосенсора, а также нетоксичным по сравнению с контролем.

Note: The numerical values correspond to the value of the normalized relative bioluminescence value A (%), namely the indicators Tox, EC₈₀, EC₅₀, EC₂₀, NTOX, NTOX⁺, NTOX²⁺, that is, the concentrations of UFP that cause over 95, 80, 50 and 20% quenching of the biosensor, as well as non-toxic compared to the control.

Концентрация $7,63 \times 10^{-4}$ мг/мл являлась пороговой, спустя 180 минут контакта тушение достигало 73,6 %. В диапазоне $1,91 \times 10^{-4}$ – $2,38 \times 10^{-5}$ мг/мл наблюдалось умеренное, но стойкое ингибирование: средние значения при полной экспозиции составили 83,7–92,4 %, а минимальные к 180 мин 71,5–83,0 %. При самой низкой протестированной концентрации $2,38 \times 10^{-5}$ мг/мл в первые 30–60 мин экспозиции отмечалась кратковременная стимуляция до 99,6–100,1 %, однако затем метаболическая активность неуклонно снижалась до 83,0 % к 180 минуте. Это подтверждало персистентный характер токсического действия. Образец ZnO_2 не обеспечивал полного сохранения метаболической функции сенсорного штамма, и ответ биосенсора оставался угнетенным на протяжении всего эксперимента.

В тестировании на инфузориях *Stylonychia mytilus* все образцы ультрадисперсных частиц были испытаны в трех фиксированных условных концентрациях, идентичных ранее установленным бактериальным значениям EC₈₀, EC₅₀ и EC₂₀ (т. е. концентрациям, которые на *E. coli* вызывали 80 %, 50 % и 20 % ингибирование биолюминесценции). Такой дизайн позволил непосредственно сравнить реакцию прокариотической и эукариотической тест-систем на идентичные дозы исследуемых образцов.

При концентрациях, соответствующих бактериальной EC₈₀, УДЧ ZnO_2 и УДЧ ZnO_1 вызывали 100 % гибель инфузорий (табл. 4). УДЧ ZnO (оба образца) вызывали полное подавление жизнеспособности, что свидетельствовало о необратимом повреждении клеточных структур.

Таблица 4. **Выживаемость инфузорий в среде с различным содержанием УДЧ, %**
Table 4. **Survival of ciliates in a medium with different UFP content, %**

УДЧ / UFP	Условные концентрации / Conditional concentrations		
	EC ₈₀	EC ₅₀	EC ₂₀
ZnO_1	0,00±0,00	15,85±4,72	39,01±2,23
ZnO_2	0,00±0,00	18,08±4,52	36,76±3,75

Примечание: Концентрации исследуемых УДЧ: ZnO_1 (EC₈₀) – $1,5 \times 10^{-3}$ мг/мл, ZnO_1 (EC₅₀) – $7,6 \times 10^{-4}$ мг/мл, ZnO_1 (EC₂₀) – $3,8 \times 10^{-4}$ мг/мл; ZnO_2 (EC₈₀) – $1,5 \times 10^{-3}$ мг/мл, ZnO_2 (EC₅₀) – $7,6 \times 10^{-4}$ мг/мл, ZnO_2 (EC₂₀) – $4,7 \times 10^{-5}$ мг/мл

Note: Concentrations of the studied ultrafine particles: ZnO_1 (EC₈₀) – 1.5×10^{-3} mg/ml, ZnO_1 (EC₅₀) – 7.6×10^{-4} mg/ml, ZnO_1 (EC₂₀) – 3.8×10^{-4} mg/ml; ZnO_2 (EC₈₀) – 1.5×10^{-3} mg/ml, ZnO_2 (EC₅₀) – 7.6×10^{-4} mg/ml, ZnO_2 (EC₂₀) – 4.7×10^{-5} mg/ml

При концентрации, соответствующей бактериальной EC₅₀, была выявлена градиентная зависимость, отражающая внутрирядовые различия. Так воздействие УДЧ ZnO_2 сопровождалось гибелью 81,92 % клеток простейших, при этом выживаемость составила $18,08 \pm 4,52$ %; УДЧ ZnO_1 – гибель 84,15 %, выживаемость $15,85 \pm 4,72$ %. При концентрации, соответствующей бактериальной EC₂₀ (самая низкая из испытанных), выживаемость инфузорий при воздействии УДЧ ZnO_1 и УДЧ ZnO_2 была схожей по числовым значениям и составила менее 40 %.

В ходе эксперимента была определена концентрация нуклеиновых кислот и белка в клетках инфузорий *S. mytilus* после экспозиции с исследуемыми образцами ультрадисперсных частиц ZnO. Контрольная группа (без УДЧ) показала концентрацию нуклеиновых кислот равную $2,91 \pm 0,06$ мкг/мл, при концентрации белка $0,753 \pm 0,02$ мг/мл. Эти значения были приняты за 100 % и служили референсом для расчета динамики от контроля (табл. 5).

Оценка концентрации нуклеиновых кислот после воздействия УДЧ ZnO_1 и УДЧ ZnO_2 показала, что опытные значения были ниже контрольных на 70,8 и 72,7 % соответственно. Определение концентрации общего белка в клетках инфузорий *Stylonychia mytilus* после экспозиции с исследуемыми образцами выявило снижение на 60,00 % и 66,56 % при воздействии УДЧ ZnO_1 и УДЧ ZnO_2 соответственно.

Таблица 5. Динамика содержания нуклеиновых кислот и белка после 24-часового воздействия УДЧ в субингибиторных дозировках

Table 5. Dynamics of nucleic acid and protein content after 24-hour exposure to UFP in subinhibitory doses

УДЧ / UFP	Концентрация нуклеиновых кислот, мкг/мл / Concentration of nucleic acids, $\mu\text{g/ml}$	Концентрация белка, мг/мл / Protein concentration, mg/ml
ZnO_1	0,79 $\pm$ 0,12***	0,301 $\pm$ 0,016***
ZnO_2	0,85 $\pm$ 0,06***	0,252 $\pm$ 0,018***
Контроль / Control	2,91 $\pm$ 0,06	0,753 $\pm$ 0,02

Примечание: *** – $P \leq 0,001$ Note: *** – $P \leq 0.001$

Измерение двух ключевых маркеров окислительного стресса – уровня восстановленного глутатиона (GSH) и активности глутатионпероксидазы (GPx) в инфузориях дало наиболее точную и биохимически обоснованную картину действия исследуемых образцов УДЧ (табл. 6).

Таблица 6. Динамика компонентов глутатионовой стресс-системы

Table 6. Dynamics of components of the glutathione stress system

УДЧ / UFP	Концентрация восстановленного глутатиона, мкмоль/мл культуры / Concentration of reduced glutathione, $\mu\text{mol/ml}$ culture	Активность глутатионпероксидазы, нмоль GSH/мин $\times$ мл культуры / Glutathione peroxidase activity, nmol GSH/min $\times$ ml culture
ZnO_1	0,318 $\pm$ 0,005***	2,708 $\pm$ 0,189***
ZnO_2	0,331 $\pm$ 0,007***	1,581 $\pm$ 0,365*
Контроль / Control	0,168 $\pm$ 0,007	13,173 $\pm$ 1,07

Примечание: * – $P \leq 0,05$; *** – $P \leq 0,001$ Note: * – $P \leq 0.05$; *** – $P \leq 0.001$

Исследование концентрации GSH в контрольной группе показало уровень 0,168 $\pm$ 0,007 мкмоль/мл культуры. Наибольшее снижение зафиксировали у УДЧ ZnO_2 – до 0,331 $\pm$ 0,007 мкмоль/мл (снижение на 91,21 %). В результате воздействия УДЧ ZnO_1 снижение составило 80,05 % (до 0,318 $\pm$ 0,005 мкмоль/мл).

Аналогично, образец УДЧ ZnO_2 вызвал наиболее сильное подавление активности GPx – снижение до 1,581 $\pm$ 0,365 нмоль/мин $\times$ мл (-88 % от контроля). УДЧ ZnO_1 показал менее выраженное влияние на активность GPx в сравнении с УДЧ ZnO_2. Однако, в сравнении с контролем, УДЧ ZnO_1 оказывали чрезвычайно сильный эффект и снижали активность GPx до 2,708 $\pm$ 0,189 нмоль/мин $\times$ мл (-79 %).

Оценка активности супероксиддисмутазы (SOD, % торможения самопроизвольного окисления кверцетина) и каталазы (CAT, мкмоль/мин $\times$ мл культуры) в клетках инфузорий *Stylonychia mytilus* показала в контрольной группе следующие значения: уровень SOD был равен 19,74 $\pm$ 2,519 %, а активность CAT составила 10,865 $\pm$ 0,913 мкмоль/мин $\times$ мл (табл. 7). Все исследованные УДЧ вызвали достоверное изменение активности ферментов, что свидетельствует о развитии окислительного стресса различной степени или активации антиоксидантной защиты. Наибольшее снижение зафиксировано у УДЧ ZnO_2 – SOD 3,144 $\pm$ 0,186 %, CAT 1,649 $\pm$ 0,125 мкмоль/мин $\times$ мл. При использовании образцов УДЧ ZnO_1 наблюдалось снижение SOD до 3,554 $\pm$ 0,516 %, а CAT – до 2,333 $\pm$ 0,131 мкмоль/мин $\times$ мл.

Таблица 7. Динамика активности компонентов антиоксидантной системы
Table 7. Dynamics of activity of antioxidant system components

УДЧ / UFP	Активность супероксиддисмутазы, % торможения самопроизвольного окисления кверцетина / <i>Superoxide dismutase activity, % inhibition of spontaneous oxidation of quercetin</i>	Активность каталазы, мкмоль/мин×мл культуры / <i>Catalase activity, μmol/min×ml culture</i>
ZnO_1	3,554±0,516**	2,333±0,131***
ZnO_2	3,144±0,186**	1,649±0,125***
Контроль / Control	19,74±2,519	10,865±0,913

Примечание: ** – $P \leq 0,01$; *** – $P \leq 0,001$

Note: ** – $P \leq 0.01$; *** – $P \leq 0.001$

Обсуждение полученных результатов.

Распространение применения УДЧ ZnO в наноразмерной форме в различных областях сельского хозяйства сопряжено с рядом экологических рисков из-за высокой биотоксичности и потенциала накопления УДЧ в окружающей среде. Это показывает необходимость тщательной оценки последствий воздействия УДЧ ZnO на объекты экосистемы.

Учитывая, что попадая в почвенную и водную экосистемы микроорганизмы являются первой ступенью взаимодействия с токсикантами, в нашем исследовании в качестве тест-объектов были использованы *Escherichia coli* K12 TG1 и *Styloynchia mytilus*, являющиеся универсальными тест-организмами для биотестирования, позволяющими оценить как степень токсичности, так и непосредственно механизм биологического действия (Косян Д.Б. и др., 2017).

Однако в рамках оценки токсического потенциала УДЧ металлов для окружающей среды необходимо учитывать их коллоидное поведение при попадании в экосистему, в частности склонность к агломерации, которая модифицирует как гидродинамический радиус, увеличивая его, так и поверхностную реакционную способность. В ряде исследований показана непосредственная зависимость степени токсичности УДЧ металлов от их гидродинамического диаметра.

Проведенные нами исследования с использованием УДЧ оксида цинка показали размерно-зависимую биотоксичность, что наиболее выражено просматривалось в тесте ингибирования биолюминесценции *Escherichia coli* K12 TG1 и при оценке показателей окислительного стресса в эксперименте на *Styloynchia mytilus*.

В тесте ингибирования бактериальной биолюминесценции концентрации EC₈₀ и EC₅₀ для обоих тестируемых образцов УДЧ оксида цинка были идентичными. Несмотря на это, субингибирующее воздействие УДЧ ZnO_2 сохранялось в более широком диапазоне и более низких концентрациях в сравнении с УДЧ ZnO_1.

Предполагаем, что длительное субхроническое воздействие УДЧ ZnO_2 связано, во-первых, с их более высокой проникающей способностью в клетку, обусловленную размером (153,9 нм), что позволяет оказывать прямое воздействие на внутриклеточные структуры. В исследованиях показана непосредственная взаимосвязь размера частиц с их способностью проникать в клетку. Отмечается, что проникающая способность частиц различной природы, в том числе УДЧ металлов, через поверхностные структуры бактериальных клеток и образуемые ими биопленки ограничена размером 350 нм (Dong X et al., 2020; Makabenta JMV et al., 2021). В исследовании на *Escherichia coli* показано, что УДЧ пластика с размером около 100-200 нм способны встраиваться в клеточную оболочку, тогда как частицы с меньшим диаметром легко проникают через клеточную мембрану (Dai S et al., 2022). Вероятно УДЧ ZnO_1, имеющие значительно больший размер имели диффузное ограничение на проникновение в клетку и степень воздействия на внутриклеточные структуры.

Во-вторых, большая токсичность УДЧ ZnO₂ могла быть обусловлена значением их ζ -потенциала. Высокий положительный заряд способствовал более эффективной адсорбции частиц на отрицательно заряженной поверхности *E. coli*, влияя на их локальную концентрацию и скорость высвобождения ионов Zn^{2+} (Fröhlich E, 2012). В свою очередь, значительно меньший ζ -потенциал УДЧ ZnO₁ вероятно способствовал менее эффективной адсорбции на поверхности клеток бактерий.

Тем не менее в нашем исследовании в тесте на выживаемость инфузорий в среде с УДЧ оксида цинка разного диаметра достоверных различий между анализируемыми образцами выявлено не было. Аналогично оценка уровня метаболитных пулов (концентрации нуклеиновых кислот и белка) не показала достоверных различий по влиянию тестируемых образцов УДЧ оксида цинка. Отсутствие выраженных различий по влиянию УДЧ ZnO₁ и УДЧ ZnO₂ на выживаемость инфузорий, а также концентрации нуклеиновых кислот и белка может быть объяснена широким размерным диапазоном частиц подверженных фагоцитозу простейшими, в сравнении с таковыми у бактерий. Способность к активному фагоцитозу для простейших, в частности инфузорий, находится в диапазоне 300-1000 нм, тогда как более мелкие частицы помимо поглощения путем захвата, способны проникать и напрямую через поверхностные клеточные структуры (Fenchel T, 1980). Это могло нивелировать выраженность степени воздействия УДЧ оксида цинка разного размера. В то же время была отмечена тенденция более выраженного воздействия УДЧ ZnO₂ на концентрацию белка, а в случае с УДЧ ZnO₁ – на уровень нуклеиновых кислот. Вероятно, это обусловлено тем, что метаболическая система является первым барьером для взаимодействия с высвобождающимися ионами цинка, а УДЧ ZnO₂, обладая меньшим размером и более высоким дзета-потенциалом, характеризуются большей реакционной способностью (Калашников С.В. и Моисеев М.А., 2014). В свою очередь более медленный фагоцитоз более крупных частиц УДЧ ZnO₁ и более низкая скорость высвобождения ионов в сравнении с УДЧ ZnO₂, вызывали развитие окислительного стресса, приводившего к повреждению структуры ДНК и нарушению работы системы синтеза и репарации, а не прямого воздействия на белки (Singh R et al., 2020).

Анализ показателей окислительного стресса также показал, что степень изменения концентрации глутатиона и активности ферментов антиоксидантной системы взаимосвязана с размером используемых УДЧ оксида цинка. Было выявлено более выраженное снижение активности глутатион пероксидазы и каталазы при воздействии УДЧ ZnO₂, имеющих гидродинамический диаметр практически в 2 раза меньше, чем у УДЧ ZnO₁. Малый гидродинамический диаметр (153 нм) и выраженный положительный заряд (+11,03 мВ), вероятно, обеспечивали эффективный фагоцитоз и быстрое внутриклеточное высвобождение Zn^{2+} , что приводило к активной генерации гидроксильных радикалов.

Однако необходимо отметить, что значительное изменение уровня метаболитов антиоксидантной системы в клетках инфузорий было выявлено не зависимо от размера используемых УДЧ оксида цинка. Наблюдалось развитие ярко выраженного окислительного стресса, истощение и функциональный блок антиоксидантной системы (Wang X et al., 2021). Увеличение концентрации глутатиона практически в 3 раза указывало на критический уровень окислительного стресса в клетке. На этом фоне противоречивое снижение активности глутатионпероксидазы свидетельствовало о вероятной инактивации фермента. Отмечается, что избыточное накопление ионов цинка может приводить к подавлению активности уже сформированного фермента, а также влиять на транскрипцию генов, ответственных за синтез глутатионпероксидазы. Поэтому увеличение глутатиона в клетке могло способствовать истощению имеющихся запасов глутатионпероксидазы, а скорость синтеза новых ферментов была недостаточной для пополнения запасов. Это классическая картина тотального окислительного коллапса и полного истощения пула антиоксидантной защиты (Saliani M et al., 2016). Наблюдалось практически полное ингибирование первой линии антиоксидантной защиты, что выражалось снижением активности каталазы и супероксиддисмутазы практически в 5 раз в сравнении с контрольными значениями. Эффект остается чрезвычайно сильным, что, вероятно, связано с высокой реакционной способностью поверхности УДЧ оксида цинка и эффективным локальным высвобождением ионов после фагоцитоза. Предполагаем, что эффектив-

ный фагоцитоз и высвобождение ионов Zn^{2+} вели к генерации реактивных форм кислорода, которые ингибировали медьсодержащий активный центр SOD (Heck DE et al., 2010; Schatzman SS et al., 2020). Также при длительном стрессе ресурсы клетки (аминокислоты, витамины, микроэлементы) могут быть больше направлены на поддержание уже работающих систем, чем на синтез новых компонентов. На синтез новой порции SOD их просто не остаётся, и со временем запас фермента истощается. Клетка теряет способность нейтрализовать как супероксид-анион, так и перекись водорода.

Таким образом, полученные результаты показали высокую реакционную способность УДЧ оксида цинка, проявляющуюся в критическом воздействии на жизнеспособность клеток бактерий и инфузорий, а также на уровень окислительного стресса как в широком диапазоне концентраций, так и в размерном ряду частиц.

Заключение.

В результате исследования была установлена зависимость между гидродинамическим диаметром ультрадисперсных частиц оксида цинка и их биотоксичностью. Частицы с меньшим диаметром демонстрировали более высокую реакционную активность, что обуславливало их продолжительное токсическое действие на *E. coli* в более широком диапазоне низких концентраций, и более выраженную реакцию антиоксидантной системы (снижение активности ферментов и рост концентрации глутатиона) в тесте с *Stylomychia mytilus* по сравнению с частицами большего размера. Однако степень размер-зависимого эффекта биотоксичности ультрадисперсных частиц цинка нивелировалась на фоне общего воздействия на клетки по сравнению с контролем.

Исследования показали, что несмотря на то что токсичность снижается по мере увеличения размера частиц цинка, развитие окислительного стресса остается ярко выраженным в субхронических концентрациях, что является ограничивающим фактором широкого использования в сельском хозяйстве УДЧ ZnO и требует разработки компенсирующих механизмов.

Список источников

1. ГОСТ 31674-2012. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности. Введ. 01.07.2013. М.: Стандартинформ, 2014. 9 с. [GOST 31674-2012. Fodder, mixed fodder and raw mixed fodder. Methods for the determination of common toxicity. Vved. 01.07.2013. Moscow: Standartinform; 2014:9 p. (In Russ.)].
2. Калашников С.В., Моисеев М.А. Влияние размера наноструктурных объектов на их свойства и методы их дифференциации по размерам // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2014. № 6-1. С. 19-25. [Kalashnikov SV, Moiseev MA. The influence of the size of nanostructured objects on their properties and methods of their differentiation by size. Current Problems of the Humanities and Natural Sciences. 2014;6-1:19-25. (In Russ.)].
3. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопросы медицинской химии. 1990. Т. 36. № 2. С. 88-91. [Kostyuk VA, Potapovich AI, Kovaleva ZhV. A simple and sensitive method of determination of superoxide dismutase activity based on the reaction of quercetin oxidation. Questions of medicinal chemistry. 1990;36(2):88-91. (In Russ.)].
4. ОФС.1.7.2.0018.15. Определение нуклеиновых кислот по методу Спирина в биологических лекарственных препаратах. Введ. 01.12.2018. М.: Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. 2018. Т II. 1 с. [OFS.1.7.2.0018.15. Determination of nucleic acids in biological medicinal products using the Spirin method. Introduced 01.12.2018. M.: State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV edition. 2018;II:1 p. (In Russ.)].
5. Оценка влияния ультрадисперсных частиц железа и его оксидов с использованием одноклеточных тест-систем / Д.Б. Косян, Е.А. Русакова, О.Ю. Сипайлова, Е.А. Сизова // Животноводство и кормопроизводство. 2017. № 2(98). С. 9-16. [Kosyan DB, Rusakova EA, Sipaylova OY, Sizova EA. Evaluation of the influence of ultra-dispersed iron particles and its oxides using single-cell test systems. Animal Husbandry and Fodder Production. 2017. No 2(98). P. 9-16.]

lova OY, Sizova EA. Evaluation of the effect of ultradisperse iron particles and its oxides using unicellular test systems. *Animal Husbandry and Fodder Production*. 2017;2(98):9-16. (*In Russ.*).

6. Ayeleso TB, Ramachela K, Mukwevho E. Aqueous-methanol extracts of orange-fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas*) ameliorate oxidative stress and modulate type 2 diabetes associated genes in insulin resistant C2C12 cells. *Molecules*. 2018;23(8):2058. doi: 10.3390/molecules23082058

7. Dai H, Sun T, Han T, Guo Z, Wang X, Chen Y. Aggregation behavior of zinc oxide nanoparticles and their biotoxicity to *Daphnia magna*: Influence of humic acid and sodium alginate. *Environ Res*. 2020;191:110086. doi: 10.1016/j.envres.2020.110086

8. Dai S, Ye R, Huang J, Wang B, Xie Z, Ou X, et al. Distinct lipid membrane interaction and uptake of differentially charged nanoplastics in bacteria. *J Nanobiotechnology*. 2022;20:191. doi: 10.1186/s12951-022-01321-z

9. Dong X, Wu Z, Li X, Xiao L, Yang M, Li Y, et al. The size-dependent cytotoxicity of amorphous silica nanoparticles: a systematic review of in vitro studies. *Int J Nanomed*. 2020;15:9089-9113. doi: 10.2147/IJN.S276105

10. Fatima A, Zaheer T, Pal K, Abbas RZ, Akhtar T, Ali S, et al. Zinc oxide nanoparticles significant role in poultry and novel toxicological mechanisms. *Biol Trace Elem Res*. 2024;202(1):268-290. doi: 10.1007/s12011-023-03651-x

11. Fenchel T. Suspension feeding in ciliated protozoa: Functional response and particle size selection. *Microb Ecol*. 1980;6(1):1-11. doi: 10.1007/BF02020370

12. Fröhlich E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomed*. 2012;7:5577-5591. doi: 10.2147/IJN.S36111

13. Garncarek-Musiał M, Dziewulska K, Kowalska-Górska M. Effect of different sizes of nanocopper particles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.) spermatozoa motility kinematics. *Sci Total Environ*. 2024;941:173763. doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.173763

14. Gharpure S, Ankamwar B. Synthesis and Antimicrobial Properties of Zinc Oxide Nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*. 2020;20(10):5977-5996. doi: 10.1166/jnn.2020.18707

15. Hadwan MH, Abed HN. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data Brief*. 2016;6:194-199. doi: 10.1016/j.dib.2015.12.002

16. Heck DE, Shakarjian M, Kim HD, Laskin JD, Vetrano AM. Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1203:120-125. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05603.x

17. Islam S. Toxicity and transport of nanoparticles in agriculture: effects of size, coating, and aging. *Front Nanotechnol*. 2025;7:1622228. doi: 10.3389/fnano.2025.1622228

18. Kang M, Bai X, Liu Y, Weng Y, Wang H, Ye Z. Driving role of zinc oxide nanoparticles with different sizes and hydrophobicity in metabolic response and eco-corona formation in sprouts (*Vigna radiata*). *Environ Sci Technol*. 2024;58(22):9875-9886. doi: 10.1021/acs.est.4c01731

19. Kumar S, Suman S, Muthukumar M, Mishra K, Bajpai A, Tiwari AK, et al. Technical review on different metal nanoparticles and their formulations on growth, agronomic and economic traits of crop plants. *Front Nanotechnol*. 2025;7:1576582. doi: 10.3389/fnano.2025.1576582

20. Lavagna E, Barnoud J, Rossi G, Monticelli L. Size-dependent aggregation of hydrophobic nanoparticles in lipid membranes. *Nanoscale*. 2020;12(17):9452-9461. doi: 10.1039/d0nr00868k

21. Li J, Schiavo S, Rametta G, Miglietta ML, La Ferrara V, Wu C, et al. Comparative toxicity of nano ZnO and bulk ZnO towards marine algae *Tetraselmis suecica* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2017;24(7):6543-6553. doi: 10.1007/s11356-016-8343-0

22. Lin X, Li J, Ma S, Liu G, Yang K, Tong M, et al. Toxicity of TiO₂ nanoparticles to *Escherichia coli*: effects of particle size, crystal phase and water chemistry. *PLoS One*. 2014;9(10):e110247. doi: 10.1371/journal.pone.0110247

23. Makabenta JMV, Nabawy A, Li CH, Schmidt-Malan S, Patel R, Rotello VM. Nanomaterial-based therapeutics for antibiotic-resistant bacterial infections. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19:23-36. doi: 10.1038/s41579-020-0420-1

24. Muzammil S, Ashraf A, Siddique MH, Aslam B, Rasul I, Abbas R et al. A review on toxicity of nanomaterials in agriculture: Current scenario and future prospects. *Sci Prog.* 2023;106(4):368504231221672. doi: 10.1177/00368504231221672
25. Nair S, Sasidharan A, Divya Rani VV, et al. Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells. *J Mater Sci Mater Med.* 2009;20(Suppl 1):235-241. doi: 10.1007/s10856-008-3548-5
26. Salianni M, Jalal R, Goharshadi EK Mechanism of oxidative stress involved in the toxicity of ZnO nanoparticles against eukaryotic cells. *Nanomed J.* 2016;3(1):1-14. doi: 10.7508/NMJ.2016.01.001
27. Sattar AA, Matin AA, Hadwan MH, Hadwan AM, Mohammed RM. Rapid and effective protocol to measure glutathione peroxidase activity. *Bull Natl Res Cent.* 2024;48(1):100. doi: 10.1186/s42269-024-01250-x
28. Schatzman SS, Peterson RL, Teka M, et al. Copper-only superoxide dismutase enzymes and iron starvation stress in *Candida* fungal pathogens. *J Biol Chem.* 2020;295(2):570-583. doi:10.1074/jbc.RA119.011084
29. Singh R, Cheng S, Singh S. Oxidative stress-mediated genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles on *Deinococcus radiodurans*. *3 Biotech.* 2020;10(2):66. doi: 10.1007/s13205-020-2054-4
30. Wang X, Shi Q, Zha Z, Zhu D, Zheng L, Shi L, et al. Copper single-atom catalysts with photo-thermal performance and enhanced nanozyme activity for bacteria• infected wound therapy. *Bioact Mater.* 2021;6(12):4389-4401. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.04.024
31. Zarghami A, Ganjkanlou M, Zali A, Fekri A, Palangi V. Effects of nano-zinc oxide supplementation on milk yield, rumen fermentation, nutrient digestibility, and blood indices of high-yielding dairy cows. *Front Vet Sci.* 2025;12:1720270. doi: 10.3389/fvets.2025.1720270

References

1. State Standard 31674-2012. Fodder, mixed fodder and raw mixed fodder. Methods for the determination of common toxicity. Implementation date 01.07.2013. Moscow: Standartinform; 2014:9 p.
2. Kalashnikov SV, Moiseev MA. The influence of the size of nanostructured objects on their properties and methods of their differentiation by size. *Current Problems of the Humanities and Natural Sciences.* 2014;6-1:19-25.
3. Kostyuk VA, Potapovich AI, Kovaleva ZhV. A simple and sensitive method of determination of superoxide dismutase activity based on the reaction of quercetin oxidation. *Questions of Medicinal Chemistry.* 1990;36(2):88-91.
4. OFS.1.7.2.0018.15. Determination of nucleic acids in biological medicinal products using the Spirin method. Introduced 01.12.2018. M.: State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV edition. 2018;2:1 p.
5. Kosyan DB, Rusakova EA, Sipaylova OY, Sizova EA. Evaluation of the effect of ultradisperse iron particles and its oxides using unicellular test systems. *Animal Husbandry and Fodder Production.* 2017;2(98):9-16.
6. Ayeleso TB, Ramachela K, Mukwevho E. Aqueous-methanol extracts of orange-fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas*) ameliorate oxidative stress and modulate type 2 diabetes associated genes in insulin resistant C2C12 cells. *Molecules.* 2018;23(8):2058. doi: 10.3390/molecules23082058
7. Dai H, Sun T, Han T, Guo Z, Wang X, Chen Y. Aggregation behavior of zinc oxide nanoparticles and their biotoxicity to *Daphnia magna*: Influence of humic acid and sodium alginate. *Environ Res.* 2020;191:110086. doi: 10.1016/j.envres.2020.110086
8. Dai S, Ye R, Huang J, Wang B, Xie Z, Ou X, et al. Distinct lipid membrane interaction and uptake of differentially charged nanoplastics in bacteria. *J Nanobiotechnology.* 2022;20:191. doi: 10.1186/s12951-022-01321-z

9. Dong X, Wu Z, Li X, Xiao L, Yang M, Li Y, et al. The size-dependent cytotoxicity of amorphous silica nanoparticles: a systematic review of in vitro studies. *Int J Nanomed*. 2020;15:9089-9113. doi: 10.2147/IJN.S276105
10. Fatima A, Zaheer T, Pal K, Abbas RZ, Akhtar T, Ali S, et al. Zinc oxide nanoparticles significant role in poultry and novel toxicological mechanisms. *Biol Trace Elem Res*. 2024;202(1):268-290. doi: 10.1007/s12011-023-03651-x
11. Fenchel T. Suspension feeding in ciliated protozoa: Functional response and particle size selection. *Microb Ecol*. 1980;6(1):1-11. doi: 10.1007/BF02020370
12. Fröhlich E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomed*. 2012;7:5577-5591. doi: 10.2147/IJN.S36111
13. Garncarek-Musiał M, Dziewulska K, Kowalska-Górska M. Effect of different sizes of nano-copper particles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.) spermatozoa motility kinematics. *Sci Total Environ*. 2024;941:173763. doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.173763
14. Gharpure S, Ankamwar B. Synthesis and Antimicrobial Properties of Zinc Oxide Nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*. 2020;20(10):5977-5996. doi: 10.1166/jnn.2020.18707
15. Hadwan MH, Abed HN. Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. *Data Brief*. 2016;6:194-199. doi: 10.1016/j.dib.2015.12.002
16. Heck DE, Shakarjian M, Kim HD, Laskin JD, Vetrano AM. Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1203:120-125. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05603.x
17. Islam S. Toxicity and transport of nanoparticles in agriculture: effects of size, coating, and aging. *Front Nanotechnol*. 2025;7:1622228. doi: 10.3389/fnano.2025.1622228
18. Kang M, Bai X, Liu Y, Weng Y, Wang H, Ye Z. Driving role of zinc oxide nanoparticles with different sizes and hydrophobicity in metabolic response and eco-corona formation in sprouts (*Vigna radiata*). *Environ Sci Technol*. 2024;58(22):9875-9886. doi: 10.1021/acs.est.4c01731
19. Kumar S, Suman S, Muthukumar M, Mishra K, Bajpai A, Tiwari AK, et al. Technical review on different metal nanoparticles and their formulations on growth, agronomic and economic traits of crop plants. *Front Nanotechnol*. 2025;7:1576582. doi: 10.3389/fnano.2025.1576582
20. Lavagna E, Barnoud J, Rossi G, Monticelli L. Size-dependent aggregation of hydrophobic nanoparticles in lipid membranes. *Nanoscale*. 2020;12(17):9452-9461. doi: 10.1039/d0nr00868k
21. Li J, Schiavo S, Rametta G, Miglietta ML, La Ferrara V, Wu C, et al. Comparative toxicity of nano ZnO and bulk ZnO towards marine algae *Tetraselmis suecica* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2017;24(7):6543-6553. doi: 10.1007/s11356-016-8343-0
22. Lin X, Li J, Ma S, Liu G, Yang K, Tong M, et al. Toxicity of TiO₂ nanoparticles to *Escherichia coli*: effects of particle size, crystal phase and water chemistry. *PLoS One*. 2014;9(10):e110247. doi: 10.1371/journal.pone.0110247
23. Makabenta JMV, Nabawy A, Li CH, Schmidt-Malan S, Patel R, Rotello VM. Nanomaterial-based therapeutics for antibiotic-resistant bacterial infections. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19:23-36. doi: 10.1038/s41579-020-0420-1
24. Muzammil S, Ashraf A, Siddique MH, Aslam B, Rasul I, Abbas R et al. A review on toxicity of nanomaterials in agriculture: Current scenario and future prospects. *Sci Prog*. 2023;106(4):368504231221672. doi: 10.1177/00368504231221672
25. Nair S, Sasidharan A, Divya Rani VV, et al. Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2009;20(Suppl 1):235-241. doi: 10.1007/s10856-008-3548-5
26. Salianni M, Jalal R, Goharshadi EK Mechanism of oxidative stress involved in the toxicity of ZnO nanoparticles against eukaryotic cells. *Nanomed J*. 2016;3(1):1-14. doi: 10.7508/NMJ.2016.01.001
27. Sattar AA, Matin AA, Hadwan MH, Hadwan AM, Mohammed RM. Rapid and effective protocol to measure glutathione peroxidase activity. *Bull Natl Res Cent*. 2024;48(1):100. doi: 10.1186/s42269-024-01250-x

28. Schatzman SS, Peterson RL, Teka M, et al. Copper-only superoxide dismutase enzymes and iron starvation stress in *Candida* fungal pathogens. *J Biol Chem.* 2020;295(2):570-583. doi:10.1074/jbc.RA119.011084
29. Singh R, Cheng S, Singh S. Oxidative stress-mediated genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles on *Deinococcus radiodurans*. *3 Biotech.* 2020;10(2):66. doi: 10.1007/s13205-020-2054-4
30. Wang X, Shi Q, Zha Z, Zhu D, Zheng L, Shi L, et al. Copper single-atom catalysts with photo-thermal performance and enhanced nanozyme activity for bacteria• infected wound therapy. *Bioact Mater.* 2021;6(12):4389-4401. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.04.024
31. Zarghami A, Ganjkanlou M, Zali A, Fekri A, Palangi V. Effects of nano-zinc oxide supplementation on milk yield, rumen fermentation, nutrient digestibility, and blood indices of high-yielding dairy cows. *Front Vet Sci.* 2025;12:1720270. doi: 10.3389/fvets.2025.1720270

Информация об авторах:

Елена Анатольевна Сизова, доктор биологических наук, профессор, профессор РАН, главный научный сотрудник НОЦ «Биологические системы и нанотехнологии», Оренбургский государственный университет имени В.А. Бондаренко, 460018, г. Оренбург, пр. Победы, 13.

Елена Владимировна Яушева, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НОЦ «Биологические системы и нанотехнологии», Оренбургский государственный университет имени В.А. Бондаренко, 460018, г. Оренбург, пр. Победы, 13.

Даниил Евгеньевич Шошин, ассистент НОЦ «Биологические системы и нанотехнологии», Оренбургский государственный университет имени В.А. Бондаренко, 460018, г. Оренбург, пр. Победы, 13.

Ксения Сергеевна Нечитайло, кандидат биологических наук, старший преподаватель НОЦ «Биологические системы и нанотехнологии», Оренбургский государственный университет имени В.А. Бондаренко, 460018, г. Оренбург, пр. Победы, 13.

Information about the authors:

Elena A Sizova, Dr. Sci. (Biology), professor, professor of the Russian Academy of Sciences, Chief Researcher Scientific in Educational Center «Biological Systems and Nanotechnology», Orenburg State University named after VA Bondarenko, 13 Pobedy Ave., Orenburg, 460018.

Elena V Yausheva, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher Scientific and Educational Center «Biological Systems and Nanotechnology», Orenburg State University named after VA Bondarenko, 13 Pobedy Ave., Orenburg, 460018.

Daniil E Shoshin, assistant Scientific and Educational Center «Biological Systems and Nanotechnology», Orenburg State University named after VA Bondarenko, 13 Pobedy Ave., Orenburg, 460018.

Ksenia S Nechitailo, Cand. Sci. (Biology), senior lecturer Scientific and Educational Center «Biological Systems and Nanotechnology», Orenburg State University named after VA Bondarenko, 13 Pobedy Ave., Orenburg, 460018.

Статья поступила в редакцию 18.05.2026; одобрена после рецензирования 07.07.2026; принята к публикации 14.09.2026.

The article was submitted 18.05.2026; approved after reviewing 07.07.2026; accepted for publication 14.09.2026.