



ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2023.1.11

УДК 577.17

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА УЛЬТРАДИСПЕРСНЫХ ЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ МЕДИ И ЦИНКА В ТЕСТЕ ИНГИБИРОВАНИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Сизова Е.А. - д. б.н., вед. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-5125-5981), Яушева Е.В. – к.б.н., ст. науч. сотр. (ORCID 0000-0002-1589-2211), Нечитайло К.С. – науч. сотр. (0000-0002-8755-414X) ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук»

Благодарности: Исследования выполнены при поддержке гранта РНФ (проект № 22-26-00253).

Ключевые слова: ультрадисперсные частицы, медь, цинк, микроэлементы, бактериальная люминесценция, lux-биосенсоры.

Key words: ultrafine particles, copper, zinc, trace elements, bacterial luminescence, lux biosensors.



РЕФЕРАТ

Современные методы нанотехнологии позволяют преобразовывать макро- и микрообъекты в ультрадисперсные частицы (УДЧ), при этом сам процесс сопровождается изменением химических и физических свойств основного материала. Закономерно, биоактивность комплексов УДЧ микроэлементов будет отличаться от таковой у отдельных УДЧ. В связи с этим, цель нашего исследования состояла в изучении зависимости биологической активности комплекса УДЧ меди и цинка от их физико-химических характеристик. В эксперименте были использованы три образца УДЧ медь + цинк (А, В, С), полученные путем газозольного синтеза.

Анализ полученных данных позволил констатировать, что высоким уровнем токсичности исследуемых образцов УДЧ в отношении штамма *E.coli E. coli K12 TG1 pFl* обладал образец «С», процент фазы металлического цинка, в котором, в сравнении с другими тестируемыми порошками, наибольший, а процент фазы металлической меди наименьший.

В результате, данные на основе реакции штаммов *E.coli pSoxS::lux* и *E. coli pKatG-lux*, индукция свечения которых связана с развитием окислительного стресса в клетках при действии исследуемых образцов комплекса медь+цинк позволила выявить образец с максимальным эффектом – «С». Далее по степени развития токсического эффекта в ряду убывали образцы «В» и «А». В тоже время, интерпретация результатов отклика штамма *E. coli pRecA-lux*, формировало иной ряд специфичности: наибольший эффект на клетки бактерий среди исследуемых веществ оказывал образец «В».

Исходя из полученных данных, в нашем исследовании степень биологической активности УДЧ для живой системы определялась совокупностью ряда физико-химических параметров: форма, фазовый состав и удельная поверхность. Так, высокий уровень ток-

сичности коррелировал с наибольшим процентом фазы металлического цинка, наименьшим процентом металлической меди и оксидного слоя цинка в сочетании с наименьшей удельной поверхностью.

ВВЕДЕНИЕ/ INTRODUCTION

Современные методы нанотехнологии позволяют преобразовывать макро- и микрообъекты в УДЧ, при этом сам процесс сопровождается изменением химических и физических свойств основного материала [1]. УДЧ используются во всех областях промышленности, но особое научно-практическое значение приобретает применение данных частиц в сельском хозяйстве [2]. В частности, в птицеводстве УДЧ меди, цинка, селена, серебра, могут выступать в качестве эффективной альтернативы антибиотикам [3].

Применение минеральных кормовых добавок в кормлении сельскохозяйственных животных является необходимой мерой в виду их участия в физиологических и биохимических реакциях организма, с выраженным дефицитом в компонентах рациона. На практике их добавляют в форме неорганических солей, что способствует повышению продуктивных показателей, но при этом из-за низкой биодоступности наносит вред окружающей среде [4].

Антагонизм минералов в кишечнике или на клеточном уровне вызывает изменения в абсорбции, транспортировке и экскреции, что приводит к метаболическому дисбалансу [5]. Поскольку минеральные УДЧ имеют разные механизмы поглощения, они становятся более биодоступными из-за снижения антагонистических эффектов двухвалентных катионов [6].

В зависимости от метода синтеза УДЧ, меняется их биологическая активность, стабильность активного компонента, высвобождение и возможное влияние на живую систему [7]. При этом, задавая метод синтеза, появляется возможность управлять рядом важных физико-химических характеристик, таких как размер, растворимость, удельная поверхность, оптические свойства, фазовый состав, электрическая проводимость, теплопроводность [8]. Структурное строение

УДЧ также предопределяет дифференцированные свойства в виду множества каталитически активных центров и присутствием дефектов поверхности [7].

Расширить практическую значимость УДЧ микроэлементов позволяет модификация условий их синтеза и использование в виде сплавов. Закономерно, токсичность УДЧ сплавов и смесей микроэлементов будет отличаться от таковой у отдельных УДЧ [3].

Отсутствие устоявшегося регламента синтеза и детального описания связи физико-химических характеристик УДЧ, и их токсических свойств в отношении живых систем, делает проблематичным их широкое применение в биологии и сельском хозяйстве.

Таким образом, цель нашего эксперимента состояла в изучении зависимости биологической активности ультрадисперсного комплекса частиц меди и цинка от их физико-химических характеристик. Новизна заключается в том, что впервые проведена сравнительная оценка биологической активности в тесте бактериальной люминесценции комбинации частиц медь+цинк в ультрадисперсной форме полученных методом газофазного синтеза при разных режимах, что соответственно предопределяет различие в физико-химических и биологических свойствах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

В эксперименте были использованы три образца комплекса УДЧ медь + цинк (А, В, С), синтезированные газофазным методом при разных режимах (Институт физики металлов им. М.Н. Михеева Уральского отделения Российской академии наук). Оценку размеров УДЧ производили с помощью определения удельной поверхности на приборе СОРБИ-М. Изучение фазового состава проводили на дифрактометре Rigaku D/MAX-2200VL/PC.

Биологическую активность УДЧ изучали на модельных тест-системах с при-

менением *lux*-биосенсоров конститутивного и индуцибельного характера бактериального свечения. Исследование конститутивного характера свечения проводили с применением штамма *Escherichia coli K12 TGI pF1* (Эколюм). При индуцибельном характере биолюминесценции в работе применялись бактериальные штаммы: *Escherichia coli K12 MG1655 pkatG':lux*, *Escherichia coli K12 MG1655 psoxS':lux*, *E. coli MG1655 pRecA-lux*.

Штаммы выращены на LB-бульоне в присутствии 20 мкг/мл ампициллина в течение 16-18 часов при 37°C. Перед началом экспериментальных исследований, производили дополнительное проращивание культуры путем разведения в той же свежей питательной среде в соотношении 1:20, с последующей инкубацией (3-5 часа) и суспендированием в 0,5 %-ном растворе NaCl до достижения ОП 450=0,05 ед. Далее полученные суспензии (50 мкл) разливали в лунки планшета, содержащие по 50 мкл предварительно подготовленных разведений УДЧ, с экспозицией в 15 мин, после чего дополнительно вносилось 100 мкл LB-бульона в каждую лунку.

Измерения биолюминесценции проводились на многофункциональном микропланшетном анализаторе Infinite PROF200 (TECAN, Австрия). Результаты (I) оценивали с использованием формулы

$$I = \frac{I_{k_{\text{оин}}} \times I_{o_{\text{пмин}}}}{I_{k_{\text{пмин}}} \times I_{o_{\text{оин}}}}$$

, 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 %).

Суспензии УДЧ готовили в диапазоне концентраций 0,1 М – 0,000006 М с обработкой ультразвуком в течение 30 мин.

Все эксперименты выполнены не менее чем в трех повторениях и обработаны методами вариационной статистики с

использованием пакета компьютерных программ «Statistika 12» («StatSoft Inc.», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ/ RESULTS AND DISCUSSION

При реализации трех режимов синтеза, были получены три комплекса УДЧ с удельной поверхностью от 15 до 36 м²/г (А, В, С) (рис. 1). Частицы характеризовались сферической формой. При этом, оболочка отдельных частиц была более прозрачна для электронов по отношению к металлическому ядру.

Фазовый состав порошков, полученный на основе анализа дифрактограмм, приведен на рис. 2. Согласно полученным данным, процент фазы металлического цинка, в образце «С», в сравнении с другими тестируемыми порошками, наибольший (52,3 %), а процент фазы металлической меди наименьший (7,9 %). Оксидный слой, окружающий частицы цинка в данном образце минимальный (8,1 %), доля фазы ZnO в образце «В» составляет 34,1 %, в «А» – 49,8 %.

Оценка биологической активности комплекса УДЧ медь+цинк, с использованием *lux*-биосенсоров с конститутивным и индуцибельным характером свечения позволило описать степень их влияния на живую систему.

При контакте *E. coli K12 TGI pF1* с образцом «С» наблюдалось полное ингибирование свечения микроорганизмов в концентрациях от 0,1 до 8×10^{-4} М спустя 20 мин экспозиции, в дозе 4×10^{-4} М через 70 мин с проявлением острых токсичных эффектов в отношении живой системы. При последующем разведении исследуемых суспензий от 2×10^{-4} , до 5×10^{-5} М происходило 50 % ингибирование биолюминесценции бактериальных тест-организмов на протяжении 60-80 мин, что свидетельствует о высокой токсичности данного диапазона концентраций. Суспензия образца «С» 3×10^{-5} М приводило к 30 % тушению бактериального свечения спустя 180 мин контакта, что говорит о низкой биологической активности исследуемого образца. Концентрации 1×10^{-5} и 6×10^{-6} М образца «С» не оказывало значи-

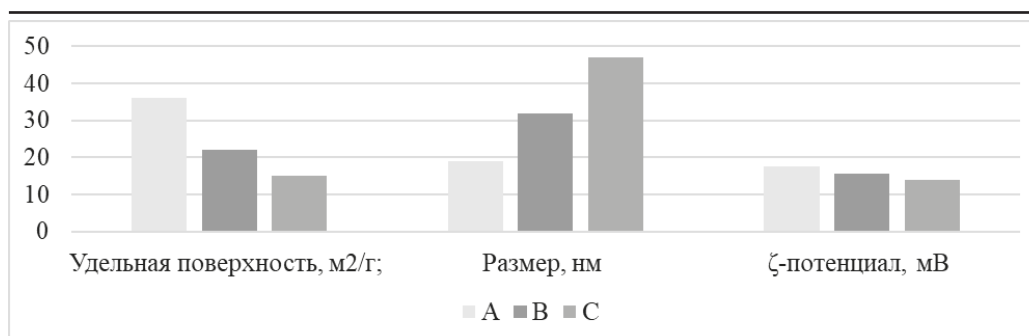


Рис. 1. Характеристики комплексов УДЧ медь+цинк (А, В, С)

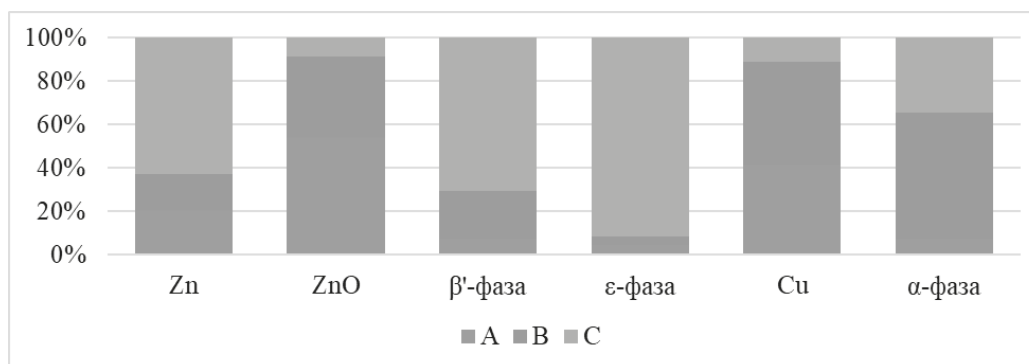


Рис. 2 – Фазовый состав комплексов УДЧ медь+цинк (А, В, С)

мого влияния на динамику бактериальной биолюминесценции.

Образец «А» обладал аналогичным действием с «С». Так, наблюдалось полное ингибирование свечения бактерий к 40 минуте эксперимента в диапазоне концентраций от 0,1 до 4×10^{-4} М, и через 120 мин для дозы 2×10^{-4} М. Доза 1×10^{-4} М (А) приводило к 50 % тушению на 180 минуте экспозиции, дальнейшее увеличение разведения в диапазоне 5×10^{-5} – 6×10^{-6} М не оказывало негативного биологического эффекта на клетки бактерий.

В отличие от тестируемых образцов «С» и «А», образец «В» характеризовался меньшей биологической активностью в тех же концентрациях. Образец «В» демонстрировал острый токсический эффект в диапазоне концентраций от 0,1 до 8×10^{-4} М, что сопровождалось полным ингибированием биолюминесценции в первые 60 мин контакта с клеткой. Дозы

УДЧ 4×10^{-4} и 2×10^{-4} М также характеризовались токсичным эффектом, что сопровождалось 50 % ингибированием свечения бактерий через 90-100 мин после контакта с клеткой, и 70 % тушение свечения бактерий спустя 180 мин эксперимента. Последующие разведения 1×10^{-4} и 5×10^{-5} М вызывали 30 – 40 % тушение свечения биолюминесценции и характеризовались как слаботоксичные, тогда как концентрации в диапазоне 3×10^{-5} – 6×10^{-6} М не оказывали негативного биологического эффекта на интенсивность свечения клеток. Нахождение генов биолюминесценции под контролем конститутивно экспрессируемого промотора обеспечивало исходно высокий уровень свечения, а тесная взаимосвязь системы генерации свечения с основными энергетическими потоками бактериальной клетки позволяет говорить о зависимости подавления биолюминесценции от интенсивно-

сти воздействия каких-либо факторов. Снижение биолюминесцентного отклика тест-системы позволяет говорить о наличии развивающегося антибактериального эффекта.

Биотестирование трёх образцов комплекса медь+цинк с использованием штаммов бактерий с индуцируемой экспрессией люминесценции в диапазоне исследуемых концентраций показало способность для анализируемых образцов оказывать генотоксическое действие и вызывать окислительный стресс в клетках бактерий.

Оценка интенсивности свечения штамма *E.coli pSoxS::lux* при воздействии исследуемых веществ в различных концентрациях выявила, что максимальная амплитуда люминесценции характерна для образца «С» и достигалась при концентрации 0,025 М, бактерии были высоко чувствительны к данным УДЧ, так как ответная реакция на воздействие запускалась при 3×10^{-3} М. При использовании образца «А» максимальная амплитуда люминесценции достигалась при 0,1 М, однако бактерии были менее чувствительны к данному препарату в сравнении с другими исследуемыми веществами, и ответная реакция запускалась только при 0,025 М.

При тестировании исследуемых УДЧ с использованием штамма *E. coli pKatG-lux* самый низкий показатель максимальной амплитуды люминесценции был характерен для образца «А», при 3×10^{-3} М, концентрация пороговой чувствительности составляла 4×10^{-4} М. Образец «С», наоборот, обеспечивал максимальный уровень свечения, минимальная регистрируемая концентрация составляла 2×10^{-4} М. В присутствии образца «В» максимальный уровень свечения использованного биосенсора зафиксирован при 0,013 М, однако бактерии к нему менее чувствительны по сравнению с другими УДЧ.

Наибольший эффект на клетки бактерий *E. coli pRecA-lux* среди исследуемых веществ оказывал образец «В», при этом максимальная амплитуда свечения заре-

гистрирована при 2×10^{-3} М, а порог чувствительности был при концентрации 4×10^{-4} М.

Образец «С» также оказывал сильное влияние на интенсивность свечения клеток. При этом максимальная амплитуда люминесценции была зарегистрирована при 3×10^{-3} М и минимальная регистрируемая концентрация данного токсиканта вызывающая эффект повреждения ДНК была равна 8×10^{-4} М. Незначительная индукция люминесценции репортерного штамма была характерна для образца «А», где максимальная амплитуда ответа была при 6×10^{-3} М) и минимальный регистрируемый в кинетическом режиме токсический эффект был характерен для концентрации 3×10^{-3} М.

В результате полученные данные на основе реакции штаммов *E.coli pSoxS::lux* и *E. coli pKatG-lux*, индукция свечения которых связана с развитием окислительного стресса в клетках, на действие исследуемых образцов комплекса медь+цинк позволила сформировать следующий ряд токсичности: «С» > «В» > «А». Необходимо отметить, несмотря на то что механизмы запуска окислительного стресса в клетках штаммов *E.coli pSoxS::lux* и *E. coli pKatG-lux* имеют различную природу, в нашем случае одно и то же вещество оказывало максимальный эффект в обоих случаях. В тоже время, интерпретация результатов отклика штамма *E. coli pRecA-lux*, индукция свечения которого обусловлена повреждением ДНК в клетках, формирует иной ряд специфичности: «В» > «С» > «А».

Результаты исследования свидетельствуют о том, что наблюдаемый комплекс медь+цинк в ультрадисперсной форме обладает высокой биологической активностью в широкой вариации концентраций, с выраженными антибактериальными свойствами в отношении живых систем.

Рентгеновская дифракция не выявила других оксидов кроме оксида цинка, хотя частицы меди и других фаз системы комплекса медь+цинк должны покрываться оксидным слоем при контакте с воздухом.

Возможно, толщина оксидного слоя для этих металлических фаз оказалась недостаточной для формирования заметных рентгеновских рефлексов.

Мы попытались выявить параметр, который влияет на общее токсическое действие исследуемых порошков УДЧ. Единственным параметром, закономерно с которым изменяется общая токсичность, является содержание в порошке фазы металлического цинка.

Наиболее токсичным из исследуемых образцов является образец «С», в котором, в сравнении с другими тестируемыми порошками, наибольший процент фазы металлического цинка, а процент фазы металлической меди наименьший. При этом, оксидный слой минимальный, что вероятно определяло большую токсичность в сравнении с другими исследуемыми порошками. Согласно литературным данным, кислородные формы в составе поверхностной структуры УДЧ выступают в качестве основных факторов биологической токсичности [9].

При этом, преимущественно токсичность УДЧ цинка или оксида цинка обусловлена степенью их растворимости и способностью трансформации ионов цинка Zn^{2+} в раствор [2]. В образцах, с высоким содержанием фазы металлического цинка, наблюдалась максимальная токсичность, что вероятно связано со способностью металлического цинка быстрее переходить в раствор, чем оксид цинка. Контакт с водой приводит к формированию гидроксида цинка [5]. Механизм биотоксичности опосредован увеличением концентрации внутриклеточных ионов цинка, что приводит к усилению выработки внутриклеточных реактивных форм кислорода, утечки из плазматической мембраны, нарушению митохондриальной функции с последующей гибелью клеток. Помимо усиленной генерации форм кислорода обладающих повышенной реактивностью, происходит деструкция мембран лизосом с активацией генетически-кодируемых биосенсоров апоптоза [10].

Было показано, что биотоксичность

цинка в ультрадисперсной форме на несколько порядков выше, чем УДЧ меди, и практически в два раза токсичнее УДЧ цинк-медь в форме сплава [11].

В тоже время, еще одним параметром, помимо фазового состава, изменение которого находило закономерное отражение в изменении токсичности при тестировании с использованием штамма *E. coli pKatG-lux* и штамма *E. coli pSoxS::lux* являлся удельная поверхность. Данный параметр для образца С, являющегося наиболее токсичным для клеток бактерий, составлял $15 \text{ м}^2/\text{г}$, тогда как для образцов В и А, обладающих меньшей токсичностью, данная величина была равна 22 и $36 \text{ м}^2/\text{г}$. Существует зависимость между площадью поверхности УДЧ и степенью их биодоступности [12].

Возможно, окислительный стресс является результатом действия одновременно нескольких факторов, в том числе формы частиц. Из литературных данных следует, что окислительный стресс является наиболее частым проявлением токсичности наноматериалов и катионные УДЧ, и частицы сферической формы быстрее проникают в клетку и вызывают образование свободных радикалов, чем частицы иной формы [13].

В свою очередь, наличие положительного заряда на поверхности исследуемых УДЧ, также способствовало тесному контакту с клетками бактерий. Положительно заряженные частицы, контактируя с отрицательно заряженной клеточной мембраной бактерий, накапливаются внутри клеток больше, чем их отрицательно заряженные или нейтральные аналоги [14]. В исследованиях было показано, что положительно заряженные агрегаты меди в ультрадисперсной форме приводят к образованию электростатического взаимодействия с отрицательно заряженной поверхностной структурой *E. coli* K12 индуцибельного характера свечения. В последующем, модельные микроорганизмы подвергаются оксидативному стрессу, посредством трансформации электронов через интегрированные с цитоплазматической мембраной частицы меди на моле-

кулярный кислород. В конечном итоге происходит деструкция ДНК реактивными формами кислорода [15].

ВЫВОДЫ/ CONCLUSIONS

Анализ полученных данных позволил констатировать, степень биотоксичности (на основании показателя EC_{50}) исследуемых веществ в отношении генноинженерного люминесцирующего штамма *E. coli K12 TG1 pFl* прогрессивно убывал в ряду: «С» → «А» → «В», при этом эффект воздействия исследуемых УДЧ был дозой и время зависимым.

Исходя из полученных данных, в нашем исследовании степень биологической активности УДЧ для живой системы определялась совокупностью ряда физико-химических параметров: форма, фазовый состав и удельная поверхность. Так, высокий уровень токсичности коррелировал с наибольшим процентом фазы металлического цинка, наименьшим процентом металлической меди и оксидного слоя цинка в сочетании с наименьшей удельной поверхностью.

COMPARATIVE EVALUATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF A COMPLEX OF ULTRAFINE PARTICLES BASED ON COPPER AND ZINC IN THE BIOLUMINESCENCE INHIBITION TEST.

Sizova E.A. - Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher (ORCID 0000-0002-5125-5981), Yausheva E.V. – PhD of Biological Sciences, Senior Researcher (ORCID 0000-0002-1589-2211), Nechitailo K.S. – researcher (0000-0002-8755-414X).

Federal Research Centre of Biological Systems and Agro-technologies of the Russian Academy of Sciences.

ABSTRACT

Modern methods of nanotechnology make it possible to transform macro- and micro-objects into ultrafine particles (UFP), while the process itself is accompanied by a change in the chemical and physical properties of the base material. Naturally, the biological activity of complexes of UHF microelements will differ from that of individual UHFs. In this regard, the purpose of our study was to study the dependence of the biological activity of the UHF copper + zinc

complex on their physicochemical characteristics.

Analysis of the data obtained allowed us to state that sample «С» had a high level of toxicity of the studied samples of UHF against the strain *E. coli K12 TG1 pFl*. Further, according to the observed effect, sample A was noted, while the effect of exposure to the studied UHF was dose- and time-dependent.

As a result, the data obtained on the basis of the reaction of strains *E. coli pSoxS::lux* and *E. coli pKatG-lux*, the induction of luminescence of which is associated with the development of oxidative stress in cells, on the action of the studied samples of the copper+zinc complex, made it possible to form a sample with the maximum effect «С». Further, according to the degree of development of the toxic effect, samples «В» and «А» decreased in the series. At the same time, the interpretation of the results of the response of the *E. coli pRecA-lux* strain, the induction of which is caused by DNA damage in cells, forms a different series of specificity: the greatest effect on bacterial cells among the studied substances, sample B was rendered, while the maximum luminescence amplitude was 70 units at 0.002 M, and the sensitivity threshold was at a concentration of 0.0004 M.

Based on the data obtained, in our study, the degree of biological activity of UHF for a living system was determined by a combination of a number of physicochemical parameters: shape, phase composition, and specific surface area.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Patra, A. Progress and Prospect of Essential Mineral Nanoparticles in Poultry Nutrition and Feeding-a Review / A. Patra, M. Lalhriatpuii // Biological trace element research. – 2020. – Vol. 197. – No 1. – P. 233–253. – DOI 10.1007/s12011-019-01959-1.
2. Mohd Yusof, H. Microbial synthesis of zinc oxide nanoparticles and their potential application as an antimicrobial agent and a feed supplement in animal industry: a review / H. Mohd Yusof, R. Mohamad, U.H. Zaidan, N.S. Abdul Rahman // Journal of animal science and biotechnology. – 2019. – Vol. 10. – P. 57. DOI 10.1186/s40104-019-0368-z.

3. Сизова, Е.А. Сравнительная характеристика токсичности ультрадисперсных частиц меди, цинка и их сплавов в тесте ингибирования бактериальной биолуминесценции / Е.А. Сизова, Е.В. Яушева, К.С. Нечитайло, А. П. Иванищева // Животноводство и кормопроизводство. 2019. – Т. 102. – № 4. – С.10-22.
4. Nookabkaew, S. Concentrations of Trace Elements in Organic Fertilizers and Animal Manures and Feeds and Cadmium Contamination in Herbal Tea (*Gynostemma pentaphyllum* Makino) / S. Nookabkaew, N. Rangkadilok, N. Prachoom, J. Satayavivad // Journal of agricultural and food chemistry. – 2016. – Vol. 64. – No 16. – P. 3119–3126. – DOI 10.1021/acs.jafc.5b06160.
5. Joshua, P.P. Effect of in ovo supplementation of nano forms of zinc, copper, and selenium on post-hatch performance of broiler chicken / P.P. Joshua, C. Valli, V. Balakrishnan // Vet World. – 2016. – Vol 9. – No 3. – P. 287-294. – DOI 10.14202/vetworld.2016.287-294.
6. Hassan, S. Nano-particles of Trace Minerals in Poultry Nutrition: Potential Applications and Future Prospects / S. Hassan, F.U. Hassan, M.S. Rehman // Biological trace element research. – 2020. – Vol. 195. – No 2. – P. 591–612. – DOI 10.1007/s12011-019-01862-9.
7. Madden, A.S. A test of geochemical reactivity as a function of mineral size: manganese oxidation promoted by hematite nanoparticles / A.S. Madden, M.F. Hochella // Geochim Cosmochim Acta. – 2005. – Vol. 69. – P. 389–398.
8. Tiede, K. Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment / K. Tiede, A.B. Boxall, S.P. Tear [et al.] // Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment. – 2008. – Vol. 25. – No 7. – P. 795–821. DOI 10.1080/02652030802007553.
9. Xia, T. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in mediating particulate matter injury / T. Xia, M. Kovichich, A. Nel // Clinics in occupational and environmental medicine. – 2006. – Vol. 5. – No 4. – P. 817–836. DOI 10.1016/j.coem.2006.07.005.
10. Youn, S.M. Food Additive Zinc Oxide Nanoparticles: Dissolution, Interaction, Fate, Cytotoxicity, and Oral Toxicity / S.M. Youn, S.J. Choi // International journal of molecular sciences. – 2022. – Vol. 23. – No 11. – P. 6074. DOI 10.3390/ijms23116074.
11. Sizova, E. Comparative Characteristic of Toxicity of Nanoparticles using the test of Bacterial Bioluminescence / E. Sizova, S. Miroshnikov, E. Yausheva, D. Kosyan // Biosci Biotech Res Asia. – 2015. – Vol. 12. – No 2. – P. 361-368.
12. Ovrevik, J. Chemical composition and not only total surface area is important for the effects of ultrafine particles / J. Ovrevik, P.E. Schwarze // Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 2006. – Vol. 594. – No 1-2. – DOI 201–202. doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.10.002.
13. Yu, Z. Reactive Oxygen Species-Related Nanoparticle Toxicity in the Biomedical Field / Z. Yu, Q. Li, J. Wang [et al.] // Nanoscale research letters. – 2020. – Vol. 15. – No 1. – P. 115. DOI 10.1186/s11671-020-03344-7.
14. Forest, V. Preferential binding of positive nanoparticles on cell membranes is due to electrostatic interactions: A too simplistic explanation that does not take into account the nanoparticle protein corona / V. Forest, J. Pourchez // Materials science & engineering. C, Materials for biological applications. – 2017. – Vol. 70. – No 1. – P. 889–896. DOI 10.1016/j.msec.2016.09.016.
15. Дерябин, Д.Г. Исследование механизмов антибактериальной активности НЧ меди в тестах на люминесцирующих штаммах *Escherichia Coli* / Д.Г. Дерябин, Е.С. Алешина, А.С. Васильченко, Т.Д. Дерябина, Л.В. Ефремова, И.Ф. Каримов, Л.Б. Королевская // Российские нанотехнологии. – 2013. – Т. 8, № 5-6. – С.113-118.
- REFERENCES**
1. Patra A, Lalhriatpuii M, Progress and Prospect of Essential Mineral Nanoparticles in Poultry Nutrition and Feeding-a Review: Biological trace element research. 2020; 197 (1): 233–253. doi:10.1007/s12011-019-01959-1.
2. Mohd Yusof H, Mohamad R, Zaidan UH,

- Abdul Rahman NA. Microbial synthesis of zinc oxide nanoparticles and their potential application as an antimicrobial agent and a feed supplement in animal industry: a review: *Journal of animal science and biotechnology*. 2019; 10: 57. doi:10.1186/s40104-019-0368-z.
- 3.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.]
- 4.Nookabkaew S, Rangkadilok N, Prachoom N, Satayavivad J. Concentrations of Trace Elements in Organic Fertilizers and Animal Manures and Feeds and Cadmium Contamination in Herbal Tea (*Gynostemma pentaphyllum* Makino): *Journal of agricultural and food chemistry*. 2016; 64(16): 3119–3126. doi:10.1021/acs.jafc.5b06160.
- 5.Joshua PP, Valli C, Balakrishnan V, Effect of in ovo supplementation of nano forms of zinc, copper, and selenium on post-hatch performance of broiler chicken. *Vet World*. 2016; 9(3): 287-294. doi:10.14202/vetworld.2016.287-294
- 6.Hassan S, Hassan FU, Rehman MS, Nanoparticles of Trace Minerals in Poultry Nutrition: Potential Applications and Future Prospects: *Biological trace element research*. 2020; 195(2): 591–612. doi: 10.1007/s12011-019-01862-9.
- 7.Madden AS, Hochella MF, A test of geochemical reactivity as a function of mineral size: manganese oxidation promoted by hematite nanoparticles: *Geochim Cosmochim Acta*. 2005; 69: 389–398.
- 8.Tiede K, Boxall AB, Tear SP, Lewis J, David H, Hasselov M, Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment: Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment. 2008; 25(7): 795–821. doi:10.1080/02652030802007553.
- 9.Xia T, Kovochich M, Nel A, The role of reactive oxygen species and oxidative stress in mediating particulate matter injury: *Clinics in occupational and environmental medicine*. 2006, 5(4): 817–836. doi: 10.1016/j.coem.2006.07.005.
- 10.Youn SM, Choi SJ, Food Additive Zinc Oxide Nanoparticles: Dissolution, Interaction, Fate, Cytotoxicity, and Oral Toxicity: *International journal of molecular sciences*. 2022, 23(11): 6074. doi: 10.3390/ijms23116074.
- 11.Sizova E, Miroshnikov S, Yausheva E, Kosyan D, Comparative Characteristic of Toxicity of Nanoparticles using the test of Bacterial Bioluminescence: *Biosci Biotech Res Asia*. – 2015. – Vol. 12. - No 2. – P. 361 -368.
- 12.Ovrevik J, Schwarze PE. Chemical composition and not only total surface area is important for the effects of ultrafine particles: *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2006, 594(1-2): 201–202. doi:10.1016/j.mrfmmm.2005.10.002.
- 13.Yu Z, Li Q, Wang J, Yu Y, Wang Y, Zhou Q, Li P. Reactive Oxygen Species-Related Nanoparticle Toxicity in the Biomedical Field: *Nanoscale research letters*. 2020, 15(1): 115. doi: 10.1186/s11671-020-03344-7.
- 14.Forest V, Pourchez J. Preferential binding of positive nanoparticles on cell membranes is due to electrostatic interactions: A too simplistic explanation that does not take into account the nanoparticle protein corona: *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*. 2017, 70(Pt 1): 889–896. doi.org: 10.1016/j.msec.2016.09.016.
- 15.Deryabin DG, Aleshina ES, Vasilchenko AS, Deryabina TD, Efremova LV, Karimov IF, Korolevskaya LB. Study of the mechanisms of antibacterial activity of copper NPs in tests on luminescent strains of *Escherichia Coli*. *Russian nanotechnologies*. 2013, 5-6: 113-118 [in Russ.]