

УДК 574.23, 574.24, 574.474, 579.222.4

Научная статья



Открытый доступ

DOI: 10.32634/0869-8155-2024-388-11-39-45

А. Н. Сизенцов ✉  
Л. В. Галактионова  
О. К. Давыдова

Оренбургский государственный университет, Оренбург, Россия

✉ kwan111@yandex.ru

Поступила в редакцию: 05.09.2024  
Одобрена после рецензирования: 01.10.2024  
Принята к публикации: 18.10.2024

© Сизенцов А.Н., Галактионова Л.В., Давыдова О.К.

## Комплексный анализ влияния эссенциальных элементов на бактериальные штаммы *Bacillus sp.* в модельном эксперименте *in vitro*

### РЕЗЮМЕ

**Актуальность.** В современной литературе представлены многочисленные экспериментальные данные по использованию биоремедиационного потенциала бактериальных штаммов для коррекции моно- и полиметалльного загрязнения экосистем различного уровня организации. В данной работе проведен системный анализ оценки степени влияния избыточных концентраций цинка, железа и меди на динамические показатели роста, уровень толерантности, сорбционной емкости и антагонистические характеристики штаммов *Bacillus sp.* в модельных экспериментах *in vitro*.

**Методы.** Исследования проводились на кафедре биохимии и микробиологии Оренбургского государственного университета в 2023 году. В качестве объектов исследования использовались музейные образцы пробиотических штаммов *Bacillus sp.*: *B. subtilis* 534 («Споробактерин», ООО «Бако-рен», Оренбург, Россия), *B. cereus* IP 5832 («Флонивин БС», Galenika Crna Gora, D.O.O., Черногория), *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 («Ветом 4» ООО НПФ «Исследовательский центр», Новосибирская область, Россия), а также клинические изоляты *E. coli* и *S. aureus*. В качестве регулирующих рост факторов моно- и полиметалльного загрязнения субстрата использовали соли металлов (ЧДА)  $FeSO_4 \times 7H_2O$ ,  $CuSO_4 \times 5H_2O$  и  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  (АО «ЛенРеактив» Санкт-Петербург, Россия).

**Результаты.** Полученные данные свидетельствуют о высоких показателях уровня сорбции железа до 47,98 % и цинка до 44,96 % исследуемыми штаммами. Экспериментально установлено негативное влияние массивированной катионной нагрузки цинка и меди на антагонистическую активность исследуемых штаммов как в отношении грамположительного (*S. aureus*) так и грамотрицательного (*E. coli*) модельного микроорганизма. Железо оказывает стимулирующее действие на антагонистические характеристики *B. cereus* IP 5832 и *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 в отношении *E. coli* на 32,63 % ( $p < 0,01$ ) и 36,77 % ( $p < 0,05$ ).

**Ключевые слова:** эссенциальные элементы, *Bacillus sp.*, сорбционная емкость, биоаккумуляция, антагонизм

**Для цитирования:** Сизенцов А.Н., Галактионова Л.В., Давыдова О.К. Комплексный анализ влияния эссенциальных элементов на бактериальные штаммы *Bacillus sp.* в модельном эксперименте *in vitro*. *Аграрная наука*. 2024; 388(11): 39–45.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-388-11-39-45>

Research article



Open access

DOI: 10.32634/0869-8155-2024-388-11-39-45

Alexey N. Sizentsov ✉  
Lyudmila V. Galaktionova  
Olga K. Davydova

Orenburg state university, Orenburg, Russia

✉ kwan111@yandex.ru

Received by the editorial office: 05.09.2024  
Accepted in revised: 01.10.2024  
Accepted for publication: 18.10.2024

© Sizentsov A.N., Galaktionova L.V., Davydova O.K.

## Comprehensive analysis of the effect of essential elements on bacterial strains of *Bacillus sp.* in an model experiment *in vitro*

### ABSTRACT

**Relevance.** Modern literature presents numerous experimental data on the use of the bioremediation potential of bacterial strains to correct mono and polymetal pollution of ecosystems at various levels of organization. In our work, a systematic analysis was carried out to assess the degree of influence of excess concentrations of zinc, iron and copper on dynamic growth indicators, the level of tolerance, sorption capacity and antagonistic characteristics of *Bacillus sp. strains.* in model experiments *in vitro*.

**Methods.** The research was conducted at the department of Biochemistry and Microbiology of Orenburg State University in 2023. As objects of research, they used museum samples of probiotic strains of *Bacillus sp.*: *B. subtilis* 534 (Sporobacterin, Bakoren LLC, Orenburg, Russia), *B. cereus* IP 5832 (Flonivin BS, Galenika Crna Gora, D.O.O., Montenegro), *B. licheniformis* VKPM B 7038 («Vetom 4» NPF Research Center LLC, Novosibirsk region, Russia), as well as clinical isolates of *E. coli* and *S. aureus*. Metal salts  $FeSO_4 \times 7H_2O$ ,  $CuSO_4 \times 5H_2O$  and  $ZnSO_4 \times 7H_2O$  (JSC Lenreactive St. Petersburg, Russia) were used as growth-regulating factors of mono- and polymetal contamination of the substrate.

**Results.** The data obtained indicate high levels of sorption of iron up to 47.98% and zinc up to 44.96% by the studied strains. The negative effect of a massive cationic load of zinc and copper on the antagonistic activity of the studied strains against both gram-positive (*S. aureus*) and gram-negative (*E. coli*) model microorganisms was experimentally established. Iron has a stimulating effect on the antagonistic characteristics of *B. cereus* IP 5832 and *B. licheniformis* VKPM B 7038 against *E. coli* by 32.63% ( $p < 0.01$ ) and 36.77% ( $p < 0.05$ ).

**Key words:** essential elements, *Bacillus sp.*, sorption capacity, bioaccumulation, antagonism

**For citation:** Sizentsov A.N., Galaktionova L.V., Davydova O.K. Comprehensive analysis of the effect of essential elements on bacterial strains of *Bacillus sp.* in an model experiment *in vitro*. *Agrarian science*. 2024; 388(11): 39–45 (in Russian).

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2024-388-11-39-45>

## Введение/Introduction

Клеточная структура микроорганизма способна улавливать ионы тяжелых металлов и впоследствии сорбировать их на местах связывания клеточной стенки [1–4]. Данный процесс называется биосорбцией (или пассивным поглощением) и не зависит от метаболического цикла.

Количество сорбированного металла зависит от кинетического равновесия и состояния металла на клеточной поверхности. Механизм включает в себя несколько процессов: электростатическое взаимодействие, ионный обмен, осаждение, окислительно-восстановительные реакции, поверхностное комплексообразование [5]. Эти процессы быстрые и могут реализовываться в течение нескольких минут.

Биосорбция может осуществляться фрагментами клеток, мертвой биомассой или живыми клетками в виде пассивного поглощения посредством поверхностного комплексообразования на клеточной стенке и других внешних слоях [6].

Другой метод представляет собой процесс, при котором ионы тяжелых металлов проходят через клеточную мембрану в цитоплазму в рамках клеточного метаболического цикла. Это называется биоаккумуляцией или активным поглощением. Биоаккумуляция является сложным процессом живой клетки, который зависит от множества физических, химических и биологических механизмов. Эти факторы включают внутриклеточные и внеклеточные процессы, где биосорбция играет ограниченную и неясную роль [6]. Организм, который будет накапливать тяжелые металлы, должен иметь толерантность к одному или нескольким металлам в более высоких концентрациях и должен проявлять повышенные трансформационные способности, переводя токсичные химические вещества в безвредные формы, что позволяет организму уменьшить токсическое действие металла [7].

Механизмы поглощения металлов различными биосорбентами зависят от клеточной поверхности микроорганизмов, от обмена ионов металлов и комплексных образований с ионами металлов на химически активных участках клеточной поверхности [8]. Они были тщательно изучены в отношении различных изотерм биосорбции, полученных в результате экспериментов по сорбции и влиянию различных факторов, таких как pH, предварительная обработка биомассы и биомасса организмов. Затем на поверхности клетки происходит осаждение избыточных ионов металлов в результате реакций нуклеации. Все микроорганизмы имеют отрицательный заряд на поверхности своих клеток из-за наличия анионных структур, которые позволяют им связываться с катионами металлов. Отрицательно заряженными группами, участвующими в адсорбции металлов, являются спиртовая, аминная, карбоксильная, сложноэфирная, гидроксильная, сульфогидрильная, фосфорильная, сульфатная, тиоэфирная и тиоловая группы [9].

Биоремедиация использует генетическое разнообразие и метаболическую универсальность микроорганизмов для преобразования загрязняющих веществ в менее вредные конечные продукты, которые затем интегрируются в естественные биогеохимические циклы [10]. Основные пути биоремедиации заключаются в снижении растворимости загрязнителей окружающей среды за счет изменения pH, окислительно-восстановительных реакций и адсорбции загрязнителей [11–14].

Бактерии, восстанавливающие железо (III), играют важную роль в деградации органического вещества естественного происхождения и в круговороте тяжелых металлов в морских и пресноводных отложениях [15], активно участвуют в биогеохимическом цикле углерода и азота в природе [16].

Биосорбция является экологически чистым и экономически эффективным удобным методом биоремедиации тяжелых металлов из загрязненной водной экосистемы [17, 18]. Так, в исследовании, проведенном В. Шарма и соавт., установлено, что штамм *Bacillus subtilis* (MN093305), выделенный из реки Ганг при pH 7, 72 ч., 35 °C, сорбирует железо до 95,02% [19]. Кришна Канамарлапуди и Муддада в изотермических и кинетических исследованиях биосорбции железа (II) биомассой *Bacillus subtilis* из водных растворов установили, что оптимальная биосорбционная емкость составляет 7,25 мг металла на 1 г биосорбента в экспериментальных условиях начальной концентрации металла 100 мг/л, pH 4,5 и дозы биомассы 1 г/л при 30 °C в течение 24 ч. [20].

*Цель исследования* — оценить степень влияния эссенциальных элементов на рост и антагонистическую активность штаммов *Bacillus sp.*, входящих в состав пробиотических препаратов.

## Материалы и методы исследования / Materials and methods

Исследования проводились на кафедре биохимии и микробиологии Оренбургского государственного университета в 2023 году. В качестве объектов исследования использовались музейные образцы пробиотических штаммов *Bacillus sp.*: *B. subtilis* 534 («Споробактерин», ООО «Бакорен», г. Оренбург, Россия), *B. cereus* IP 5832 («Флонивин БС», Galenika Crna Gora, D. O. O., Черногория), *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 («Ветом 4», ООО НПФ «Исследовательский центр», Новосибирская обл., Россия), клинические изоляты *E. coli* и *S. aureus*.

В качестве регулирующих рост факторов моно- и полиметалльного загрязнения субстрата использовали соли металлов (ЧДА)  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (АО «ЛенРеактив», г. Санкт-Петербург, Россия).

Для реализации поставленных задач использовали комбинирование методов серийного разведения с диффузионным методом агаровых лунок. Сочетание представленных методических подходов позволило оценить уровень резистентности исследуемых штаммов к тестируемым химическим соединениям и степень антагонистической активности.

Серия разведения солей металлов в условиях базового эксперимента, направленного на уровень пороговых значений толерантности пробиотических штаммов, колебалась в диапазоне от 1,000 до 0,016 М, что в свою очередь позволило определить рабочие концентрации солей эссенциальных элементов (минимальная доза, не оказывающая ингибирующее действие) для проведения дальнейших исследований.

Суть метода заключается в высеве суспензии исследуемых микроорганизмов (0,5 по МакФарланду) на поверхность стерильного агаризованного субстрата (2,0%). После посева культуры клеток газоном с использованием шпателя Дригальского стерильным микробиологическим пробойником в толще агара были сделаны 7 отверстий диаметром 5 мм на удалении 1,5 см от края чашки (диаметр 90 мм) и 3,0 см между лунками. В лунки в объеме 30 мкл вносили раствор соли металла

по часовой стрелке с убыванием концентрации. Чашки помещали в термостат для инкубирования культуры клеток при температуре 37 °С в течение 24 часов. Уровень биологического действия оценивали визуально путем замера зон ингибирования роста (бактерицидный эффект) или их отсутствия.

Антагонистическую активность исследовали диффузионным методом. Предварительно тестируемые пробиотические штаммы *Bacillus sp.* культивировали в жидкой питательной среде (ГРМ-бульон), контрольные образцы без добавления металла, опытные — в присутствии солей исследуемых элементов в течение 48 ч. при температуре 37 °С. После культивирования пробирки центрифугировали в течение 30 мин. при 3000 об/мин.

Для исследования использовали надосадочную жидкость (супернатант). В чашках Петри на поверхности 2% ГРМ-агара высевали суспензию *E. coli* и *S. aureus* (0,5 по МакФарланду) в объеме 100 мкл с равномерным распределением газонем шпателем Дригальского. В лунки в толще агаризованной пластинки, сделанные микробиологическим пробойником, вносили по 30 мкл супернатанта в последовательности: контрольный образец и опытные (рост в присутствии рабочих концентраций  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ).

Влияние металлов на антагонистические характеристики *Bacillus sp.* проводили посредством замера зон ингибирования роста микроорганизмов по отношению к контрольным образцам после инкубирования тест-организмов в течение 24 ч. при температуре 37 °С.

Степень влияния эссенциальных элементов на динамические показатели роста бактериальной культуры определяли с использованием нефелометрического метода посредством регистрации оптической плотности суспензии с интервальными замерами через каждые 3 ч. до наступления трехкратно повторяющихся результатов, что свидетельствовало о выходе тест-организмов на максимальные показатели роста [21].

Уровень сорбционной емкости исследуемых микроорганизмов оценивали с использованием атомно-абсорбционной спектрофотометрии. В условиях монометалльного загрязнения субстрата в ГРМ-бульон в объеме 400 мл вносили рабочие концентрации раствора металла с последующим добавлением суспензии микроорганизмов и культивировали их до наступления стационарной фазы роста (время определялось на основании нефелометрического метода) при температуре 37 °С. Содержимое флаконов центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 мин. с последующим отделением супернатанта. Бактериальные клетки в структуре биомассы лизировали путем добавления 5% раствора КОН и выдерживали в водяной бане при температуре 98 °С в течение 30 мин. Анализировали как биомассу, так и супернатант в пересчете в процентах содержания металлов в тестируемых образцах от объема внесенного соединения в субстрат.

Влияние солей исследуемых элементов на морфометрические показатели бактериальных клеток, оценку уровня локализации металлов проводили с использованием атомно-силовой микроскопии с модифицированной методикой пробоподготовки [22].

Таблица 1. Рабочие концентрации исследуемых солей эссенциальных элементов

Table 1. Working concentrations of the studied salts of essential elements

Исследуемые штаммы	Исследуемые соли металлов					
	$\text{FeSO}_4$		$\text{CuSO}_4$		$\text{ZnSO}_4$	
	М	мг/мл	М	мг/мл	М	мг/мл
<i>B. subtilis</i> 534	0,063	9,49	0,031	4,99	0,031	5,05
<i>B. cereus</i> IP 5832	0,063	9,49	0,125	19,95	0,063	10,09
<i>B. licheniformis</i> ВКПМ В 7038	0,063	9,49	0,063	9,98	0,031	5,05

Все экспериментальные исследования проводились в 10-кратных повторях с последующей статистической обработкой (средний, ошибка среднего, t-критерий Стьюдента (определение достоверности полученных результатов) с использованием программ Excel (США) и AtteStat(США).

## Результаты и обсуждение / Results and discussion

В рамках проведенных исследований было установлено, что все исследуемые химические соединения эссенциальных элементов в концентрациях от 1,000 М до 0,250 М обладают выраженным ингибирующим действием в отношении тестируемых пробиотических штаммов рода *Bacillus sp.* (табл. 1).

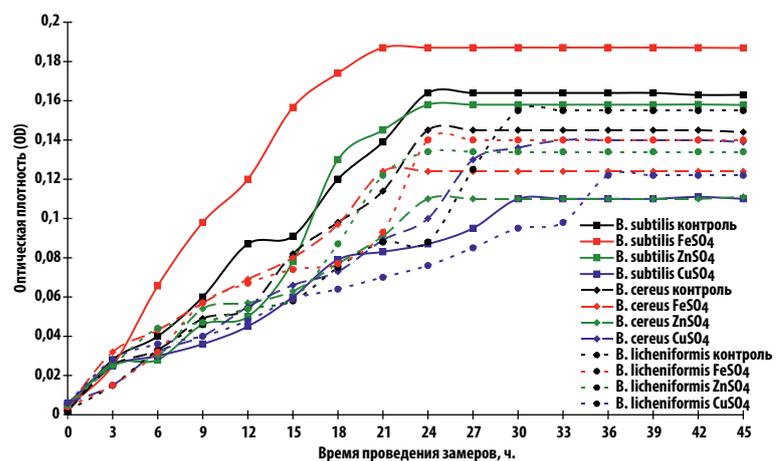
Наиболее высокие показатели толерантности к действию солей эссенциальных элементов установлены у штамма *B. cereus* IP 5832, превышающего аналогичные показатели по концентрации меди на 49,97% и 74,99% для *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 и *B. subtilis* 534 соответственно. В отношении цинка *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 и *B. subtilis* 534 имеют идентичные показатели резистентности к концентрации 0,031 М, в то время как *B. cereus* IP 5832 проявляет устойчивость к 0,063 М.

В отношении железа установлена родовая резистентность к концентрации  $\text{FeSO}_4$  0,063 М и менее. Полученные в ходе этого этапа реализации проекта данные позволили определить рабочие концентрации солей металлов для выполнения других задач, направленных на анализ влияния эссенциальных элементов на исследуемые штаммы *Bacillus sp.*

Второй этап реализации проекта направлен на влияние исследуемых химических соединений эссенциальных элементов на динамические показатели роста (рис. 1, 2) бактериальных штаммов рода *Bacillus sp.* Реализация данного этапа сопряжена с необходимостью

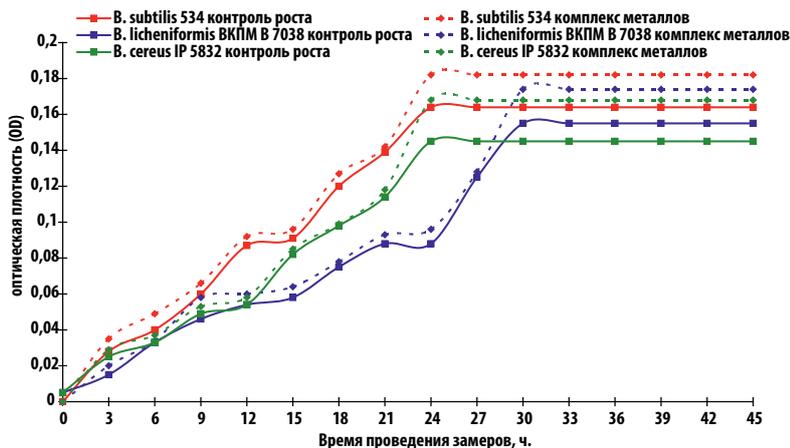
Рис. 1. Оценка влияния солей исследуемых металлов на динамические показатели роста исследуемых микроорганизмов

Fig. 1. Assessment of the effect of salts of the studied metals on the dynamic growth rates of the studied microorganisms



**Рис. 2.** Оценка динамических характеристик роста исследуемых микроорганизмов *Bacillus sp.* в присутствии комплекса металлов

**Fig. 2.** Assessment of the dynamic growth characteristics of the studied microorganisms *Bacillus sp.* in the presence of a metal complex



определения стационарной фазы роста в условиях периодического культивирования микроорганизмов, так как металлы активно сорбируются и биотрансформируются бактериальными клетками в фазу активного роста и начального этапа выхода роста популяции на плато.

В условиях монометалльного экспериментального загрязнения субстрата железом большинство тестируемых штаммов демонстрируют более высокие показатели оптической плотности по отношению к контролю с сокращением времени выхода популяции клеток на стационарную фазу, максимальные показатели оптической плотности регистрируются у штамма *B. subtilis* 534 как в присутствии железа, так и в интактном образце.

Гипотетически данный механизм можно объяснить высокими показателями сорбции, вследствие чего изменяется оптическая плотность бактериальной суспензии (рис. 1).

В условиях полиметалльного загрязнения все исследуемые штаммы демонстрируют схожую картину динамики роста популяции и имеют более высокие показатели оптической плотности в опытных образцах по отношению к контрольным группам, при этом следует отметить, что наиболее значимые различия наблюдаются по мере приближения стационарной фазы на 10,97% для *B. subtilis* 534 ( $p < 0,01$ ), 15,86% — *B. cereus* IP 5832 ( $p < 0,001$ ), 12,26% — *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 ( $p < 0,001$ ) соответственно (рис. 2). Обращает внимание отсутствие временного сдвига наступления стационарной фазы, в отличие от монометалльного загрязнения.

Основной блок экспериментальных исследований, направленный на оценку биоремедиационного потенциала исследуемых бактериальных штаммов, заключался в определении их сорбционной емкости в условиях моно- и полиметалльного загрязнения субстрата (рис. 3, 4).

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о высоком уровне сорбции железа и цинка из субстрата в условиях массивной катионной нагрузки, вызванной введением рабочих концентраций солей металлов в питательную среду.

В отношении железа максимальными показателями аккумуляции обладает *B. subtilis* 534 и составляет 47,98% ( $p < 0,01$ ) против 34,67% *B. cereus* IP 5832 и 33,80% *B. licheniformis* ВКПМ В 7038.

В отношении цинка максимальные показатели накопления элемента в биомассе регистрируются у штамма

*B. cereus* IP 5832 и составляют 44,96%, что на 2,46% превышает процент аккумуляции популяции клеток *B. subtilis* 534 и на 4,62% *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 соответственно.

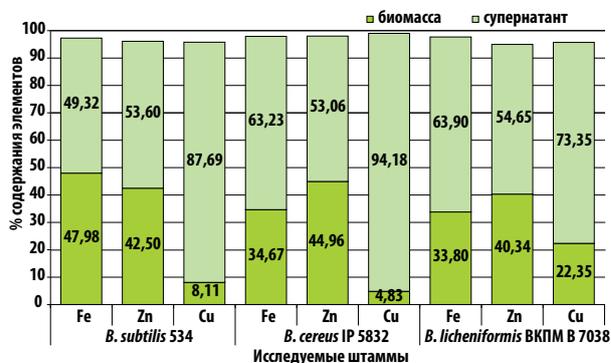
Анализ экспериментальных данных по оценке сорбционных характеристик исследуемыми микроорганизмами катионов меди из субстрата свидетельствует о выраженном доминировании *B. licheniformis* ВКПМ В 7038, так как уровень сорбции у данного штамма значительно превышает аналогичный показатель у *B. subtilis* 534 (на 14,24%) и *B. cereus* IP 5832 (на 17,52%) в абсолютных значениях.

В условиях полиметалльного загрязнения наблюдается общая тенденция к аккумуляции по отношению к показателям монометалльной нагрузки на субстрат, что проявляется максимальными показателями сорбции железа и цинка у *B. subtilis* 534 и меди у *B. licheniformis* ВКПМ В 7038.

Для определения локализации сорбируемых элементов была проведена атомно-силовая микроскопия по модифицированной методике пробоподготовки, базирующейся на культивировании бактериальных штаммов на плотных питательных средах. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о выраженном

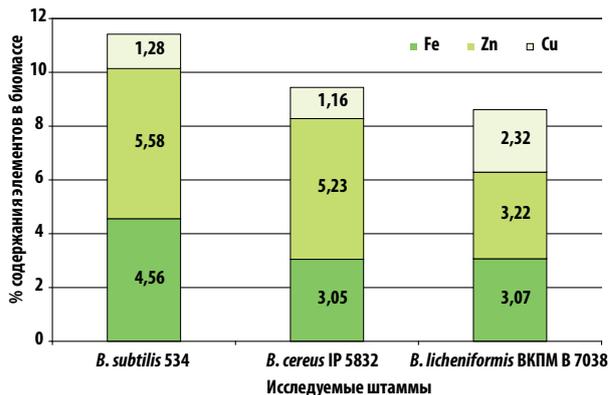
**Рис. 3.** Оценка сорбционной емкости *Bacillus sp.* в условиях экспериментального монометалльного загрязнения

**Fig. 3.** Assessment of the sorption capacity of *Bacillus sp.* under conditions of experimental monometallic contamination



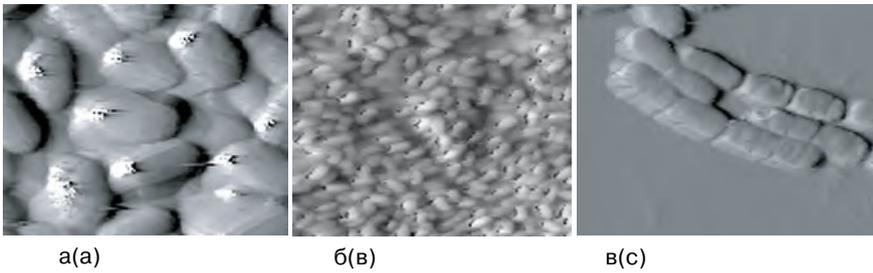
**Рис. 4.** Оценка избирательного накопления металлов из субстрата штаммами *Bacillus sp.* в условиях экспериментального полиметалльного загрязнения

**Fig. 4.** Assessment of selective accumulation of metals from the substrate strains of *Bacillus sp.* in the conditions of experimental polymetal contamination



**Рис. 5.** Оценка сорбционных характеристик меди и цинка штаммом *B. subtilis* 534 с использованием атомно-силовой микроскопии (увеличение: А — 7–11 мкм; Б — 22–34 мкм; В — 13,5–20,0 мкм): А — культивирование в присутствии минимальной нетоксической дозы  $\text{CuSO}_4$ ; Б — культивирование в присутствии минимальной нетоксической дозы  $\text{ZnSO}_4$ ; В — контрольный образец

**Fig. 5.** Evaluation of the sorption characteristics of copper and zinc by *B. subtilis* 534 strain using atomic force microscopy (magnification: A — 7–11 microns; B — 22–34 microns; C — 13.5–20.0 microns): A — cultivation in the presence of a minimum non-toxic dose of  $\text{CuSO}_4$ ; B — cultivation in the presence of a minimum non-toxic dose of  $\text{ZnSO}_4$ ; B — control sample



действию исследуемых металлов на морфометрические показатели исследуемых микроорганизмов (рис. 5), характеризующиеся изменением размера, формы и способа локализации по отношению друг к другу.

Анализируя данные (рис. 5), следует отметить не только изменение морфологии клеток изучаемой культуры (сокращение длины (рис. 5А), отсутствие построения в цепочки (рис. 5А, 5Б), но и наличие металлизированных комплексов на поверхности бактериальных клеток, что наиболее явно представлено на рисунке 5А. При этом следует отметить, что сорбция меди осуществляется не всей поверхностью, а локализуется на определенных участках (на одном из полюсов).

Следует отметить, что визуализация представленных данных позволяет с высокой долей уверенности судить о формировании ультрадисперсных смешанолигандных комплексов на бактериальной поверхности.

Представители рода *Bacillus* sp. обладают высокими показателями антагонистической активности. В условиях проводимого эксперимента была проведена оценка влияния эссенциальных элементов на антагонистические характеристики исследуемых штаммов в модельном эксперименте *in vitro* в отношении *S. aureus* и *E. coli*.

Полученные данные контрольного образца свидетельствуют о выраженном ингибирующем действии продуктов жизнедеятельности (вторичных метаболитов) пробиотических штаммов в отношении тест-организмов, максимальные показатели диаметрально удаленного ингибирования роста *S. aureus* регистрируются при внесении в лунку супернатанта после 48-часового культивирования *B. subtilis* 534 (табл. 2).

**Таблица 2.** Оценка влияния исследуемых элементов на антагонистические характеристики *Bacillus* sp. по отношению к тест-организмам

**Table 2.** Evaluation of the effect of the studied elements on the antagonistic characteristics of *Bacillus* sp. in relation to test organisms

Фактор воздействия	Тест-организмы	Зоны ингибирования роста тест-организмов, мм		
		<i>B. subtilis</i> 534	<i>B. cereus</i> IP 5832	<i>B. licheniformis</i> ВКПМ В 7038
Контроль	<i>S. aureus</i>	14,80 ± 0,60	13,30 ± 0,49	11,50 ± 0,34
	<i>E. coli</i>	9,30 ± 0,49	9,50 ± 0,50	6,80 ± 0,47
$\text{ZnSO}_4$	<i>S. aureus</i>	9,30 ± 0,66*	8,60 ± 0,33*	6,30 ± 0,42**
	<i>E. coli</i>	9,00 ± 0,68*	9,60 ± 0,66**	6,80 ± 0,79**
$\text{CuSO}_4$	<i>S. aureus</i>	5,5 ± 0,56***	5,50 ± 0,42***	4,80 ± 0,54**
	<i>E. coli</i>	6,20 ± 0,80*	5,00 ± 0,73**	6,00 ± 0,6**
$\text{FeSO}_4$	<i>S. aureus</i>	13,200 ± 0,54	12,30 ± 0,61	9,80 ± 0,54*
	<i>E. coli</i>	8,90 ± 1,33	12,60 ± 0,40**	9,30 ± 0,61*

Примечание: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Внесение в субстрат солей исследуемых элементов у данного микроорганизма вызывает негативное влияние на уровень активности вторичных метаболитов как в отношении грамположительного, так и грамотрицательного тест-организма. Наиболее выраженное влияние оказывает медь, снижая степень антагонистической активности на 62,84% ( $p < 0,001$ ) в отношении *S. aureus* и на 33,33% ( $p < 0,05$ ) в отношении *E. coli*.

Экспериментально установлено, что культивирование штаммов *B. cereus* IP 5832 и *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 в присутствии  $\text{FeSO}_4$  в концентрации 9,49 мг/мл увеличивает уровень антагонистической активности указанных штаммов в отношении *E. coli* на 32,63% ( $p < 0,01$ ) и на 36,77% ( $p < 0,05$ ). На уровне гипотезы можно предположить, что присутствие железа увеличивает проницаемость мембраны грамотрицательной клетки, вследствие чего возрастает степень ингибирующего действия антибиотикоподобных соединений, продуцируемых бактериальными штаммами *Bacillus*.

### Выводы/Conclusions

Проведенный системный анализ комплексной экспериментальной оценки влияния эссенциальных элементов на представителей рода *Bacillus* позволяет с высоким уровнем достоверности констатировать, что все исследуемые штаммы обладают идентичным уровнем резистентности в отношении железа (9,49 мг/мл). Наиболее высокие показатели устойчивости к меди и цинку регистрируются у *B. cereus* IP 5832, для которого рабочие концентрации солей данных элементов составили 19,95 мг/мл и 10,09 мг/мл соответственно.

Присутствие солей в субстрате оказывает выраженное действие на динамические показатели роста. Однако следует отметить, что данное явление может быть обусловлено высокими показателями сорбции железа и цинка, что в свою очередь влияет на показатели оптической плотности как отдельных клеток, так и популяции в целом, что подтверждается результатами исследования сорбционной емкости исследуемых штаммов.

Установлено, что все исследуемые пробиотические штаммы рода *Bacillus* активно сорбируют из субстрата железо до 47,98% и цинк до 44,96%. Однако в отношении меди относительно высокую аккумулялирующую активность проявляет *B. licheniformis* ВКПМ В 7038, содержание металла в биомассе которого составило 22,35%, против 8,11% у *B. subtilis* 534 и 4,83% у *B. cereus* IP 5832.

Анализ данных влияния исследуемых элементов на антагонистическую активность свидетельствует о том, что присутствие меди и цинка в субстрате оказывает негативное влияние на выработку антибиотикоподобных соединений всеми исследуемыми штаммами. Положительная динамика наблюдается лишь в присутствии  $\text{FeSO}_4$  в концентрации 9,49 мг/мл, что увеличивает показатели антагонистической активности штаммов *B. cereus* IP 5832 и *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 в отношении *E. coli* на 32,63% ( $p < 0,01$ ) и 36,77% ( $p < 0,05$ ).

Все авторы несут ответственность за работу и представленные данные. Все авторы внесли равный вклад в работу. Авторы в равной степени принимали участие в написании рукописи и несут равную ответственность за плагиат. Авторы объявили об отсутствии конфликта интересов.

All authors bear responsibility for the work and presented data. All authors made an equal contribution to the work. The authors were equally involved in writing the manuscript and bear the equal responsibility for plagiarism. The authors declare no conflict of interest.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-10079. <https://rscf.ru/project/23-26-10079/>

## FUNDING

The research was carried out at the expense of the grant of the Russian Science Foundation No. 23-26-10079. <https://rscf.ru/project/23-26-10079/>

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Malik A. Metal bioremediation through growing cells. *Environment International*. 2004; 30(2): 261–278. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2003.08.001>
2. Burmistrov D.E. *et al.* Bacteriostatic and cytotoxic properties of composite material based on ZnO nanoparticles in PLGA obtained by low temperature method. *Polymers*. 2022; 14(1): 49. <https://doi.org/10.3390/polym14010049>.
3. Astashev M.E. *et al.* Antibacterial behavior of organosilicon composite with nano aluminum oxide without influencing animal cells. *Reactive and Functional Polymers*. 2022; 170: 105143. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.105143>.
4. Chausov D.N. *et al.* Synthesis of a Novel, Biocompatible and Bacteriostatic Borosiloxane Composition with Silver Oxide Nanoparticles. *Materials*. 2022; 15(2). <https://doi.org/10.3390/ma15020527>
5. Yang T., Chen M.-L., Wang J.-H. Genetic and chemical modification of cells for selective separation and analysis of heavy metals of biological or environmental significance. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2015; 66: 90–102. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.11.016>
6. Fomina M., Gadd G.M. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. *Bioresource Technology*. 2014; 160: 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.102>
7. Mosa K.A., Saadoun I., Kumar K., Helmy M., Dhankher O.P. Potential Biotechnological Strategies for the Cleanup of Heavy Metals and Metalloids. *Frontiers in Plant Science*. 2016; 7: 303. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00303>
8. Aronbaev S. Aronbaev D. Biosorption of heavy metal ions by the cell walls of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in their combined presence. *E3S Web of Conferences*. EDP Sciences. 2023; 458: 02024. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202345802024>.
9. Gavrilescu M. Removal of Heavy Metals from the Environment by Biosorption. *Engineering in Life Sciences*. 2004; 4(3): 219–232. <https://doi.org/10.1002/elsc.200420026>
10. Liu S., Suflija J.M. Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation. *Trends in Biotechnology*. 1993; 11(8): 344–352. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(93\)90157-5](https://doi.org/10.1016/0167-7799(93)90157-5)
11. Ayangbenro A.S., Babalola O.O. A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2017; 14(1): 94. <https://doi.org/10.3390/ijerph14010094>
12. Pystin V. *et al.* The rationale for the recovery of the territories contaminated by organomineral waste. *E3S Web of Conferences: Actual Problems of Ecology and Environmental Management (APEEM 2023)*. EDP Sciences. 2023; 407: 03008. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202340703008>
13. Takaeva M. Biotechnology of solid waste disposal (anaerobic processing) in the urban environment. *BIO Web of Conferences*. 2023; 76: 04001. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20237604001>
14. Salishcheva O. *et al.* Biodegradation of organic compounds in wastewater. *Bio web of Conferences: Agro-Bio-Technologies 2023 – Innovative Solutions for the Development of the Industry*. EDP Sciences. 2023; 64: 01003. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20236401003>
15. Zheng S., Wang B., Li Y., Liu F., Wang O. Electrochemically active iron (III)-reducing bacteria in coastal riverine sediments. *Journal of Basic Microbiology*. 2017; 57(12): 1045–1054. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700322>
16. Zhan Y. *et al.* Iron and total organic carbon shape the spatial distribution pattern of sediment Fe(III) reducing bacteria in a volcanic lake, NE China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2021; 37(9): 155. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03125-z>
17. Shilkina S., Baraboshkina A. Bioaugmentation in wastewater treatment: Features of technology and automation. *International Scientific and Practical Symposium "The Future of the Construction Industry: Challenges and Development Prospects": E3S Web of Conferences*. EDP Sciences. 2023; 457: 02022. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202345702022>.
18. Myrzaliev S.K. *et al.* Study of the dependence of component composition — degree of wastewater purification by adsorbents based on plant raw materials to control the content of priority pollutants in water bodies. *BIO Web of Conferences*. 2024; 82: 06010. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20248206010>.
19. Sharma V., Singh P., Trivedi B., Kamboj N., Bisht A., Pandey N. Assessment of Iron Biosorption Potential by Live and Dead Biomass of *Bacillus subtilis* (MN093305) from Aqueous Solution. *Indian Journal of Microbiology*. 2024; 64(1): 153–164. <https://doi.org/10.1007/s12088-023-01144-y>

## REFERENCES

1. Malik A. Metal bioremediation through growing cells. *Environment International*. 2004; 30(2): 261–278. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2003.08.001>
2. Burmistrov D.E. *et al.* Bacteriostatic and cytotoxic properties of composite material based on ZnO nanoparticles in PLGA obtained by low temperature method. *Polymers*. 2022; 14(1): 49. <https://doi.org/10.3390/polym14010049>.
3. Astashev M.E. *et al.* Antibacterial behavior of organosilicon composite with nano aluminum oxide without influencing animal cells. *Reactive and Functional Polymers*. 2022; 170: 105143. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2021.105143>.
4. Chausov D.N. *et al.* Synthesis of a Novel, Biocompatible and Bacteriostatic Borosiloxane Composition with Silver Oxide Nanoparticles. *Materials*. 2022; 15(2). <https://doi.org/10.3390/ma15020527>
5. Yang T., Chen M.-L., Wang J.-H. Genetic and chemical modification of cells for selective separation and analysis of heavy metals of biological or environmental significance. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2015; 66: 90–102. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.11.016>
6. Fomina M., Gadd G.M. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. *Bioresource Technology*. 2014; 160: 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.102>
7. Mosa K.A., Saadoun I., Kumar K., Helmy M., Dhankher O.P. Potential Biotechnological Strategies for the Cleanup of Heavy Metals and Metalloids. *Frontiers in Plant Science*. 2016; 7: 303. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00303>
8. Aronbaev S. Aronbaev D. Biosorption of heavy metal ions by the cell walls of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in their combined presence. *E3S Web of Conferences*. EDP Sciences. 2023; 458: 02024. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202345802024>.
9. Gavrilescu M. Removal of Heavy Metals from the Environment by Biosorption. *Engineering in Life Sciences*. 2004; 4(3): 219–232. <https://doi.org/10.1002/elsc.200420026>
10. Liu S., Suflija J.M. Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation. *Trends in Biotechnology*. 1993; 11(8): 344–352. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(93\)90157-5](https://doi.org/10.1016/0167-7799(93)90157-5)
11. Ayangbenro A.S., Babalola O.O. A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2017; 14(1): 94. <https://doi.org/10.3390/ijerph14010094>
12. Pystin V. *et al.* The rationale for the recovery of the territories contaminated by organomineral waste. *E3S Web of Conferences: Actual Problems of Ecology and Environmental Management (APEEM 2023)*. EDP Sciences. 2023; 407: 03008. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202340703008>
13. Takaeva M. Biotechnology of solid waste disposal (anaerobic processing) in the urban environment. *BIO Web of Conferences*. 2023; 76: 04001. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20237604001>
14. Salishcheva O. *et al.* Biodegradation of organic compounds in wastewater. *Bio web of Conferences: Agro-Bio-Technologies 2023 – Innovative Solutions for the Development of the Industry*. EDP Sciences. 2023; 64: 01003. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20236401003>
15. Zheng S., Wang B., Li Y., Liu F., Wang O. Electrochemically active iron (III)-reducing bacteria in coastal riverine sediments. *Journal of Basic Microbiology*. 2017; 57(12): 1045–1054. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700322>
16. Zhan Y. *et al.* Iron and total organic carbon shape the spatial distribution pattern of sediment Fe(III) reducing bacteria in a volcanic lake, NE China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2021; 37(9): 155. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03125-z>
17. Shilkina S., Baraboshkina A. Bioaugmentation in wastewater treatment: Features of technology and automation. *International Scientific and Practical Symposium "The Future of the Construction Industry: Challenges and Development Prospects": E3S Web of Conferences*. EDP Sciences. 2023; 457: 02022. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202345702022>.
18. Myrzaliev S.K. *et al.* Study of the dependence of component composition — degree of wastewater purification by adsorbents based on plant raw materials to control the content of priority pollutants in water bodies. *BIO Web of Conferences*. 2024; 82: 06010. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20248206010>.
19. Sharma V., Singh P., Trivedi B., Kamboj N., Bisht A., Pandey N. Assessment of Iron Biosorption Potential by Live and Dead Biomass of *Bacillus subtilis* (MN093305) from Aqueous Solution. *Indian Journal of Microbiology*. 2024; 64(1): 153–164. <https://doi.org/10.1007/s12088-023-01144-y>

20. Krishna Kanamarlapudi S.L.R., Muddada S. Structural Changes of *Bacillus subtilis* Biomass on Biosorption of Iron (II) from Aqueous Solutions: Isotherm and Kinetic Studies. *Polish Journal of Microbiology*. 2019; 68(4): 549–558. <https://doi.org/10.33073/pjm-2019-057>

21. Сизентцов А.Н., Бибартцева Е.В., Синеок Д.М. Сравнительная оценка уровня толерантности почвенных изолятов *Bacillus subtilis* в отношении химических соединений меди. *Аграрная наука*. 2022; (10): 86–90. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2022-363-10-86-90>

22. Sizentsov A., Davydova O., Sizentsov Y., Barysheva E. Assessment the technology for heavy metal biotoxicity and biosorption by bacterial cells. *Biochemical and Cellular Archives*. 2021; 21(1): 901–906.

20. Krishna Kanamarlapudi S.L.R., Muddada S. Structural Changes of *Bacillus subtilis* Biomass on Biosorption of Iron (II) from Aqueous Solutions: Isotherm and Kinetic Studies. *Polish Journal of Microbiology*. 2019; 68(4): 549–558. <https://doi.org/10.33073/pjm-2019-057>

21. Sizentsov A.N., Bibartseva E.V., Sineok D.M. Comparative assessment of the level of tolerance of *Bacillus subtilis* soil isolates in relation to chemical copper compounds. *Agrarian science*. 2022; (10): 86–90 (in Russian). <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2022-363-10-86-90>

22. Sizentsov A., Davydova O., Sizentsov Y., Barysheva E. Assessment the technology for heavy metal biotoxicity and biosorption by bacterial cells. *Biochemical and Cellular Archives*. 2021; 21(1): 901–906.

#### ОБ АВТОРАХ

##### Алексей Николаевич Сизентцов

кандидат биологических наук,  
доцент кафедры биохимии и микробиологии  
asizen@mail.ru,  
<https://orcid.org/0000-0003-1099-3117>

##### Людмила Вячеславовна Галактионова

кандидат биологических наук, доцент,  
заведующая кафедрой биологии и почвоведения  
anilova.osu@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-0781-3752>

##### Ольга Константиновна Давыдова

кандидат биологических наук,  
доцент кафедры биохимии и микробиологии  
okdavydova@yahoo.com  
<https://orcid.org/0000-0002-1067-0337>

Оренбургский государственный университет,  
пр-т Победы, 13, Оренбург, 460018, Россия

#### ABOUT THE AUTHORS

##### Aleksey Nikolaevich Sizentsov

Candidate of Biological Sciences, Associate Professor  
of the Department of Biochemistry and Microbiology  
asizen@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-1099-3117>

##### Lyudmila Vyacheslavovna Galaktionova

Candidate of Biological Sciences, Associate Professor,  
Head of the Department of Biology and Soil Science  
anilova.osu@mail.ru  
<https://orcid.org/0000-0003-0781-3752>

##### Olga Konstantinovna Davydova

Candidate of Biological Sciences, Associate Professor  
of the Department of Biochemistry and Microbiology  
okdavydova@yahoo.com  
<https://orcid.org/0000-0002-1067-0337>

Orenburg State University,  
13 Pobedy Ave., Orenburg, 460018, Russia



# МАК 2025

Межрегиональная  
Агропромышленная  
Конференция



12+

РЕКЛАМА

5–6 ФЕВРАЛЯ 2025 | СТАТЬ ПАРТНЁРОМ

РАЗДЕЛЫ МАК: ЗОНА ПАРТНЕРОВ

#### РАСТЕНИЕВОДСТВО

- ◆ Селекция и семеноводство
- ◆ Удобрения
- ◆ Гербициды
- ◆ Средства защиты растений

#### ЖИВОТНОВОДСТВО

- ◆ Корма и кормовые добавки
- ◆ Селекция, генетика, репродукция
- ◆ Оборудование для содержания и ухода

#### УСЛУГИ ДЛЯ АПК

- ◆ Технологии
- ◆ Финансирование и страхование бизнеса
- ◆ Цифровизация и оптимизация процессов
- ◆ Логистика

Официальная поддержка:



Министерство  
сельского хозяйства  
Челябинской области

Организатор:



ПЕРВОЕ  
ВЫСТАВОЧНОЕ  
ОБЪЕДИНЕНИЕ

[www.makural.ru](http://www.makural.ru)

г. Челябинск, Гранд Отель Видгоф  
+7 (351) 755-55-10