

УДК 504.054:593.17

ВЫЖИВАЕМОСТЬ РАВНОРЕСНИЧНЫХ ИНФУЗОРИЙ *PARAMECIUM CAUDATUM* В ПРИСУТСТВИИ НАНОЧАСТИЦ И ИОНОВ СЕРЕБРА *

Анастасия Андреевна Асанова ¹, Вадим Игоревич Полонский ²

ФГБОУ ВО Красноярский государственный аграрный университет
660049, Красноярск, ул. Мира, д. 90

¹ – аспирант каф. ландшафтной архитектуры, ботаники, агроэкологии; e-mail: nastasia.asanova@gmail.com

² – д. б. н., проф. каф. ландшафтной архитектуры, ботаники, агроэкологии, проф.; e-mail: vadim.polonskiy@mail.ru

*В работе исследованы токсические свойства наночастиц серебра размером 18 нм и ионов серебра по отношению к *Paramecium caudatum*. Методика основана на определении смертности инфузорий при воздействии суспензии наночастиц или раствора азотнокислого серебра в 20 минутной, 6- и 24-часовой экспозиции. В качестве критерия токсичности использовалось значение ЛД₅₀, равное концентрации наночастиц, при которой смертность инфузорий по отношению к контролю достигала 50 %. Инфузории проявили более высокую чувствительность к наночастицам по сравнению с их ионами, значения ЛД₅₀ для наночастиц серебра составили 13,0, 10,3 и 0,8 мг/дм³ в 20-минутной, 6- и 24-часовой экспозиции, соответственно. Токсичность ионов оказалась ниже, чем токсичность наночастиц в 2 раза в 20-минутной, 6-часовой экспозиции и почти в 19 раз в 24-часовой экспозиции.*

Ключевые слова: наночастицы серебра, ионы серебра, инфузории *P. caudatum*, биотестирование.

Наночастицы серебра являются самым используемым материалом в потребительских продуктах среди техногенных наночастиц [1].

Наносеребро обладает выраженным биоцидным действием, а также обладает высокой электро- и теплопроводностью. Эти и другие уникальные физико-химические свойства позволяют его использовать в различных отраслях потребительских товаров: фильтры для воды, краски, косметика, дезодоранты, одежда, текстиль, пищевая упаковка, функционализированные пластмассы, медицинские устройства, раневые повязки, электроприборы, такие как стиральные машины и холодильники, моющие средства, биосенсоры и биомедицинские продукты и др. [2].

Согласно опросу компаний, производящих или использующих наночастицы, глобальный объем производства наноразмерного серебра превышает 55 тонн в год [3], однако фактические данные могут значительно превышать указанную оценку. В условиях быстрого увеличения объемов вышеперечисленных товаров наносеребро представляет по-

тенциальную угрозу для человека и окружающей среды, и возможные риски должны быть оценены.

В настоящее время проводится множество исследований токсичности наночастиц на различных тест-объектах, среди которых водные рачки, бактерии, одноклеточные водоросли, рыбы, нематоды и др. [4]. Однако эти данные трудно сопоставимы по видовым спецификам объекта, концентрациям наночастиц и их физико-химическим свойствам.

Токсическое действие наночастиц серебра рядом авторов объясняется их способностью образовывать свободные ионы [5]. В нашей предыдущей работе [6] было показано, что воздействие ионов серебра на одноклеточную водоросль *Chlorella vulgaris* на два порядка сильнее по сравнению с наночастицами и на порядок – по отношению к высшему растению *Avena sativa*.

Целью настоящей работы являлось сравнение токсического эффекта наночастиц серебра и их ионов по отношению к *Paramecium caudatum*.

Методика. Для оценки токсичности наночастиц серебра использовали коммерческий препарат «Наносеребро «Аргитос» (ООО НПП «Синтек Нано», Россия), представляющий собой водный раствор наночастиц размером 18 нм, с концентрацией 250 ppm.

Образец, содержащий ионы серебра, получали растворением азотнокислого серебра (квалификации х.ч.) в дистиллированной воде в концентрации 0,25 г/дм³.

* Исследование выполнено при поддержке краевого государственного автономного учреждения «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности» в рамках участия в прохождении стажировки «Современные технологии биотестирования в экологическом контроле с использованием инфузорий».

Исследуемые концентрации растворов наночастиц серебра и азотнокислого серебра готовились 2-кратным разведением исходных.

Оценка устойчивости равноресничных инфузорий (*Paramecium caudatum*) к воздействию наночастиц проводилась по [7]. Данная методика основана на определении смертности инфузорий при воздействии водных дисперсных систем, содержащих тестируемые высокодисперсные материалы (опыт) и не содержащих тестируемые материалы (контроль).

Инфузории культивировали в десятикратном разведении среды Лозина-Лозинского, приготовленной растворением следующих навесок солей в 1 дм³ дистиллированной воды: 1,0 г NaCl; 0,1 г KCl; 0,1 г MgSO₄; 0,1 г CaCl₂ × H₂O; 0,2 г NaHCO₃. В качестве корма использовали 3 см³ водной суспензии хлебопекарных дрожжей.

Для проведения биотестирования применяли плоскодонный культуральный планшет с лунками. Стакан с отмытой культурой инфузорий в начале стационарной фазы роста располагали рядом с предметным столиком микроскопа. Пастеровской пипеткой отлавливали по 10–12 особей и переносили в лунки планшета. После помещения инфузорий в планшеты в контрольные лунки приливали по 0,2 см³ культивационной среды, а в опытные – по 0,2 см³ тестируемой пробы. Отмечали время начала биотестирования, через 20 мин. подсчитывали количество выживших и погибших особей под микроскопом. Выжившими считались инфузории, которые свободно перемещались в толще воды. Обездвиженных особей относили к погибшим. Далее планшет помещали в инкубатор и выдерживали при температуре (22±2)°C без освещения. В процессе экспозиции ни в контрольных, ни в опытных лунках кормление инфузорий не осуществляли. По истечении 6 и 24 ч под микроскопом вновь производили подсчет выживших и погибших особей.

В качестве критерия токсичности использовали показатель ЛД₅₀, определяемый графически, как концентрация исследуемого раствора, при которой индекс токсичности составлял 50%.

Индекс токсичности I вычисляли как отношение величины смертности парамеций в присутствии тестируемой пробы по сравнению с контролем (в %):

$$I = (N_k - N_o) / N_k \cdot 100\%,$$

где N_k и N_o – количество парамеций после экспозиции в контроле и в опыте, соответственно. Гибель в контроле не превышала 10 % организмов.

Каждый вариант эксперимента проводился в 4 параллелях (повторностях). При этом каждая серия экспериментов была выполнена не менее 3 раз.

При статистической обработке полученных результатов использовали t-критерий Стьюдента. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$.

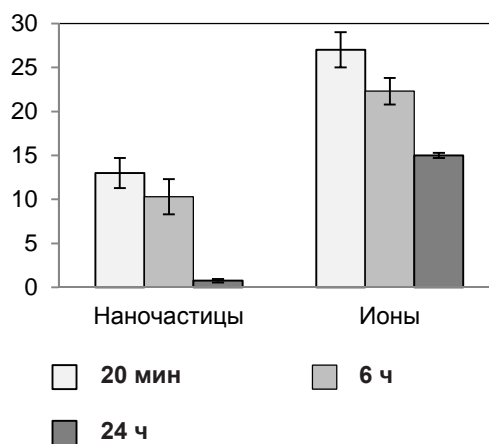


Рисунок. Параметр ЛД₅₀ наночастиц серебра и ионов серебра в отношении равноресничных инфузорий в 20-минутной, 6- и 24-часовой экспозиции.

Результаты и обсуждение. Оценка острой токсичности наночастиц серебра и их ионов по отношению к инфузориям в условиях 20-минутной экспозиции показала, что наночастицы серебра оказывали более сильное токсическое воздействие по сравнению их ионами: значения ЛД₅₀ составили 13 и 27 мг/дм³ соответственно (рисунок). Спустя 6 ч токсичность наночастиц и ионов серебра увеличилась незначительно: концентрации, при которых наблюдалась гибель 50% особей, составили 10,3 и 23,3 мг/дм³ соответственно.

В исследованиях других авторов наносеребро оказалось менее токсичным [8]. Так, было установлено, что концентрация, при которой происходит 50%-ная гибель в 1-часовой экспозиции, составила 39 мг/дм³. При этом ионная форма оказалась более токсичной – полную гибель одноклеточного организма вызывала концентрация серебра 0,4 мг/дм³.

Известно, что в водном растворе наночастиц помимо самих наночастиц образуются наночастицы серебра с адсорбированными на их поверхности ионами, а также свободные ионы серебра [9]. В нашем эксперименте было показано, что токсический эффект наночастиц серебра по отношению к *P. caudatum* в 20-минутной и 6-часовой экспозиции вдвое превосходил таковой для ионов серебра. При использовании 24-часовой экспозиции токсичность наночастиц превысила токсичность ионов почти в 19 раз, что, скорее всего, свидетельствует о том, что механизм токсичности наночастиц по отношению к инфузориям обусловлен взаимодействием со всеми формами серебра.

В 24-часовой экспозиции значения ЛД₅₀ для наночастиц и ионов составили 0,8 и 15,1 мг/дм³ соответственно. Так, за сутки токсичность наночастиц серебра возросла почти в 17 раз. Скорее всего, данный эффект вызван медленным раство-

рением в водной среде наночастиц с образованием свободных ионов, которые вносят дополнительный вклад в токсическое воздействие в условиях длительной временной экспозиции [8]. При этом сами ионы серебра оказывают мгновенный токсический эффект, который почти не увеличивается во времени: в нашем эксперименте токсичность за сутки увеличилась менее чем в 2 раза.

Заключение. Наночастицы серебра и их ионы оказывают острое токсическое воздействие на инфузории *P. caudatum*. Значения LD_{50} для наночастиц серебра составили 13,0, 10,3 и 0,8 мг/дм³ в 20-минутной, 6- и 24-часовой экспозиции соответственно. Токсичность наночастиц в отношении исследуемых тест-объектов превышает токсичность ионов в 2 раза в 20-минутной, 6-часовой экспозиции и почти в 19 раз в 24-часовой экспозиции.

Литература:

1. Zhang C., Hu Z., Deng B. Silver nanoparticles in aquatic environments: Physicochemical behavior and antimicrobial mechanisms // *Water research*. – 2016. – Т. 88. – С. 403–427.
2. Consumer products inventory: an inventory of nanotechnology-based consumer products introduced on the market. Washington DC: Woodrow Wilson Center: Project on Nanotechnology; 2017. URL: <http://www.nanotechproject.org/> [accessed 25.11.17].
3. Piccinno F., Gottschalk F., Seeger S., Nowack B.J. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2012. – Т. 14. – №. 9. – С. 1109.
4. Juganson K., Ivask A., Blinova I., Mortimer M., Kahru A. NanoE-Tox: New and in-depth database concerning ecotoxicity of nanomaterials // *Beilstein journal of nanotechnology*. – 2015. – Т. 6. – №. 1. – С. 1788–1804.
5. Sakamoto M., Ha J., Yoneshima S., Kataoka C., Tatsuta H., Kashiwada S. Free silver ion as the main cause of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles to cladocerans // *Archives of environmental contamination and toxicology*. – 2015. – Т. 68. – №. 3. – С. 500–509.
6. Асанова А. А., Полонский В. И. Воздействие наночастиц серебра на фотосинтезирующие организмы // *Достижения науки и техники АПК*. – 2017. – №. 8. – С. 12–15.
7. ФП.1.39.2006.02506 (ПНД Ф 14.1:2:3.13-06, 16.1:2.3:3.10-06) (2 редакция). – М.: МГУ. – 2008. – 34 с.
8. Kittler S., Greulich C., Diendorf J., Köller M., Epple M. Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions // *Chem. Mater*. – 2010. – Т. 22. – №. 16. – С. 4548–4554.
9. Liu J., Hurt R. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids // *Environmental science & technology*. – 2010. – Т. 44. – №. 6. – С. 2169–2175.

Asanova A.A., Polonskiy V.I.

SURVIVAL OF INFUSORIA *PARAMECIUM CAUDATUM* IN THE PRESENCE OF SILVER NANOPARTICLES AND IONS

Toxic effect of silver nanoparticles with size of 18 nm and silver ions was studied using Paramecium caudatum. The method was based on mortality testing of infusoria upon nanoparticles or silver nitrate in a 20-minute, 6-hour and 24-hour exposure. The degree of negative impact of nanoparticles or silver ions was evaluated based on the effective concentration causing mortality of infusoria by 50 % (LD₅₀). The higher sensitivity of infusoria to nanoparticles than their ions was shown; LD₅₀ values for silver nanoparticles were 13.0, 10.3 and 0.8 mg/dm³ in a 20-minute, 6-hour and 24-hour exposure, respectively. The toxicity of the ions was 2 times lower than the toxicity of the nanoparticles in 20-minute, 6-hour exposure and almost 19 times lower in 24-hour exposure.

Keywords: silver nanoparticles, silver ions, *P. caudatum*, biotest.