

На правах рукописи



Асанова Анастасия Андреевна

**ЭКОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ
ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ, ЗАГРЯЗНЕННОЙ
НАНОМАТЕРИАЛАМИ**

03.02.08 – Экология (биология)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владимир – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Красноярский государственный аграрный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор,
Полонский Вадим Игоревич

Официальные оппоненты: **Сизова Елена Анатольевна**
доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Оренбургский государственный университет», профессор кафедры биологии и почвоведения

Стом Дэвард Иосифович
доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет», профессор кафедры зоологии позвоночных и экологии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук»

Защита состоится «___» _____ 2019г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.025.07 при ФГБОУ ВО «Владимирский государственный университет имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых» по адресу: 600000, г. Владимир, ул. Горького,87,ВлГУ, корп.1, ауд.335.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ВлГУ и на сайте <http://diss.vlsu.ru/>

Отзывы на автореферат в двух экземплярах, заверенные печатью, можно присылать по адресу: 600000, г. Владимир, ул. Горького,87, ВлГУ, кафедра биологии и экологии.

Автореферат разослан «___» _____ 2019г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Кулагина Екатерина Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Нанотехнологии являются быстро развивающейся областью науки и, по мнению экспертов, в скором будущем станут технологиями широкого применения и основой нового технологического уклада. С каждым днем в результате расширения области применения материалов, содержащих наноразмерные частицы, увеличиваются объемы их промышленного производства, достигая в настоящий момент в развитых странах нескольких тысяч тонн в год (Piccinno et al., 2012).

Очевидно, что безусловный положительный вклад наноматериалов в мировую науку и технику не означает отсутствие негативных последствий для человека и окружающей среды. Поэтому, чем активнее внедряются разработки в то или иное производство, тем большее значение приобретают результаты исследований, которые можно использовать для определения мер безопасности.

Современные наноматериалы, входящие в состав потребительских продуктов, являются источником наночастиц, которые попадают в окружающую среду на всех этапах их жизни: изготовления, использования и утилизации в составе конечного продукта (Kaegi et al., 2008; Farkas et al., 2011; Windler et al., 2012; Kunniger et al., 2014; Lombi et al., 2014). Присутствуя в атмосфере, они оседают на растениях, а также становятся контаминантами поверхностного слоя почвы. Кроме того, наночастицы могут быть внесены в почву в качестве удобрений, в составе осадков, сточных и канализационных вод (Khot et al., 2012; Барановский, 2017; Baker et al., 2017; Duhan et al., 2017; Thakur et al., 2018). Наночастицы, загрязняющие почву, оказывают свое воздействие на организмы, обитающие в ней.

Частично вымываясь из почвы и атмосферы, а также преодолевая очистные сооружения, наночастицы попадают в природные водоемы и мировой океан, где могут оказывать влияние на представителей водной экосистемы (Batley et al., 2013; Keller et al., 2013; McGillicuddy et al., 2016).

Наночастицы, преодолевая мембраны растительных и животных клеток могут оказывать влияние на цитоплазматические ферментные системы, а также на ферменты пищеварительной системы высших животных и человека, попадая в организм вместе с кормом или пищей.

Имеющиеся в литературе данные о влиянии наночастиц на биологические объекты и ферментативные системы крайне неоднозначны или противоречивы. При этом практически не исследована зависимость ответных реакций тест объектов на присутствие наночастиц от уровня их биологической организации и среды обитания, что затрудняет анализ риска воздействия загрязнений наночастицами природных экосистем.

Цель работы – оценка влияния техногенных наночастиц на окружающую среду по ответным реакциям биологических объектов, различающихся по уровням биологической организации и средам обитания.

Задачи исследования:

- установить токсичность наночастиц серебра, двуокиси титана и кремния в аспекте их опасности для окружающей среды и человека;
- оценить чувствительность объектов различной биологической организации и мест обитания на присутствие наночастиц серебра, двуокиси титана и кремния окружающей среде;
- определить влияние размера наночастиц диоксида кремния на оказываемый ими биологический эффект.

Научная новизна исследований. Показано, что существует риск гибели живых организмов и снижения активности ферментных систем в результате попадания наночастиц в окружающую среду, при этом степень токсичности наночастиц снижается в ряду: серебро, двуокись титана, двуокись кремния. Впервые доказано отсутствие зависимости ответных реакций тест-объектов на наличие наночастиц в среде от уровня их биологической организации. Установлено, что организмы, входящие в состав водных экосистем (микроводоросли, рачки), более чувствительны к воздействию наночастиц по сравнению с организмами частично или полностью обитающими в почве (микробиоты, высшие грибы, высшие растения). Впервые найдено, что наночастицы диоксида кремния размером 100-120 нм обладают более высокой токсичностью, чем частицы размером 10-15 нм.

Научное и практическое значение. Результаты исследования вносят вклад в решение проблемы экотоксичности техногенных наночастиц, связанной с ограничением их попадания в окружающую среду, что способствует сохранению ее безопасности и здоровья человека. Полученные данные расширяют представления о реакциях различных биологических объектов в ответ на воздействие на них наночастиц. При оценке экологических рисков наряду с химической природой и концентрацией, следует учитывать размер попадающих в окружающую среду наночастиц. Наиболее чувствительными организмами к воздействию наночастиц являются водные рачки *Ceriodaphnia affinis* и одноклеточная водоросль *Chlorella vulgaris*, что предполагает целесообразность их применения в экотоксикологическом мониторинге.

Положения выносимые на защиту:

1. Установлено, что наиболее опасными для окружающей среды из исследованных наночастиц, являются наночастицы серебра.
2. Доказано, что токсический эффект наночастиц не зависит от уровня биологической организации тест-объекта и определяется химической природой, концентрацией и размером наночастиц.
3. Выявлено, что водные экосистемы по сравнению с наземными находятся в зоне повышенного риска негативного влияния техногенных наночастиц, попадающих в окружающую среду.

Личный вклад автора. Выбор темы, постановка цели и задач, выбор методов исследования, планирование и проведение экспериментов, статистическая обработка и анализ полученных результатов были выполнены автором лично. Методологическое сопровождение было предоставлено следующими соавторами: к.б.н. Е.Н. Есимбековой, к.б.н. Е.В. Немцевой, д.б.н. В.А. Кратасюк, к.б.н. Н.С. Мануковским, к.б.н. Ю.С. Григорьевым, к.б.н. И.И.

Морозовой, д.б.н. Е.А. Ивановой, д.б.н. С.В. Хижняком. Техническое выполнение некоторых операций было проведено с аспирантами А.А. Деевой, М.А. Кирилловой, А.Н. Вишняковым.

Достоверность результатов работы подтверждается достоверностью исходных данных, корректными методами исследования, оценкой воспроизводимости результатов с помощью статистических методов.

Апробация результатов. Основные положения диссертационной работы были представлены на следующих конференциях: «V съезде биофизиков России», Ростов-на-Дону, 2015 г; XX Международной экологической студенческой конференции «Экология России и сопредельных территорий», Новосибирск, 2015 г; Международном симпозиуме и школе «Биодиагностика и оценка качества природной среды: подходы, методы, критерии и эталоны сравнения в экотоксикологии», Москва, 2016 г; 27th Annual Meeting of Society of Environmental Toxicology and Chemistry Europe (SETAC Europe), Brussels (Belgium), 2017; 3rd International Conference of Food and Biosystems Engineering, Rhodes island (Greece), 2017.

Публикации. Основные положения диссертации опубликованы в 16 работах, в том числе 9 статьях в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Общая характеристика работы. Работа включает **158** страниц компьютерного текста, содержит **45** рис., **6** табл., **286** источников литературы, в том числе **234** на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Экотоксикологические аспекты наночастиц (обзор литературы)

В разделе 1.1. раскрывается проблема экотоксичности техногенных наночастиц (Navarro et al., 2008; Piccinno et al., 2012; Contado, 2015; Juganson et al., 2015), источники их поступления в окружающую среду (Keller et al., 2013; McGillicuddy et al., 2016; Duhan et al., 2017). Показано, что наибольший объем производства приходится на TiO_2 , примерно 550-5500 тонн в год и на SiO_2 (55-55000 тонн в год); на Ag приходится 5,5-550 тонн в год (Piccinno et al., 2012). В условиях стремительного увеличения количества потребительских продуктов, содержащих наночастицы, в настоящее время объем производства этих наночастиц может значительно превышать существующие оценки. В разделе 1.2. описаны современные подходы к оценке токсичности техногенных наночастиц (Онищенко и др., 2007; Макаров, 2013, Гелашвили и др., 2016). В разделах 1.3.1. – 1.3.3. освещается степень изученности влияния наночастиц серебра, диоксида титана и диоксида кремния на окружающую среду (Полонский, Асанова, 2018а, 2018б; Асанова, Полонский, 2019). Анализ литературы показал, что результаты исследований с использованием различных тест-объектов весьма неоднозначны в силу отсутствия единообразия в выборе наночастиц, тест-объектов и условий проведения экспериментов. Это обстоятельство существенно затрудняет возможность сравнения результатов. Зависимости реакций организмов в ответ на действие наночастиц от уровня их биологической организации исследованы недостаточно. Результаты влияния наночастиц различного размера на показатели тест-организмов противоречивы. Практически не изучены ответные реакции модельных ферментных систем на присутствие наночастиц в среде.

Глава 2. Объекты и методы исследования

Для работы были выбраны биологические объекты и ферментативные системы, представляющие разные уровни биологической организации и различные среды обитания (табл. 1). Ответные реакции исследовались при воздействии наиболее широко используемых при производстве потребительских товаров наночастиц серебра (Ag) шаровидной формы, размером 15–25 нм (препарат «Наносеребро Аргитос», изготовленный ООО НПП «Синтек Нано», Россия, концентрация в препарате 250 ppm); наночастиц диоксида титана (TiO_2) шаровидной формы, размером 100–190 нм; наночастиц диоксида кремния (SiO_2) шаровидной формы, размером 10–15 нм и 100–120 нм («Plasmotherm», Россия). Суспензию исследуемых наночастиц готовили в дистиллированной воде в начале каждого эксперимента. Для получения более высокой дисперсности материала суспензии наночастиц в течение 30 минут подвергали ультразвуковой обработке с частотой 35 кГц в приборе Wise Clean (Dihan), Германия.

Таблица 1.

Объекты и методы исследования техногенных наночастиц.

Объекты исследования	Среда обитания	Предметы исследования
Многочелюстные организмы		
Овес посевной <i>Avena sativa</i>	Агроэкосистемы	Энергия прорастания, %
		Масса побегов, мг
		Масса корней, мг
		Длина максимального корешка, мм
Вешенка обыкновенная <i>Pleurotus ostreatus</i>	Лесные экосистемы	Скорость роста мицелия, мм/сут
Тропический гриб <i>Neonothopanus nambi</i>		
Водные рачки <i>Ceriodaphnia affinis</i>	Водные экосистемы	Выживаемость, %
Одноклеточные организмы		
Одноклеточная зеленая водоросль <i>Chlorella vulgaris</i>	Водные экосистемы	Прирост (опт.плотность), отн.ед.
		Состояние фотосинтетического аппарата до световой экспозиции (ОПЗФ), отн.ед.
		Состояние фотосинтетического аппарата после световой экспозиции (ОПЗФ), отн.ед.
Конидии корневой гнили <i>Bipolaris sorokiniana</i>	Агроэкосистемы	Прорастание конидий, %
Ферментативные системы		
NADH:FMN- оксидоредуктаза и люцифераза	Искусственная среда	Интенсивность свечения биолюминесцентной реакции, отн. ед.
Активность трипсина		Константа спада биолюминесцентной реакции, отн.ед.

Эффективность воздействия наночастиц на исследуемые тест-объекты оценивали по показателю EC₅₀ – величине концентрации наночастиц, при которой исследуемые параметры снижались на 50% по отношению к контролю.

При статистической обработке полученных результатов использовали *t*-критерий Стьюдента. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$. Обработку данных производили с помощью пакетов программ Microsoft Office и STATISTICA 10.

Оценку токсического влияния наночастиц на высшие растения проводили согласно методике МР 2.1.7.2297-07. В качестве модельного тест-объекта выбран овес посевной, так как его использование позволяет получать стабильные и воспроизводимые результаты. Семена и суспензии наночастиц инкубировали в чашках Петри, по истечению заданной экспозиции вычисляли энергию прорастания (3 суток), измеряли массу корней, массу проростков и длину максимально развитого корешка в контрольных и опытных образцах (7 суток).

Для изучения ростовых реакции ксилотрофных грибов в ответ на воздействие наночастиц были выбраны простые и удобные в культивировании макромицеты *P. ostreatus* и *N. nambi*, занимающие лесные экосистемы умеренных и тропических широт соответственно. В экспериментах определяли зависимость линейной скорости роста мицелия грибов от содержания наночастиц в субстрате. Стерильный субстрат инокулировали кусочками мицелия грибов. Измерения линейной скорости роста мицелия по субстрату производили с интервалом в 3 суток после начала роста.

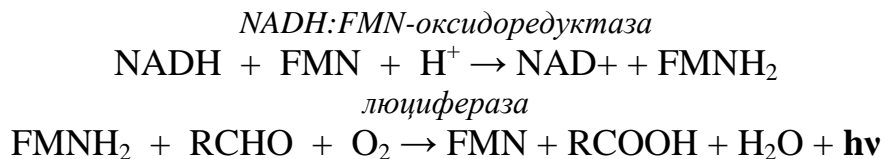
Многочлеточным представителем водной экосистемы выбран рачок *C. affinis*, один из наиболее часто используемых в биотестировании тест-объектов. Эксперименты по оценке реакции рачков в ответ на действие различных наночастиц проводились согласно методикам (РД.118-02-90; ФР.1.39.2007.03221.), основанным на определении выживаемости организмов при воздействии токсических веществ, содержащихся в тестируемой воде по сравнению с контролем по истечению 24 и 48 часов.

Микроводоросль *C. vulgaris*, являясь одноклеточным представителем водной экосистемы, характеризуется интенсивным размножением с выходом большого количества автоспор, что делает ее удобным и часто используемым объектом лабораторных исследований. Оценка ростовой реакции одноклеточной водоросли в ответ на действие наночастиц выполнялась согласно методикам (ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04 / Т 16.1:2:2.3:3.7-04; Моргалев и др., 2010). Способы основаны на регистрации различий в величине оптической плотности тест-культуры водоросли хлорелла, выращенной на среде, не содержащей токсических веществ (контроль) и в тестируемых пробах за 22 часа. Кроме этого в работе была выполнена оценка активности фотосинтетического аппарата хлореллы по изменению относительного показателя замедленной флуоресценции (ОПЗФ). Этот подход был реализован по методике (ПНД Ф Т 14.1:2:4.16-09 / Т 16.1:2.3:3.14-09) на флуориметре Фотон 10. Способ основан на регистрации различий величины ОПЗФ тест-культуры водоросли хлорелла, экспонируемой в течение 1 часа в среде, не содержащей токсических веществ (контроль) и в тестируемых пробах (опыт).

В работе выполняли эксперименты по определению реакции конидий микромицетов *B. sorokiniana*, условно принятых за одноклеточный организм, в

ответ на действие различных наночастиц. Данный микромицет позволяет получить высокую долю проросших конидий без стимуляторов прорастания, при этом максимальное количество проросших конидий в условиях контроля (без наночастиц) достигается за относительно короткий промежуток времени. Для оценки влияния наночастиц на процесс прорастания конидий на предметное стекло наносили исследуемую суспензию наночастиц или стерильную воду в качестве контроля. В каплю добавляли конидии и предметное стекло помещали во влажную камеру на 5,5 часов, после чего подсчитывали долю проросших конидий под микроскопом.

Для оценки влияния наночастиц на ферментативные системы использовалась биферментная система NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза и трехферментная система с трипсином. Фермент NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза является NADH-зависимой дегидрогеназой, которая играет важную роль в энергетическом обмене растительных и животных клеток, а биферментная система является чувствительным тест-объектом к широкому классу загрязняющих веществ и используется в экологическом мониторинге. Данная система представляет собой две сопряженные ферментативные реакции, продуктом одной из которых является излучение в видимой области спектра.



В основе биолюминесцентных тестов лежит ингибирование ферментов компонентами анализируемых смесей, что способствует спаду интенсивности свечения. Для проведения анализа субстраты и комплекс ферментов помещали в пробирку и регистрировали величину остаточного свечения биолюминесцентной реакции с помощью биолюминометра в присутствии суспензии наночастиц или дистиллированной воды в качестве контроля (Есимбекова и др., 2017).

Трипсин осуществляет важную роль в гидролитическом расщеплении белков пищи, фермент имеет непосредственный контакт с пищей, а значит и с возможно содержащимися в ней наночастицами. Анализ активности трипсина проводили по константе спада биолюминесцентной реакции (Esimbekova et al., 2017). Анализ выполняли аналогично предыдущему, добавляя помимо других реагентов трипсин. При введении в реакционную смесь протеолитических белков они осуществляют гидролиз люциферазы и NADH:FMN-оксидоредуктазы, что сопровождается резким спадом интенсивности свечения.

Глава 3. Ответные реакции функциональных показателей различных биологических объектов на присутствие наночастиц в среде

3.1. Многоклеточные организмы

Проблема степени воздействия наночастиц на фотосинтезирующие организмы стоит весьма остро в силу того, что последние располагаются в

основании пищевой пирамиды практически любой экосистемы, представляют значительную часть биомассы живых существ в ней и, вовлекая наночастицы в свой метаболизм, могут передавать их по трофическим цепям.

Проведенные исследования на проростках *A. sativa* показали, что наиболее сильная негативная ростовая реакция имела место в присутствии наночастиц серебра по сравнению с наночастицами диоксида титана и кремния (табл. 2) (Асанова, Полонский, 2017а). Высокие концентрации диоксида титана способствовали снижению длины корешка и незначительному уменьшению массы побегов и корней. Наночастицы диоксида кремния размером 100-120 нм оказывали слабое влияние на все исследуемые ростовые функции, в то время как в присутствии частиц размером 10-15 нм регистрировалось лишь снижение массы корня. Было найдено, что самым чувствительным органом растений овса к воздействию наночастиц является корень (Асанова и др., 2017).

Таблица 2.

Величины EC_{50} исследуемых наночастиц для ростовых показателей овса посевного.

Наночас- тицы	EC_{50} , мг/л			
	Энергия прорастания	Масса побегов	Масса корней	Длина корешка
Ag	20	7	7	13
TiO ₂	-	-*	-*	90
SiO ₂ 10-15 нм	-	-	-*	-
SiO ₂ 100-120 нм	-*	-*	-*	-*

«-» – Влияния не наблюдалось в диапазоне концентраций до 100 мг/л.

«-*» – Наблюдалось слабое влияние в диапазоне концентраций до 100 мг/л.

Высшие грибы являются одним из важных факторов почвообразования и характерным звеном большинства лесных экосистем. При этом высшие грибы, аккумулируя наночастицы в плодовом теле, и, являясь кормом для млекопитающих и пищей человека, способны передавать накопленные наночастицы на следующий трофический уровень. Судя по ростовой реакции исследуемых грибов *N. nambi* и *P. ostreatus*, наночастицы серебра обладали слабой фунгистатической активностью (величины EC_{50} равны 14 и 31 мг/л соответственно), а наночастицы TiO₂ и SiO₂ не проявили заметного действия до концентраций 1000 мг/л (Асанова и др., 2018).

Планктонные ракообразные являются трофическим и энергетическим связующим звеном между первичными производителями (водорослями) и вторичными потребителями (рыбами и их личинками). Снижение выживаемости водных рачков под действием каких-либо внешних факторов может спровоцировать снижение численности рыб или «цветение» водоема, что приведет к смещению экологического равновесия водной экосистемы.

Наночастицы серебра оказывали наибольшее негативное влияние на водные рачки *C. affinis*, при этом ответная реакция последних не зависела от длительности экспозиции (рис. 1) (Асанова, Полонский, 2018). Наночастицы диоксида титана для этих организмов оказались нетоксичными в диапазоне концентраций до 5 мг/л при 48-часовой экспозиции. При сравнении влияния наночастиц диоксида кремния с размерами 100-120 нм и 10-15 нм, более эффективными оказались частицы более крупного размера, при этом негативное воздействие частиц меньшего размера повышалось с увеличением длительности экспозиции.

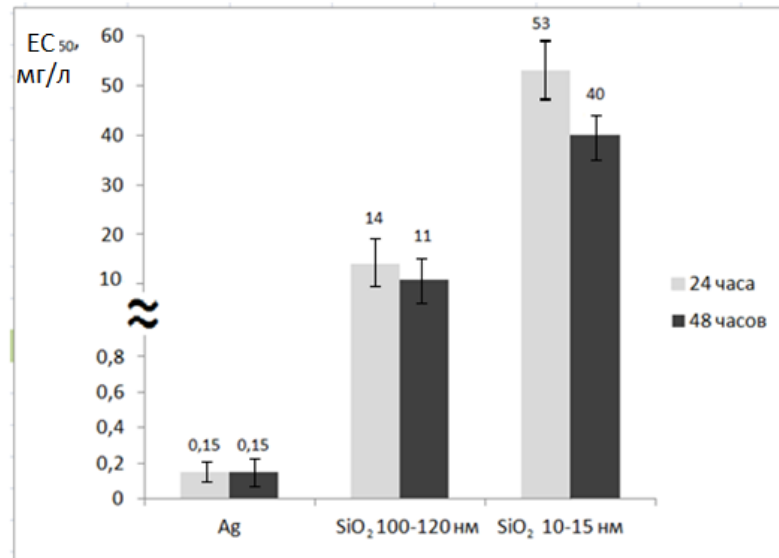


Рисунок 1. Динамика выживаемости водных рачков под влиянием наночастиц в экспериментах при 24- и 48-часовой экспозициях.

3.2. Одноклеточные организмы

Одноклеточная водоросль представляет первый трофический уровень водной экосистемы и составляет значительную часть биомассы фитопланктонного сообщества в пресноводных водоемах. Поэтому снижение численности клеток зеленой водоросли может лимитировать численность и видовое разнообразие зоопланктона и некоторых видов рыб, кормом для которых она является. Исследования на культуре микроводоросли *C. vulgaris* показали, что ее ростовая и фотосинтетическая функции снижались больше всего под влиянием наночастиц серебра и диоксида кремния размером 100-120 нм (табл. 3) (Асанова, Полонский, 2017а; Асанова и др., 2017). В присутствии наночастиц диоксида кремния размером 100-120 нм после проведения 1-часовой засветки культуры хлореллы регистрировался острый негативный эффект в изменении состояния фотосинтетического аппарата (показателя ОПЗФ), который проявлялся в уменьшении свечения при возбуждении микроводоросли светом как высокой, так и низкой интенсивности. Интересно, что интегральный ростовой параметр (прирост) культуры водоросли оказался более чувствительным показателем по сравнению с ОПЗФ хлорофилла к негативному действию наночастиц. Однако введение процедуры

непродолжительной предварительной засветки культуры в тестируемой пробе повышало чувствительность хлореллы, что может свидетельствовать о возможном влиянии наночастиц на механизм фотосинтеза (Асанова, Полонский, 2017а; Асанова и др., 2017).

Таблица 3.

Величины EC_{50} исследуемых наночастиц для ростового и фотосинтетического показателей одноклеточной водоросли *C. vulgaris*.

Физиологический показатель		EC_{50} для разных наночастиц, мг/л			
		Ag	TiO ₂	SiO ₂	SiO ₂
		15-25 нм	100-190 нм	10-15 нм	100-120 нм
Прирост (ОП)		0,045	-* (до 5 мг/л)	-	8
Состояние фотосинтетического аппарата (ОПЗФ)	до световой экспозиции	0,80	-	-	16
	после световой экспозиции	0,11	-*	-	-**

«-» – Влияния не наблюдалось в диапазоне концентраций до 100 мг/л.

«-*» – Наблюдалось слабое влияние в диапазоне концентраций до 100 мг/л.

«-**» – Наблюдался острый негативный эффект при концентрации превышающей 6 мг/л.

Низшие грибы играют основную роль в процессах почвообразования. Наночастицы, угнетающие ростовые функции микромицетов, могут способствовать замедлению разрушения и разложения органических субстратов, изменяя состав почвы и смещая экологическое равновесие в ней. Учет прорастания конидий микромицета *B. sorokiniana* в присутствии наночастиц диоксида титана и кремния позволил установить, что данные наночастицы в отношении этого биологического объекта фунгицидных свойств не проявляли. В присутствии наносеребра была отмечена ответная негативная реакция микромицета, а 50%-ное подавление прорастания конидий фиксировалось при довольно высокой концентрации этих наночастиц, равной 30 мг/л (Асанова и др., 2018).

3.3. Ферментативные системы

Представление о том, что в основе жизни лежит сложно организованная сопряженная деятельность многих ферментных систем, позволяет предполагать, что появление дезорганизации отдельных ее звеньев может привести к нарушению функционирования ткани или органа. В настоящее исследование включены ферменты, являющиеся представителями разных классов и выполняющие ключевые функции метаболических процессов живых организмов.

В работе установлено, что все исследуемые наночастицы оказали ингибирующее воздействие на ферментативную систему с NADH:FMN-оксидоредуктазой и люциферазой (табл. 4). Наибольшее воздействие оказали наночастицы диоксида титана и серебра. Наночастицы диоксида кремния размером 100-120 нм ингибировали биферментную систему сильнее, чем частицы размером 10-15 нм.

Способность наночастиц аккумулироваться в растительных и животных тканях, которые в свою очередь могут являться пищей для человека и кормом для животных, а также их массовое применение для улучшения свойств пищевых продуктов усиливает актуальность вопроса о существовании опасности для здоровья при пероральном поглощении наночастиц. Важную роль в гидролитическом расщеплении белков пищи осуществляет фермент трипсин, который активируется в двенадцатиперстной кишке и имеет непосредственный контакт с пищей, а значит и с возможно содержащимися там наночастицами. Воздействие суспензий наночастиц диоксида титана и кремния на активность трипсина было выражено значительно слабее по сравнению с биферментной системой (табл. 4).

Таблица 4.

Величины EC_{50} исследуемых наночастиц для биферментной системы и системы с трипсином.

Биохимический показатель	EC_{50} для разных наночастиц, мг/л			
	Ag	TiO ₂	SiO ₂	SiO ₂
	15-25 нм	100-190 нм	10-15 нм	100-120 нм
Интенсивность свечения системы с NADH:FMN-оксидоредуктазой и люциферазой	17	13	216	50
Активность трипсина	#2	15	-	-

«-» – Влияния не наблюдалось в диапазоне концентраций до 1000 мг/л.

«#» – Заимствованный показатель (данные Фрицлер, 2017).

Наночастицы TiO₂ ингибировали активность трипсина в большей степени по сравнению с наночастицами SiO₂, для частиц диоксида кремния показатели EC_{50} установить в данном эксперименте не удалось. Рассматриваемый подход был продолжен другими авторами на примере образцов, используемых нами в настоящем исследовании. Так, в бакалаврской работе Я.В. Фрицлер (2017), научный руководитель Е.Н. Есимбекова, описано значительное ингибирующее действие наносеребра на активность фермента трипсина.

4. Анализ чувствительности биологических объектов к наночастицам различного размера и химической природы от уровня их биологической организации и среды обитания

Для сравнения чувствительности тест-объектов к разным наночастицам был проведен ранговый дисперсионный анализ Фридмана. Для этого с целью упрощения математических расчетов вместо абсолютных значений EC_{50} использовали их обратные значения. Эти величины можно интерпретировать как уровень негативного влияния наночастиц на тест-организмы. В тех случаях, когда величину EC_{50} не удавалось определить из-за слишком малой токсичности наночастиц, показатель $1/EC_{50}$ принимался равным нулю. Выполненный дисперсионный анализ Фридмана показал, что реакции исследуемых тест-объектов на воздействие наночастиц статистически значимо различаются ($p = 0,05$) (рис. 2.).

В результате проведенного анализа ответных реакций тест-объектов, представляющих разные уровни биологической организации и среды обитания на действие наночастиц, было найдено, что самым чувствительными из изученных являются водные рачки *C. affinis* (ранг 6,4), сильнее всего на них воздействовали наночастицы серебра. Высокую чувствительность к исследуемым наночастицам (почти на уровне водных рачков) проявила одноклеточная водоросль *C. vulgaris* (ранг 5,8). Установлено, что ее ростовая и фотосинтетическая функции снижались в большей степени под влиянием наночастиц серебра и диоксида кремния размером 100-120 нм (Асанова, Полонский, 2017а; Асанова и др., 2017). Показано, что мицелиальная форма организмов является наиболее устойчивой к действию наночастиц (Асанова и др., 2018). Самым чувствительным тест-объектом среди грибов, оказался макромицет вешенка обыкновенная *P. ostreatus* (ранг 3,8), показатель EC_{50} для которого вдвое превышал аналогичный параметр для *N. nambi* и *B. sorokiniana* (ранги 2,8 и 3,0 соответственно). Биферментная система аналогично рачкам и одноклеточной водоросли проявила высокую чувствительность к наночастицам (ранг 6,3). Более детальный анализ выявил, что высокий средний ранг биферментной системы обусловлен наличием чувствительности данного тест-объекта ко всем исследуемым типам наночастиц, при этом уровень ответной реакции биферментной системы на каждый вид наночастиц был существенно ниже. Более чувствительной из рассмотренных ферментативных систем, оказалась система с трипсином к действию наночастиц серебра. При этом она была нечувствительной к наночастицам диоксида кремния. К действию наночастиц диоксида титана трипсин продемонстрировал 7-кратную устойчивость по сравнению с наносеребром (ранг 4,9).

Таким образом, в целом можно заключить, что реакция различных тест-объектов в ответ на воздействие наночастиц не зависела от уровня их биологической организации.

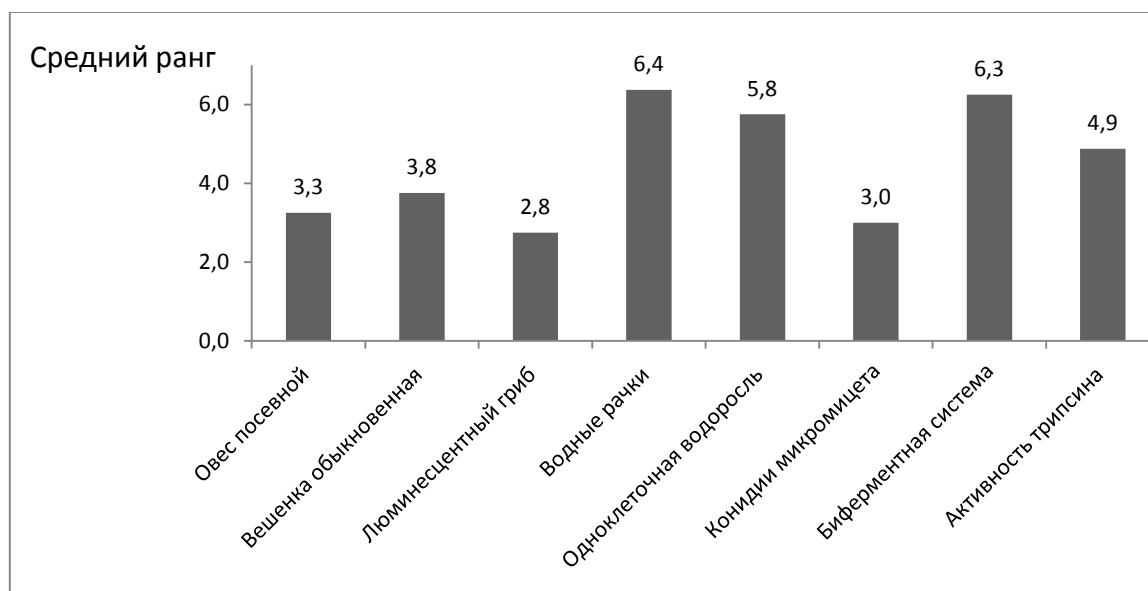


Рисунок 2. Диаграмма рангов чувствительности исследуемых тест-объектов к наночастицам (значение среднего ранга пропорционально чувствительности тест-объекта).

Для сравнительного анализа токсического действия различных наночастиц на биологические объекты проведен ранговый дисперсионный анализ Фридмана, как и в предыдущем случае. Показано, что уровни негативного воздействия наночастиц на исследуемые тест-объекты статистически значимо различаются ($p < 0,001$). Результаты токсического воздействия наночастиц Ag, TiO₂ и двух видов SiO₂ имеют высокое согласование (коэффициент конкордации 0,7), что, по-видимому, свидетельствует о зависимости токсического эффекта от типа выбранных частиц. Действительно, среди использованных в наших экспериментах четырех видов частиц наносеребро оказалось наиболее токсичным для всех исследуемых биологических объектов (ранг 3,9). Наблюдаемый эффект, вероятно, связан с их способностью к образованию ионов, как это продемонстрировано в литературе (Beer et al., 2012; Cvjetko et al., 2017; Lubick, 2018; Kittler et al., 2010; Sakamoto et al., 2015) и в нашем исследовании (Асанова, Полонский, 2017а, 2017б).

При изучении биологического действия наночастиц открытым остается вопрос о том, связана ли их токсичность с размерами. Так при сравнении различных размеров исследуемых наночастиц, зависимости токсического эффекта от размера выявлено не было. Наносеребро размерами 15-25 нм (ранг 3,9) оказалось токсичнее крупных частиц диоксида титана (ранг 2,1) и диоксида кремния (ранг 2,2) размерами 100-190 и 100-120 нм соответственно. А частицы диоксида кремния размером 10-15 нм, приблизительно равным размерам частиц серебра, оказались наименее токсичными из всех исследуемых частиц (ранг 1,7). В то же время при сравнительном исследовании влияния наночастиц только диоксида кремния размерами 10-15 нм и 100-120 нм, была показано большая токсичность для более крупных частиц в отношении всех исследуемых тест-объектов. Так на примере многоклеточного организма водного рачка *S.*

affinis показано, что наночастицы размером 100-120 нм являются в 4 раза более токсичными, чем частицы меньшего размера. В случае использования в качестве тест-объекта овса посевного *A. sativa* наночастицы размером 100-120 нм оказывали негативный эффект (хотя и выраженный слабо) на все исследуемые ростовые показатели, в то время как токсическое влияние частиц размером 10-15 нм проявилось в снижении лишь массы корней. Присутствие наночастиц размером 100-120 нм приводило к видимой агломерации клеток одноклеточной водоросли, что отражалось в существенном снижении прироста культуры и в остром токсическом эффекте, зафиксированном по активности фотосинтетического аппарата. В то же время частицы диоксида кремния размером 10-15 нм воздействия на одноклеточную водоросль не оказали. При исследовании биферментной системы, более крупные наночастицы диоксида кремния оказались токсичнее частиц меньшего размера более чем в 4 раза.

Итак, в случае диоксида кремния установлено, что наночастицы размером 100-120 нм обладают более высоким ингибирующим эффектом по сравнению с частицами размером 10-15 нм для объектов разных уровней биологической организации, принадлежащих различным экологическим нишам.

Полученные результаты позволяют утверждать, что токсичность наночастиц зависит в большей степени от их химической природы, чем от размера.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что все функциональные показатели биологических объектов проявляли негативную реакцию на воздействие наночастиц серебра. Минимальная концентрация, оказывающая 50%-ное угнетение тест-функций, была зарегистрирована по приросту микроводоросли *Chlorella vulgaris* и составила 0,05 мг/л.

2. Наночастицы диоксида титана способствовали 50%-ному снижению только длины корешка овса посевного и ингибированию биферментной и трехферментной систем при концентрации 90, 13 и 15 мг/л, соответственно. Менее выраженный эффект наночастиц диоксида титана наблюдался при воздействии на массу побегов и корней овса посевного, скорость роста мицелия вешенки обыкновенной, прирост и состояние фотосинтетического аппарата микроводоросли *Chlorella vulgaris*.

3. Присутствие наночастиц диоксида кремния размером 100-120 нм приводило к 50%-ному снижению выживаемости *Ceriodaphnia affinis*, уменьшению прироста и фотосинтетической активности *Chlorella vulgaris* и ингибированию биферментной системы при концентрациях 11, 8, 16, 50 мг/л, соответственно. При воздействии на фотосинтетический аппарат водоросли отмечался острый негативный эффект при концентрации превышающей 6 мг/л. Наночастицы диоксида кремния размером 10-15 нм способствовали 50%-ному снижению выживаемости *Ceriodaphnia affinis* и интенсивности свечения биферментной системы при концентрации 40 и 216 мг/л.

Менее выраженный негативный эффект наночастиц размером 100-120 нм наблюдался на все исследуемые показатели овса посевного, а наночастиц размером 10-15 нм только на массу корней.

4. Результаты выполненных исследований показали, что измеренная по 50%-ному ингибированию функций ответная реакция на воздействие наночастиц, не зависела от уровня биологической организации тест-объектов.

5. Установлено, что наиболее чувствительными тест-объектами к воздействию наночастиц Ag, TiO₂, SiO₂ оказались представители водных экосистем: одноклеточная водоросль *Chlorella vulgaris* и рачки *Ceriodaphnia affinis*. Условия неконтролируемой утилизации наночастиц посредством сточных вод делают эти экосистемы одними из самых уязвимых объектов окружающей среды.

6. Ответная негативная реакция различных тест-организмов на присутствие наночастиц в окружающей среде закономерно снижалась в ряду Ag - TiO₂ - SiO₂.

7. При использовании широкого набора тест-объектов найдено, что крупные наночастицы диоксида кремния размером 100-120 нм обладали более высокой токсичностью, по сравнению с наночастицами размером 10-15 нм.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах, включенных в перечень ВАК РФ

1. Есимбекова Е.Н., Немцева Е.В., Кириллова М.А., **Асанова А.А.**, Кратасюк В.А. Биoluminesцентный метод токсикологической оценки наноматериалов // Доклады Академии наук. – 2017. – Т. 472. – №. 5. – С. 596-599.
2. **Асанова А.А.**, Полонский В.И., Григорьев Ю.С. Оценка токсичности техногенных наночастиц с использованием водоросли *Chlorella Vulgaris* // Токсикологический вестник. – 2017. – Т. 145. – №. 4. – С. 50-54.
3. **Асанова А.А.**, Полонский В.И. Воздействие наночастиц серебра на фотосинтезирующие организмы // Достижения науки и техники АПК. – 2017а. – №. 8. – С. 12-15.
4. **Асанова А.А.**, Полонский В.И. Выживаемость равноресничных инфузорий (*Paramecium Caudatum*) в присутствии наночастиц и ионов серебра // Проблемы агрохимии и экологии. – 2017б. – №. 4. – С. 60-62.
5. **Асанова А.А.**, Полонский В.И., Мануковский Н.С., Хижняк С.В. Фунгистатическая активность техногенных наночастиц // Российские нанотехнологии. – 2018. – №. 6. – С. 62-66.
6. Полонский В.И., **Асанова А.А.** Влияние наночастиц серебра на биологические объекты // Вестник КрасГАУ. – 2018а. – №. 6. – С. 271-276.
7. **Асанова А.А.**, Полонский В.И. Некоторые токсикологические характеристики наночастиц диоксида кремния // Проблемы агрохимии и экологии. – 2019. – № 2. – С. 71-78.

Статьи в изданиях, включенных в мировую базу данных научного цитирования Scopus

8. Esimbekova E.N., **Asanova A.A.**, Deeva A.A., Kratasyuk V.A. Inhibition effect of food preservatives on endoproteinases // Food chemistry. – 2017. – V. 235. – P. 294-297.
9. Esimbekova E.N., Nemtseva E.V., Kirillova M.A., **Asanova A.A.**, Kratasyuk V.A. Bioluminescent assay for toxicological assessment of nanomaterials // Doklady Biochemistry and Biophysics. – 2017. – V. 472. – No. 1. – P. 60-63.
10. **Asanova A.A.**, Polonskiy V.I., Manukovsky N.S., Khizhnyak S.V. Fungistatic activity of engineered nanoparticles // Nanotechnologies in Russia. – 2018. – V. 13. – No. 5-6. – P. 277-280.
11. Полонский В.И., **Асанова А.А.** Оценка воздействия наночастиц диоксида титана на живые организмы // Теоретическая и прикладная экология. – 2018б. – №. 3. – С. 5-11.

Статьи в других научных изданиях

12. Хрунина М.А., **Асанова А.А.**, Есимбекова Е.Н. Токсикологический анализ наночастиц оксидов титана и кремния ферментативными методами тестирования // Экология России и сопредельных территорий: Материалы XX Международной экологической студенческой конференции, Новосибирск. – 2015. – С. 198.

13. Есимбекова Е.Н., Хрунина М.А., Деева А.А., **Асанова А.А.** Воздействие наночастиц на функционирование ферментов // V съезд биофизиков России: Материалы докладов, Ростов-на-Дону. – 2015. – Т. 2– С. 88.
14. Асанова А.А., Полонский В.И., Григорьев Ю.С., Вишняков А.Н. Оценка токсичности техногенных наночастиц методами биотестирования // Биодиагностика и оценка качества природной среды: подходы, методы, критерии и эталоны сравнения в экотоксикологии: Материалы международного симпозиума и школы, Москва. – 2016. – С. 317.
15. Esimbekova E.N., **Asanova A.A.**, Kratasyuk V.A. Proteases as enzymatic markers for assessment of food additives safety // Proceedings of 3rd International Conference of Food and Biosystems Engineering, Rhodes island (Greece). – 2017. – P. 299.
16. **Asanova A.A.**, Polonskiy V.I., Grigoriev Y.S. The toxicity assessment of engineered nanoparticles in algal bioassays // SETAC Europe 27th Annual Meeting: Abstract book, Brussels (Belgium). – 2017. – P. 152.
17. **Асанова А.А.**, Полонский В.И. Токсичность наночастиц серебра в отношении равноресничных инфузорий *Paramecium caudatum* // Advances in Science and Technology: Материалы XI Международной научно-практической конференции, Москва. – 2017. – С. 60-62.
18. **Асанова А.А.**, Полонский В.И. Воздействие техногенных наночастиц на выживаемость ракообразных *Ceriodaphnia affinis* // EurasiaScience: Материалы XV Международной научно-практической конференции, Москва. – 2018. – С. 48-49.