

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Красноярский государственный аграрный университет»

На правах рукописи



Асанова Анастасия Андреевна

Эколого-биохимическая оценка токсичности окружающей
среды, загрязненной наноматериалами

03.02.08 – Экология (биология)

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук,
профессор
Полонский Вадим Игоревич

Владимир - 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НАНОЧАСТИЦ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	11
1.1. Источники поступления наночастиц в окружающую среду	11
1.2. Современные подходы к оценке токсичности наночастиц	17
1.3. Токсикологическая характеристика наночастиц	20
1.3.1. Наночастицы серебра	20
1.3.2. Наночастицы диоксида титана	33
1.3.3. Наночастицы диоксида кремния	39
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	42
2.1. Объекты исследования	42
2.2. Материалы	43
2.3. Методы культивирования различных тест-организмов и измерения ростовых показателей в условиях действия наночастиц	44
2.3.1. Высшие растения (овес посевной <i>Avena sativa</i>)	44
2.3.2. Высшие ксилотрофные грибы <i>Pleurotus ostreatus</i> и <i>Neonothopanus nambi</i>	46
2.3.3. Представители ракообразных (<i>Ceriodaphnia affinis</i>).....	48
2.3.4. Культура микроводоросли <i>Chlorella vulgaris</i> Beijer.....	50
2.3.5. Микромицеты (<i>Bipolaris sorokiniana</i>)	53
2.4. Оценка влияния наночастиц на ферментные системы.....	55

2.4.1. Билюминесцентная система с NADH:FMN-оксидоредуктазой и люциферазой.....	55
2.4.2. Билюминесцентная система с трипсином	57
ГЛАВА 3. РЕАКЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ РАЗЛИЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ НА ПРИСУТСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ В СРЕДЕ.....	59
3.1. Многоклеточные организмы.....	59
3.1.1. Изменение ростовых показателей семян и проростков овса посевного <i>Avena sativa</i> под воздействием наночастиц	59
3.1.2. Изменение ростовых показателей высших грибов <i>Pleurotus ostreatus</i> и <i>Neonothopanus nambi</i> , происходящие под влиянием наночастиц	65
3.1.3. Изменение выживаемости рачков <i>Ceriodaphnia affinis</i> , происходящее под влиянием наночастиц	69
Заключение по разделу 3.1.....	74
3.2. Одноклеточные организмы.....	78
3.2.1. Изменение ростовых и фотосинтетических показателей водоросли <i>Chlorella vulgaris</i> под воздействием наночастиц.....	78
3.2.2. Изменение показателей прорастания конидий микромицетов <i>Bipolaris sorokiniana</i> под воздействием наночастиц.....	88
Заключение по разделу 3.2.....	91
3.3. Ферментативные системы.....	94
3.3.1. Функционирование биферментной системы с NADH:FMN- оксидоредуктазой и люциферазой	94
3.3.2. Функционирование триферментной системы с трипсином	101
Заключение по разделу 3.3.....	105

ГЛАВА 4. АНАЛИЗ РЕАКЦИИ ОБЪЕКТОВ РАЗНЫХ УРОВНЕЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ ...	107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	118
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	122
ЛИТЕРАТУРА.....	124
ПРИЛОЖЕНИЕ	158

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода;

ПВП – поливинилпирролидон;

ПОЛ – перекисное окисление липидов;

EC₅₀ – величина концентрации наночастиц, при которой исследуемые физиолого-биохимические параметры тест-объектов снижались на 50% по отношению к контролю;

EC₂₀ – величина концентрации наночастиц, при которой исследуемые физиолого-биохимические параметры тест-объектов снижались на 20% по отношению к контролю.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Нанотехнологии являются быстро развивающейся областью науки и, по мнению экспертов, в скором будущем станут процессами 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., 2011a; 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). Загрязняющие почву наночастицы оказывают свое воздействие на обитающие в ней организмы.

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., 2012; Keller et al., 2013; McGillicuddy et al., 2017).

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

(микровицеты, 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.

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.

Выполнение работы поддержано следующими фондами:

КГАУ «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности» конкурс научно-технического творчества молодежи 2015 г, проект "Эколого-биохимические методы оценки токсичности техногенных наноматериалов".

КГАУ «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности», конкурс по организации участия студентов, аспирантов и молодых ученых в конференциях, научных мероприятиях и стажировках 2017 года, проект «Современные технологии биотестирования в экологическом контроле с использованием инфузорий».

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.

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.

Результаты научных исследований использованы в лекционных материалах дисциплины «Основы экотоксикологии» для студентов 2 курса, направления агрохимии и агропочвоведение, профиля агроэкология с 2017 года (Приложение).

ГЛАВА 1. ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НАНОЧАСТИЦ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Источники поступления наночастиц в окружающую среду

С начала своего существования на Земле присутствуют сверхмалые частицы. Вулканическая активность или гидротермальные процессы естественным образом производят частицы нанометрового масштаба (Navarro et al., 2008), но в результате деятельности человека появились неестественные (спроектированные) очень мелкие частицы в окружающей среде. В XXI веке мощное развитие получили нанотехнологии (Kessler, 2011; Contado, 2015). Термин «нанотехнология» относится к созданию, эксплуатации и утилизации материалов или продуктов, содержащих материалы в масштабе от 1 до 100 нм.

По состоянию на 30 марта 2018 года в мире насчитывается 1827 зарегистрированных единиц потребительских продуктов, в которых содержатся или применяются в процессе изготовления наноразмерные материалы (Consumer Product Inventory. Официальный сайт: электронный ресурс¹). Больше всего насчитывается продуктов, содержащих наносеребро (438 продуктов), титан (107), углерод (90), диоксид кремния (81), цинк (38) и золото (24).

Наиболее частым применением таких продуктов являются средства противомикробной защиты (381 продукт), покрытия (188) и изделия медицинского назначения (142). На основе опроса компаний, производящих и использующих техногенные наночастицы (Рисунок 1.1.1.), выяснилось, что наибольший объем производства приходится на TiO_2 , примерно 550-5500 тонн в год, на порядок меньше SiO_2 (55-55000 тонн в год) и $AlOx$ (55-5500 тонн в год), 55-550 тонн в год приходится на производство ZnO , 55-550 тонн в год на углеродные нанотрубки (УНТ), 5,5-5500 тонн в год составляют соединения $FeOx$,

¹ <http://www.nanotechproject.org/cpi/products/>

на CeO_x и Ag приходится 5,5-550 тонн в год, а на фуллерены и квантовые точки 0,6-5,5 тонн в год (Piccinno et al., 2012). Предполагается, что к 2020 году суммарный объем производства наноматериалов будет превышать полмиллиона тонн в год (Robichaud et al., 2009; Stensberg et al., 2011; Talreja, Kumar, 2018), большую часть которого составят серебро, диоксид титана, оксид цинка, диоксид кремния и углеродные наноматериалы (однослойные углеродные нанотрубки, многослойные углеродные нанотрубки и фуллерены) (Talreja, Kumar, 2018).

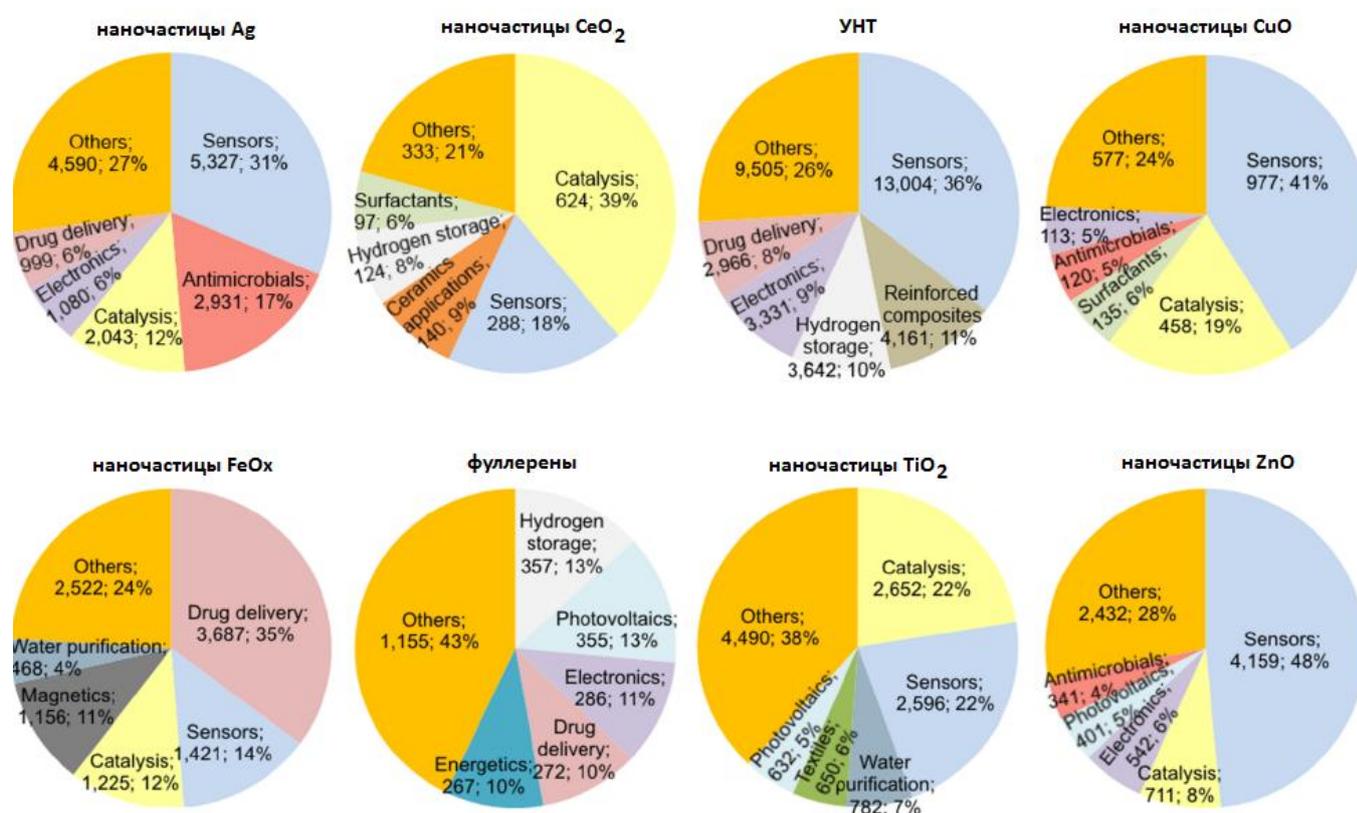


Рисунок 1.1.1. Области применения техногенных наноматериалов (Juganson et al., 2015).

Что касается российских нанотехнологий, то по данным Росстата, в 2015 году продукцию, связанную с ними, выпускали 567 предприятий и организаций,

включая 227 научных и научно-производственных (Роснано. Годовой отчет за 2015: электронный ресурс²).

Все возрастающее применение наночастиц, приводит к увеличению их синтеза. Однако информация о точных объемах производства наночастиц не является общедоступной, а отслеживание продуктов, содержащих наночастицы, представляется непростой задачей в свете того, что коммерческая продукция продается под многочисленными торговыми марками и различными маркировками (Klaine et al., 2008; Batley et al., 2013; Bondarenko et al., 2013; Juganson et al., 2015).

Очевидно, что увеличение производства и использования техногенных наночастиц неизбежно ведет к их появлению и концентрированию в окружающей среде (Banfield, Zhang, 2001; Biswas, Wu, 2005; Owen, Handy, 2007; McGillicuddy et al., 2017) (Рисунок 1.1.2.).

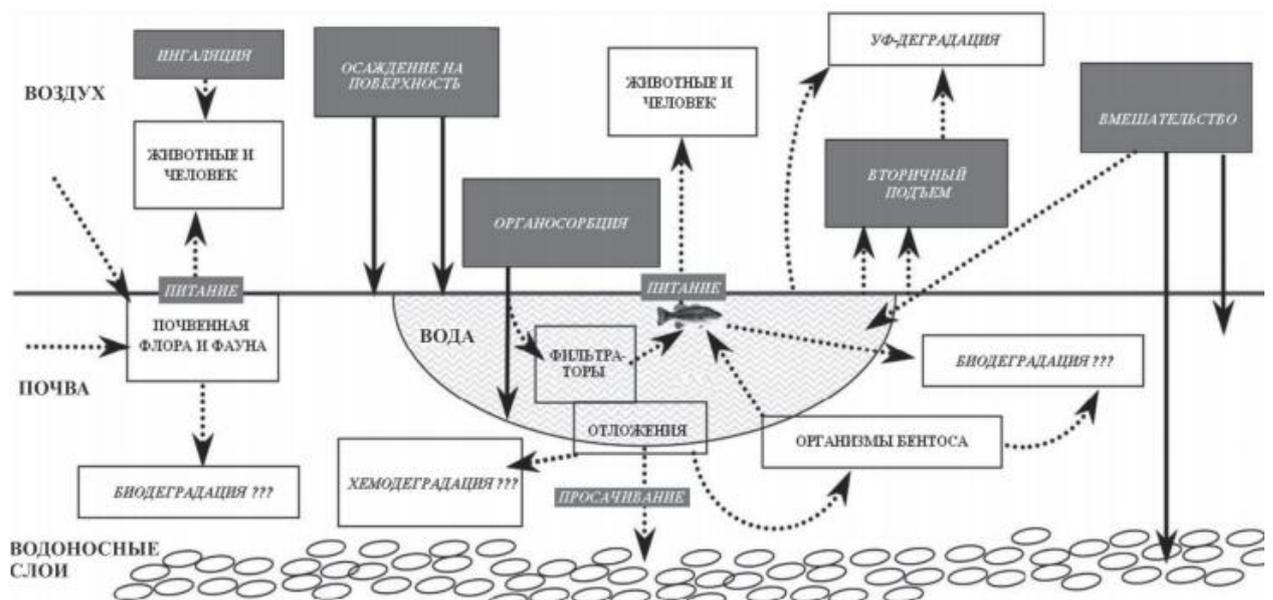


Рисунок. 1.1.2. Пути миграции наночастиц (Анциферова, 2012).

² http://www.rusnano.com/upload/images/normativedocs/ROSNANO-AO_Annual_Report_2015_RUS.pdf

Эмиссия наночастиц в атмосферу возможна на разных этапах производства, использования или утилизации продуктов, содержащих наноматериалы. Так, вследствие старения полимеров (Benn, Westerhoff, 2008), входящих в состав биоцидных, лакокрасочных и огнеупорных покрытий (Alongi et al., 2014; Al-Kattan et al., 2015; Yan et al., 2017; Yan et al., 2017), функционализированных пластмасс и текстиля (Benn, Westerhoff, 2008; Blaser et al., 2008; Windler et al., 2012; Lombi et al., 2014; Lorenz et al., 2012), в результате сжигания отходов (Forster et al., 2016), сварки (Albuquerque et al., 2015), детонационных взрывов в шахтах (Firestone et al., 2016) происходят выбросы наночастиц в атмосферу в виде аэрозоля, которые могут переноситься на огромные расстояния, вызывая глобальное загрязнение. В исследовании, проведенном в Киргизии, было показано, что составляющей коричневых атмосферных облаков являются наночастицы размерами от 60 нм (Дубовской и др., 2010). Также частицы с размерами в диапазоне 20 нм – 10 мкм присутствуют в циклоническом вихре Россби в течение времени его жизни, что позволяет частицам переноситься на расстояния до нескольких тысяч километров в горизонтальном направлении. При этом время жизни частицы в вихре увеличивается с уменьшением ее размера (Извекова, Попель, 2010). Исследования атмосферных взвесей в осадках, проведенных в городах Владивосток (Федорович, Нефедович, 2011), Уссурийск (Голохваст и др., 2012а), Биробиджан (Голохваст и др., 2013), Хабаровск (Голохваст и др., 2012б) выявили присутствие частиц размером до 100 нм, имеющих антропогенное происхождение. В Новосибирской области, было показано, что наночастицы присутствуют в снеговом покрове, причем их концентрация достигает 0,87 мг/л на территории города и уменьшается до 0,15 мг/л по мере удаления от него (Артамонова и др., 2016). Недавно СМИ сообщили о создании климатической системы в Тибетских горах, которая увеличит количество осадков на миллиарды кубических метров за счет выброса частиц

йодида серебра в атмосферу (DailyTechInfo. Экология: электронный ресурс³). Это означает, что указанные и другие наночастицы в составе дождевой воды или снега оседают на растениях, а также становятся контаминантами поверхностных слоев почв и водоемов.

Другим механизмом попадания наночастиц в почву являются практикуемые агроприемы орошения сельскохозяйственных угодий сточными водами (Волкова, Захаров, 2017) или внесения веществ, остающихся после отстаивания сточных и канализационных вод при производстве тканей, солнцезащитных средств и других продуктов (Куликова и др., 2010; Юрин, 2015; Барановский, 2017). Существует ряд предложений по обработке полей и сельскохозяйственных угодий препаратами, содержащими наночастицы, для стимуляции роста растений и ингибирования развития фитопатогенов (Gruere, 2012; Khot et al., 2012; Baker et al., 2017; Duhan et al., 2017; Thakur et al., 2018).

Наночастицы, загрязняющие почву и грунтовые воды, оказывают воздействие на грибы, обитателей почвы и корневую систему, в то время как наземная часть растительных организмов и грибов подвергается влиянию наночастиц, содержащихся в атмосферном воздухе (Юрин, 2015).

Частично вымываясь из почвы и атмосферы посредством дождей и снега, наночастицы попадают в водоемы и в мировой океан. Новые и старые окрашенные фасады зданий могут являться источником диоксида титана в сточных водах в концентрации $3,5 \times 10^7$ частиц в литре (Kaegi et al., 2008), при этом высвобождение наночастиц происходит пропорционально общей эрозии покрытия, что было доказано на наночастицах серебра (Kunniger et al., 2014). Также наночастицы серебра используются в технологии обработки помещений и строительных материалов, например, для снижения грибкового и бактериального обсеменения их поверхностей (Kaegi et al., 2008; Ogar et al., 2015). Вымывание

³ <https://www.dailytechinfo.org/eco/10135-v-kitae-nachato-sozdanie-klimaticheskoy-sistemy-kotoraya-uvlechit-kolichestvo-osadkov-na-milliardy-kubicheskih-metrov.html>).

частиц диоксида титана происходит из функционализированного наноматериалами текстиля во время коммерческой и лабораторной мойки в размере свыше 3% от общего их содержания в материале, формируя концентрацию в сливной воде 1,5-15 мкг/л (Windler et al., 2012). В другом исследовании было показано, что во время стирки от 1 до 100% наночастиц серебра, содержащихся в текстиле, может вымываться (Benn, Westerhoff, 2008), а содержание наночастиц в текстиле с антибактериальными свойствами равно примерно от 1,5 до 2925 мг/кг (Lorenz et al., 2012). Отметим, что высвобождение свободных частиц зависит от технологии производства текстиля, а не от количества частиц, присутствующих в изделии (Benn Westerhoff, 2008; Lombi et al., 2014). Другим источником наночастиц серебра являются стиральные машины с функционализированными поверхностями, формируя в сливной воде концентрацию наночастиц около 11 мкг/л (Farkas et al., 2011).

Нетрудно предположить, что другие потребительские продукты, содержащие наночастицы, такие как косметические средства (Бутова, Елошвили, 2009; Weir, 2012; Lu et al., 2015), зубная паста (Sokolov et al., 2017), пищевая упаковка (Медведев, Платонов, 2009; Silvestre et al., 2011; Duncan, 2011; Mihindikulasuriya, Lim, 2014; Carbone et al., 2016; Souza, Fernando, 2016) и пищевые продукты (Gruere, 2012; Peters et al., 2014; Lee et al., 2016; Ruiz-Palomero et al., 2016; Горбунова, Туниева, 2016), функционализированные пластмассы (Blaser et al., 2008), раневые повязки (Mehrabani et al., 2018; Ovais et al., 2018), биосенсоры и биомедицинские продукты (Monteiro et al., 2011; Yadollahpour et al., 2015; You et al., 2016; Wang et al., 2015; Kwon et al., 2018), фильтры для воды (Jain, Pradeep, 2005; Simeonidis et al., 2016; Praveena et al., 2018) и другое, в конечном итоге, оказываются в канализации и, преодолевая очистные сооружения, попадают в природные водные среды (Gottschalk et al., 2009; Colman et al., 2014; Hedberg et al., 2014; Wright et al., 2018), оказывая прямое воздействие на обитателей водной экосистемы (McGillicuddy et al., 2016; Wang et al., 2016a; Zhang et al., 2016; Callaghan, MacCormack, 2017). Предполагается, что в обозримом

будущем в водоемы будет поступать около 63 тонн наносодержащих препаратов ежегодно, составляя концентрацию в водных средах от 0,03 до 0,32 мкг/л (Batley et al., 2013).

Таким образом, наночастицы, создавая беспрецедентный класс промышленных загрязнений окружающей среды, непосредственно воздействуют на все виды организмов. Наночастицы способны аккумулироваться в различных тканях, а значит переходить на следующий трофический уровень, оказывая косвенное влияние на организмы, кормом для которых они являются (Lee, An, 2015; Lee et al., 2015; Bundschuh et al., 2016; Wang et al., 2016б; Bhuvaneshwari et al., 2018; Park et al., 2018).

По данным Келлер с соавторами (Keller et al., 2013), из 260-309 тысяч метрических тонн наночастиц, произведенных во всем мире в 2010 году, 63-91% оказались на полигонах, остальное было выброшено в почву (8-28%), водоемы (0,4-7%), и атмосферу (0,1-1,5%). Попавшие в окружающую среду техногенные наноматериалы, не производимые самой природой, очень трудно биологически разлагаются или усваиваются. Их вред может быть связан с химической природой веществ, из которых они были произведены, повышенной мобильностью по сравнению, например, с микронными размерами частиц, а также их устойчивостью в почве, воде, воздухе, бионакоплением в живых объектах, непредсказуемым взаимодействием с химическими и биологическими материалами (Сизова и др., 2016). Поэтому риски, вызванные техногенными наноматериалами, как для человека, так и окружающей среды, должны быть оценены.

1.2. Современные подходы к оценке токсичности наночастиц

Создание нормативных документов по методологии оценки токсичности наноматериалов, их биосовместимости и деградируемости, а также сама оценка токсичности наноматериалов являются актуальными задачами мирового сообщества (Макаров, 2013). Рабочая группа по техногенным наноматериалам

при Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР), включающая 21 страну, является одной из международных организаций, занимающихся координацией работ по биобезопасности наноматериалов (ОЭСР. Официальный сайт: электронный ресурс⁴; Макаров, 2013).

Первоначальный этап исследований безопасности наноматериалов отождествляется с обнародованием Национальной нанотехнологической инициативы (The National Nanotechnology Initiative – NNI) в США в 2000 году (NNI. Официальный сайт: электронный ресурс⁵). Американское агентство по охране окружающей среды (Environmental Protection Agency – EPA) проводит исследования экологической безопасности продуктов, созданных с использованием наноматериалов. В первую очередь это касается изделий, содержащих в своем составе наночастицы серебра, обладающих антимикробным действием (EPA. Официальный сайт: электронный ресурс⁶; Макаров, 2013). В 2004 году была принята Европейская стратегия в области нанотехнологий, в которой было указано на необходимость оценки потенциальной опасности наночастиц для здоровья человека и окружающей среды (Макаров, 2013).

В настоящее время одним из подходов к оценке токсичности техногенных наночастиц является постановление Европейского союза REACH (от англ. Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals – регистрация, оценка и авторизация химических веществ). Так, потенциальный экотоксикологический эффект всех химических веществ, включая техногенные наночастицы, которые производятся в объеме более одной тонны в год и проданных в ЕС, подлежат оценке. Количество требуемых тестов зависит от объема производства. Если она превышает 1 тонн в год, должны быть проведены краткосрочные испытания с водными беспозвоночными (предпочтительными видами являются дафнии) и

⁴ <http://www.oecd.ru>

⁵ <http://www.nano.gov/>

⁶ <http://www.EPA.gov>

фотосинтезирующими организмами (предпочтительнее водоросли). В случае объема производства свыше 10 тонн в год требуются дополнительные краткосрочные испытания на рыбах и изучение потребления кислорода микроорганизмами активного ила. Вышеупомянутые водные исследования должны быть выполнены также как долгосрочные эксперименты для веществ, производимых свыше 100 тонн в год, а также тесты с участием рыб на ранней стадии жизни, краткосрочные тесты на зародышевых эмбрионах, мальках и молоди. При производстве более 100 тонн в год необходимо проведение кратковременных испытаний для таких обитателей суши, как беспозвоночные животные, растения и почвенные микроорганизмы. Наконец, если объем производства определенного вещества превышает 1000 тонн в год, долгосрочные испытания токсичности должны быть выполнены с беспозвоночными, растениями, микроорганизмами донных отложений и птицами в дополнение ко всем ранее упомянутым водным и наземным исследованиям (Regulation EC No 1907/2006).

Необходимость оценки безопасности наноматериалов в России обосновывается постановлением Главного государственного санитарного врача РФ № 54 от 23.07.2007 «О надзоре за продукцией, полученной с использованием нанотехнологий и содержащей наноматериалы», постановлением Госсанэпиднадзора «Концепция токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов» и Приказом Роспотребнадзора – методические рекомендации «Оценка безопасности наноматериалов» (Онищенко и др., 2007; МР 1.2.2566-09, 2009; МУ 1.2.2520-09, 2009; МР 1.2.2522-09, 2009; МУ 1.2.2634-10, 2010). В 2009 году был создан технический комитет, деятельность которого заключается в «разработке, изготовлении, обороте, утилизации, безопасности наноматериалов, метрологическом обеспечении наноиндустрии, классификации и определении терминов в сфере нанотехнологий, применении биологических систем для

решения технологических задач в нанодиапазоне и внедрении методов генной инженерии» (ТК 441 «Нанотехнологии», 2009).

Биологические системы, применение которых возможно для выявления вредных воздействий техногенных наноматериалов, так же как и для других химических веществ, весьма разнообразны. В настоящее время их подразделяют на семь подгрупп в соответствии с основными биологическими дисциплинами:

- простейшие организмы;
- микроорганизмы;
- различные гидробионты;
- растения;
- организмы высших животных;
- клеточные и субклеточные элементы.

Биотестирование – один из приемов исследования в области токсикологии, используемый с целью установления степени токсического действия химических, физических и биологически неблагоприятных факторов среды, потенциально опасных для человека и компонентов экосистем (Гелашвили и др., 2016).

1.3. Токсикологическая характеристика наночастиц

1.3.1. Наночастицы серебра

Значительное число исследований оценки токсичности наночастиц серебра выполнено на патогенных грибах, поражающих растения и вызывающих заболевания животных и человека (Таблица 1.3.1.1.). Согласно литературным данным, наносеребро проявляет выраженные фунгицидные свойства в отношении ряда грибов при довольно низких концентрациях, что предполагает их широкую перспективу использования в медицине (Kim et al., 2008) и агрохимии (Liu, Lal, 2015).

Таблица 1.3.1.1. Показатели ЕС₅₀ наночастиц серебра.

Тест-объект	Размер частиц	Тест-функция	ЕС ₅₀	Ссылка
Бактерии				
<i>Escherichia coli</i>	10 нм	Образование колоний на агаризованной среде за 4 часа	0,27 мг/л	Ivask et al., 2014
	20 нм		0,51 мг/л	
	40 нм		1,51 мг/л	
	60 нм		2,56 мг/л	
	80 нм		2,96 мг/л	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	10 нм		0,55 мг/л	
	20 нм		0,99 мг/л	
	40 нм		2,12 мг/л	
	60 нм		3,81 мг/л	
	80 нм		5,52 мг/л	
Грибы				
<i>Aspergillus fumigatus</i>	55 нм	Скорость роста за 5-14 дней	~100 мг/л	Ogar et al., 2015
<i>Penicillium brevicompactum</i>			~30 мг/л	
<i>Cladosporium cladosporoides</i>			~30 мг/л	
<i>Mortierella alpina</i>			-	
<i>Chaetomium globosum</i>			<30 мг/л	
<i>Stachybotrys chartarum</i>			<30 мг/л	

Таблица 1.3.1.1. Продолжение.

<i>Грибы</i>				
<i>Fusarium culmorum</i>	5-50 нм	Скорость роста за 30 часов	~0,12-2,5 мг/л	Kasprowicz et al., 2010
		Прорастание спор 24 часа	~5-10 мг/л	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Скорость роста за 37 часов	4000 мг/л	Nasrollahi et al., 2011
	10 нм	Количество колониеобразующих единиц за 4 часа	1,53 мг/л	Ivask et al., 2014
	20 нм		2,72 мг/л	
	40 нм		7,28 мг/л	
	60 нм		7,33 мг/л	
	80 нм		8,17 мг/л	
<i>Candida albicans</i>	<100 нм	Скорость роста за 37 часов	500 мг/л	Nasrollahi et al., 2011
	25 нм	Скорость роста за 72 часа	>0,21 мг/л	Panacek et al., 2009
	5 нм	Количество колониеобразующих единиц через 24 часа	>0,4–1,6 мг/л	Monteiro et al., 2011
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	3 нм	Скорость роста за 24 часа	< 2-4 мг/л
<1-4 мг/л				
<i>Candida tropicalis</i>	25 нм	Скорость роста за 72 часа	< 7 мг/л	Panacek et al., 2009
			>0,84 мг/л	

Таблица 1.3.1.1. Продолжение.

Грибы				
<i>Candida parapsilosis</i>	25 нм	Скорость роста за 24 часа	<4-25 мг/л	Kim et al., 2008
<i>Candida krusei</i>			<13 мг/л	
			< 1-7 мг/л	
<i>Candida glabrata</i>	5 нм	Количество колониеобразующих единиц через 24 часа	>0,4-3,3 мг/л	Monteiro et al., 2011
<i>Candida parapsilosis</i>	25 нм	Скорость роста за 72 часа	>1,69 мг/л	Panacek et al., 2009
Одноклеточные водоросли				
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	20-30 нм	Прирост культуры за 96 часов	0,19 мг/л	Griffitt et al. 2008
	10 нм	Прирост культуры за 72 часа	0,18 мг/л	Ivask et al. 2014
	20 нм		0,52 мг/л	
	40 нм		0,82 мг/л	
	60 нм		0,94 мг/л	
	80 нм		1,14 мг/л	
	3-8 нм		0,032 мг/л	Ribeiro et al., 2014
	6 нм		3 мкг/л	Angel et al., 2013
	13 нм		20 мг/л	

Таблица 1.3.1.1. Продолжение.

Одноклеточные водоросли				
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	35 нм	Фотосинтетическая активность за 4,5 часа	0,2 мг/л	Wang et al., 2012
	5-25 нм	Прирост культуры за 72 часа	0,74- 2,57 мг/л	Sohn et al., 2015
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	50 нм	Жизнеспособность (по окрашиванию FDA)	< 50 мг/л	Hazani et al., 2013
<i>Chlorella vulgaris</i>			<50 мг/л	
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	6 нм	Прирост культуры за 72 часа	3,7 мг/л	Angel et al., 2013
	13 нм		2,4 мг/л	
Водные беспозвоночные				
<i>Chydorus sphaericus</i>	35 нм	Выживаемость за 48 часов	0,3 мг/л	Wang et al., 2012
<i>Daphnia pulex</i>	15 нм		8,95 мкг/л	Volker et al., 2013
	5-10 нм		15-17 мкг/л	Blinova et al., 2013
	20-30 нм		0,040 мг/л	Griffitt et al et al., 2008
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	20-30 нм		0,067 мг/л	
	6 нм		0,15 мг/л	Angel et al., 2013
	13 нм		2 мг/л	

Таблица 1.3.1.1. Продолжение.

Водные беспозвоночные				
<i>Daphnia magna</i>	35 нм	Выживаемость за 96 часов	0,1 мг/л	Gaiser et al., 2011
	10 нм	Плодовитость за 48 часов	0,01 мг/л	Ivask et al., 2014
	20 нм		0,034 мг/л	
	40 нм		0,141 мг/л	
	60 нм		0,168 мг/л	
	80 нм		0,218 мг/л	
	10 нм	Выживаемость за 48 часов	5,4 мкг/л	Kennedy et al., 2010
	20 нм		5,3 мкг/л	
	50 нм		5,4 мкг/л	
	80 нм		17,7 мкг/л	Asghari et al., 2012
	5-25 нм		2-4 мкг/л	
	20 нм	0,187 мг/л	Ribeiro et al., 2014	
	3-8 нм	Выживаемость при отсутствии кормления за 24 часа		13,64 мкг/л
		Плодовитость за 21 день		1 мкг/л
	<i>Daphnia magna</i>	<100 нм	Генотоксическая реакция	1 мкг/л
Выживаемость за 48 часов			1-2 мкг/л	
		5-25 нм	12-139 мкг/л	Sohn et al., 2015
		15 нм	121 мкг/л	Volker et al., 2013

Таблица 1.3.1.1. Продолжение.

Водные беспозвоночные				
<i>Daphnia galeata</i>	15 нм	Выживаемость за 48 часов	13,9 мкг/л	Volker et al., 2013
<i>Thamnocephalus platyurus</i>	5-10 нм	Выживаемость за 24 часа	20-27 мкг/л	Blinova et al., 2013
<i>Gammarus fossarum</i>	-	Выживаемость за 96 часов	1 – 2,2 мкг/л	Funck et al., 2013
<i>Thamnocephalus platyurus</i>	5-10 нм	Выживаемость за 24 часа	20-27 мкг/л	Blinova et al., 2013
<i>Gammarus fossarum</i>	-	Выживаемость за 96 часов	1 – 2,2 мкг/л	Funck et al., 2013
Водные позвоночные				
<i>Danio rerio</i>	35 нм	Выживаемость за 96 часов	1,61 мг/л	Wang et al., 2012
	20-30 нм	Выживаемость за 48 часов	7 мг/л	Griffitt et al., 2008
<i>Pimephales promelas</i>	10 нм		41 мкг/л	Kennedy et al., 2010
	20 нм		60,7 мкг/л	
	50 нм		64,1 мкг/л	
80 нм	125,6 мкг/л			
<i>Oryzias latipes</i>	5-25 нм	Выживаемость за 96 часов	1,8- 4,18 мг/л	Sohn et al., 2015
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	16 нм		0,25-2,16 мг/л	Kalbassi et al., 2013

Таблица 1.3.1.1. Продолжение.

Клетки млекопитающих				
Мышечные фибробласты мышцы	10 нм	Жизнеспособность за 24 часа	16,9 мг/л	Ivask et al., 2014
	20 нм		22 мг/л	
	40 нм		28,7 мг/л	
	60 нм		30,9 мг/л	
	80 нм		34,9 мг/л	
Гепатоциты радужной форели	<100 нм	Жизнеспособность за 24 часа	>19 мг/л	Katsumiti et al., 2015
Жаберные клетки			5 мг/л	
Фибробласты человека	25 нм	Жизнеспособность за 72 часа	30 мг/л	Panacek et al., 2009
Растения				
<i>Cucurbita pepo</i>	100 нм	Прирост биомассы	100 мг/л	Stampoulis et al., 2009
		Транспирация	500 мг/л	
<i>Triticum aestivum</i>	<100 нм	Всхожесть, прирост биомассы	10 мг/л	Юркова и др., 2014
<i>Arabidopsis thaliana</i>	20 нм	Рост корня в течение 2-х недель	25,5 мг/л	Geisler et al., 2013
	40 нм			
	80 нм			
<i>Arabidopsis thaliana</i>	10 нм	Рост корня в течение 2-х недель	3 мг/л	Qian et al., 2013
<i>Lolium perenne</i>	5 нм	Проращивание семян	10 мг/л	El-Temsah, Joner, 2012
<i>Lycopersicum esculentum</i>	-	Рост корня	5000 мг/л	Song et al., 2013

Так, для патогенных микроорганизмов рода *Candida* ингибирующий эффект наступал уже при 0,4-25 мг/л (Hwang et al., 2012; Kim et al., 2008, Monteiro et al.,

2011), а для *Trichophyton mentagrophytes* – при 1-4 мг/л (Kim et al., 2008). Близкие по значению результаты получены в другом исследовании (Panacek et al., 2009), где для микроорганизмов рода *Candida* минимальная ингибирующая концентрация составляла 0,21 мг/л. Выделим, что фунгистатическое действие наночастиц в этой работе усиливалось в 4 раза благодаря их стабилизации додецилсульфатом натрия. Наночастицы оказали значительное негативное действие на рост *Trichosporon asahii*, минимальная ингибирующая концентрация составила 0,5 мг/л (Xia et al., 2016). Начальное угнетение роста культуры *Bipolaris sorokiniana* происходило при гораздо большей концентрации, равной 50 мг/л, а при значении 100 мг/л наблюдалось полное ингибирование роста мицелия (Mishra, Singh, 2015). В работе А. Огара с коллегами (Ogar et al., 2015) проведено сравнение роста шести культур грибов (*Penicillium brevicompactum*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium cladosporoides*, *Chaetomium globosum*, *Stachybotrys chartarum*, *Mortierella alpina*). Для всех видов кроме *M. alpina* было установлено ингибирование скорости распространения мицелия по чашке Петри, что сопровождалось изменением цвета культур.

Среди обитателей пресноводных водоемов наиболее чувствительными организмами к действию наночастиц являются водные рачки. Так, при одновременном сравнении токсического действия наночастиц на одноклеточную водоросль *Pseudokirchneriella subcapitata*, водных рачков *Daphnia pulex*, *Ceriodaphnia dubia*, взрослых и ювенальных особей рыбок *Danio rerio* было установлено наибольшее влияние на водных рачков (Griffitt et al., 2008). В работе (Wang et al., 2012) было исследовано воздействие наночастиц на одноклеточную водоросль *Raphidocelis subcapitata*, водного рачка *Chydorus sphaericus*, рыбок *D. rerio* и зафиксирована высокая чувствительность у рачков и низкая у одноклеточной водоросли. Полученные результаты подтвердились в других исследованиях, в которых водные рачки *Daphnia magna* оказались самым чувствительным тест-организмом по сравнению с одноклеточной водорослью *P. Subcapitata*, рыбками *D. rerio* (Ribeiro et al., 2014), бактериями *Escherichia coli*,

Pseudomonas fluorescens, дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*, одноклеточной водорослью *P. subcapitata* и линией клеток фибробластов мыши (Ivask et al., 2014).

При исследовании действия наночастиц на высшие растения в литературе сообщаются противоречивые результаты: одними авторами показано негативное влияние наносеребра, другие утверждают о стимулирующем эффекте таких наночастиц на растения или об отсутствии эффекта вовсе. Так, обработка семян кукурузы, огурцов и томатов наносеребром в концентрации 500 мг/л оказывала негативное действие на рост корней и надземной части, а также содержание белка и ДНК (Kuamri et al., 2012). В исследовании, выполненном на томатах *Lycopersicon esculentum*, наблюдалось отсутствие эффекта в энергии прорастания и значительное уменьшение длины корня при концентрации 50 мг/л (Song et al., 2013). В исследовании других авторов было найдено снижение прорастания семян райграса *Lolium perenne*, ячменя *Hordeum vulgare* и льна *Linum usitatissimum*. Наибольший ингибирующий эффект был зарегистрирован на семенах райграса при концентрации наночастиц 10 мг/л. При этом показатели прорастания льна не изменились даже при концентрации наночастиц 1000 мг/л (El-Temsah, Joner, 2012). В другом исследовании, выполненных на проростках бобов *Vicia faba*, показано поглощение наночастиц и генотоксический эффект при концентрации 12,5-100 мг/л (Patlolla et al., 2012).

В ряде исследований указывалось на отсутствие какого-либо эффекта при использовании наночастиц в концентрациях 0,1-5000 мг/л для клещевины *Ricinus communis* и томатов *L. esculentum* (Yasur, Rani, 2013), огурца *Cucumis sativus* и салата *Lactuca sativa* (Barrena et al., 2009).

В то же время другие авторы наблюдали стимуляцию водопоглощения и ростовых процессов у проростков пшеницы при концентрациях 0,1-10 мг/л. Показатели энергии прорастания превышали контрольный вариант на 4,7-9,3 %, сухой массы надземной части на 5,7 %, а корней на 11 %. Однако, при дальнейшем увеличении концентрации наносеребра отмечалось снижение

стимулирующего эффекта и угнетение ростовых процессов по сравнению с контролем (Юркова и др., 2014). Также сообщалось, что воздействие коллоидного раствора наночастиц размером 18 нм на саженцы резуховидки Таля *Arabidopsis thaliana* в течение 21 дня привело к ускорению удлинения корня при концентрации наночастиц до 30 мг/л, тогда как уровень 60 мг/л ограничивал рост корней (Mirzajani et al., 2013). Кроме того было продемонстрировано стимулирующие влияние наночастиц на ростовые процессы горчицы сарептской *Brassica juncea* (Sharma et al., 2012), рукколы *Eruca sativa* (Vannini et al., 2013), фасоли *Phaseolus vulgaris*, кукурузы *Zea mays* (Salama, 2012).

При изучении ответных реакций 11 видов растений на присутствие наночастиц установлено, что положительные и отрицательные эффекты для различных тест-объектов и функций сильно варьируются (Yin et al., 2012), что говорит об исключении универсального механизма воздействия наночастиц для всех видов растений (Ma et al., 2010; Miralles et al., 2012).

Эксперименты с участием млекопитающих хоть и способны приблизить нас к пониманию воздействия наночастиц на здоровье человека, в настоящее время окутаны спорами об этичности методов. Поэтому преимущество использования первичных клеточных культур и непрерывных культур клеток высших позвоночных организмов *in vitro* является очевидным. Так, при исследовании цитотоксического действия наночастиц на первичные клеточные культуры рыб (гепатоциты) и непрерывные клеточные культуры рыб (RTL-W1, RTH-149, RTG-2) выяснилось, что последние являются весьма чувствительными индикаторами токсичности наночастиц (Connolly et al., 2015). Ранее были выявлены цитотоксические эффекты наночастиц серебра по отношению к первичным жаберным клеткам и гепатоцитам радужной форели *Oncorhynchus mykiss* (Farkas et al., 2010, 2011b; Massarsky et al., 2014). В результате было отмечено, что индикация таких эффектов, как изменение уровня глутатиона и АФК, может выступать биомаркерами токсичности наночастиц серебра. В другой работе, найдено, значительное снижение митохондриальной функции в клетках печени

мышь, подвергнутых воздействию наночастиц при концентрации 5-50 мг/л (Hussain et al., 2005).

Многие авторы объясняют неоднозначность результатов различиями в характеристиках самих наночастиц. В экспериментах на рачках *D. magna* использование наночастиц серебра примерно одного размера (5-25 нм) трех разных производителей получены значения EC_{50} в диапазоне 0,002-0,187 мг/л (Asghari et al., 2012).

Одной из важнейших характеристик наночастиц является их склонность к образованию агломератов – слипанию наночастиц, что способствует увеличению размеров частиц, находящихся в растворе, а значит изменению их физико-химических свойств. На примере двухдневных мальков и молоди радужной форели *Oncorhynchus mykiss* было показано, что увеличение агломерации наночастиц серебра приводит к снижению токсичности (Kalbassi et al., 2013). В большей степени к агломерации склонны суспензии порошкообразного наносеребра по сравнению с коллоидным серебром. Так, коллоидное серебро оказалось более токсично, чем суспензии порошкообразного вещества в 60-100 раз; в зависимости от времени воздействия значения EC_{50} составили 0,25-2,75 мг/л и 28,25-186,42 мг/л соответственно. Молодь оказалась гораздо менее чувствительна к воздействию исследуемых токсикантов. Наблюдались также патологии жабер, в частности нахождение агломератов под жаберной крышкой и в полости рта (Kalbassi et al., 2013). В исследовании других авторов, коллоидный раствор наночастиц серебра также оказался в 47-94 раза токсичнее взвешенного порошка по отношению к *D. magna* (Asghari et al., 2012).

Во избежание агломерации и преждевременного осаждения наночастиц, используются различные стабилизирующие вещества и покрытия, способствующие взвешиванию наночастиц в растворе, которые в свою очередь могут вносить дополнительный вклад в токсичность. Так, при сравнении уровня токсичности гидрозолей серебра и наночастиц, имеющих разное покрытие (цитрат, ПВП и ЭДТА), по отношению к водным организмам выяснилось, что

самым токсичным из представленных образцов является коллоидное серебро, а самым нетоксичным наночастицы серебра, покрытые ПВП (Kennedy и др., 2010). При сопоставлении наночастиц, покрытых ПВП и цитратом, по способности аккумулироваться в моно- и мультислоях первичных жаберных клетках радужной форели, было показано, что поглощение через монослойный эпителий наночастиц с цитратом выше, чем с ПВП, однако наночастицы с ПВП поглощаются быстрее в мультислоях. Также после воздействия обоих видов наночастиц был отмечен повышенный уровень глутатиона, что, как предполагается, является реакцией на окислительный стресс (Farkas et al., 2011). В исследовании наночастиц примерно одинакового размера по отношению к *Phaeodactylum tricornutum*, *P. subcapitata* и *C. Dubia* был показан более выраженный токсический эффект наночастиц, покрытых цитратом, чем наночастиц, покрытых ПВП, для всех исследуемых организмов (Angel et al., 2013). При изучении реакции корней *Allium cepa* было показано более высокая токсичность наночастиц, покрытых бромидом цетилтриметиламмонием, по сравнению с наночастицами, покрытыми цитратом и ПВП (Cvjetko et al., 2017). В другой работе, выполненных на высших растениях, было установлено, что эффект наночастиц, имеющих разное покрытие, сильно варьируется как от выбора тест-объекта, так и выбора тест-функций (Yin et al., 2012).

При исследовании воздействия наночастиц на различные организмы открытым остается вопрос о зависимости их токсичности от размеров. Так, было показано увеличение токсического действия с уменьшением размера частиц в отношении водных организмов (Kennedy et al., 2010). Тот же эффект был получен на *D. magna*, где наноразмерное серебро оказалось в 4 раза более токсичным, чем микроразмерные частицы (Gaiser et al., 2011). Увеличение токсического эффекта при уменьшении размера частиц было доказано и в экспериментах Энжела с коллегами (Angel et al., 2013). В работе Иваска с коллегами (Ivask et al., 2014) исследовано токсическое действие наночастиц серебра 10, 20, 40, 60, 80 нм по отношению к двум культурам бактерий *E. coli*, *P. fluorescens*, дрожжам *S.*

cerevisiae, одноклеточной водоросли *P. subcapitata*, водным рачкам *D. magna* и линии клеток фибробластов мыши. На всех тест-объектах было показано усиление токсического действия с уменьшением размера частиц. Однако в эксперименте на рисе *Oryza Sativa* был зафиксирован противоположный эффект: частицы размером 20 нм не оказали никакого эффекта, в то время как частицы размером 150 нм приводили к значительному сокращению темпов прорастания и последующему ингибированию роста при концентрациях до 100 мг/л (Thuesombat et al., 2014).

В исследованиях других авторов было проведено сравнение токсичности суспензий частиц, имеющих разную форму. Оказалось, что палочковидная форма наночастиц менее токсична, чем шарообразная в отношении рачков *D. magna*, японской оризии *Oryzias latipes* и одноклеточной водоросли *R. subcapitata* (Sohn et al., 2015). На линию эпителиальных клеток радужной форели и эмбрионы рыбок *D. rerio* наночастицы шаровидной формы проявили менее выраженное токсическое действие по сравнению с наночастицами, имеющими форму пластин, несмотря на более низкие темпы растворения и биодоступности этой формы наноматериала (George et al., 2012).

1.3.2. Наночастицы диоксида титана

Диоксид титана представляет собой в основном три кристаллические фазы, а именно: анатаз (тетрагональная), рутил (тетрагональная) и брукит (орторомбическая) (Cho et al., 2013). Среди них рутил является наиболее распространенной и естественной формой, так как является неотъемлемой частью тяжелых минералов. Поскольку в природе существует дефицит брукита, эта форма не имеет существенного экономического значения (Allen et al., 2009).

Токсичность наночастиц диоксида титана обусловлена их фотокаталитической активностью, что способствует увеличению ингибирующего эффекта после обработки объекта УФ излучением (Zhang, Sun, 2004; Dalai et al., 2013; Gurr et al., 2005; Hund-Rinke, Simon, 2006; Iswarya, 2015;). Установлено, что

фотокаталитическое действие наночастиц диоксида титана значительно усиливается при воздействии коротковолнового УФ-С по сравнению с УФ-А и УФ-В излучениями (Termtanun, 2013). В работе Миллера с коллегами (Miller et al., 2012) было сообщено, что относительно низкие уровни ультрафиолетового излучения, согласующиеся с природным солнечным, могут способствовать проявлению токсичности наночастиц диоксида титана по отношению к фитопланктону, в то время как при блокировании УФ излучения токсический эффект наночастиц не наблюдался.

Токсические свойства наночастиц диоксида титана могут варьироваться в зависимости от их кристаллической структуры (Полонский, Асанова, 2018а). Две аллотропные формы наночастиц: анатаз и рутил имеют разные поверхностные свойства и реакционную способность (Ji et al., 2011; Silva, 2016). В то время как их комбинации могут проявлять и антагонистическое, и аддитивное действие (Iswarya et al., 2015).

В исследовании Хиракава с коллегами (Hirakawa et al., 2004) было найдено, что анатазная форма наночастиц обладает большим цитотоксическим действием, чем рутил, обусловленным повреждениями ДНК. В другом исследовании была показана способность рутила инициировать апоптоз вследствие образования АФК, тогда как анатаз вызывал клеточный некроз через повреждение мембран клеток (Braydich-Stolle et al., 2009). В экспериментах Извари с коллегами (Iswarya et al., 2015) анатазная форма зарегистрирована в два раза более токсичной, чем рутил, показатели EC_{50} по приросту водоросли *Chlorella sp* составили 3,4 и 6,2 мг/л соответственно в 72-часовой экспозиции при УФ-С излучении. Кроме того было установлено значительное снижение концентрации хлорофилла в 1,7-37 раз в образцах, содержащих только анатазную форму, по сравнению с рутилом. Была зафиксирована фотоиндуцированная токсичность наночастиц анатазной формы при концентрации ≤ 1 мг/л для *Scenedesmus obliquus*, что выражалось в увеличении АФК, адгезии наночастиц на поверхности клеток и повреждении мембраны (Dalai et al., 2013). Способность к адгезии наночастиц на поверхности

клетки водоросли и образование АФК регистрировалась и другими авторами (Sadiq et al., 2011; Lin et al., 2012; Miller et al., 2012).

Описано (Lin et al., 2012) воздействие на рост *Chlorella sp.* наночастиц с размерами 5-10 нм при концентрации 4,9 мг/л. Аналогичное торможение роста водоросли *P. subcapitata* наночастицами диоксида титана имело место при концентрации 5,8 мг/л (Aguoja et al., 2008). Уменьшение прироста водоросли *Isochrysis galbana* отмечалось при концентрации 1 мг/л, а *Thalassiosira pseudonana* и *Dunaliella tertiolecta* при концентрации 3 мг/л после обработки УФ излучением (Miller et al., 2012). Аналогичное сокращение прироста на 11-27% было показано на трех видах водоросли *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus quadricauda* и *Chlamydomonas moewusii* в присутствии смеси анатаза и рутила (Cardinale et al., 2012), а снижение прироста *P. tricornutum* наблюдалось при концентрации наночастиц менее 20 мг/л (Wang et al., 2016a).

В экспериментах с 48-часовой экспозицией на водном рачке *C. dubia* 50%-ная смертность отмечалась в вариантах с концентрациями: 37 мг/л для анатазной формы наночастиц размером менее 25 нм и 48 мг/л для рутила размером менее 100 нм (Iswarya et al., 2016). Токсическое действие анатаза размером частиц менее 25 нм при 48-часовой экспозиции и соблюдении 16-часового фотопериода было установлено для того же тест-объекта, где показатель EC_{50} был равен величине 8,26 мг/л. При этом негативное влияние уменьшалось в отсутствии световой фазы на протяжении всего эксперимента, показатель EC_{50} был зарегистрирован при втрое большей величине диоксида титана (27,45 мг/л) (Dalai et al., 2013). Аналогичное 50%-ное снижение прироста морской водоросли *D. tertiolecta* было получено в присутствии наночастиц размером 20 нм при концентрации 24 мг/л (Manzo, 2015). Для рачков *D. magna*, 50%-ная смертность отмечалась уже при концентрации наночастиц диоксида титана 0,8 мг/л, причем исключение фотопериода приводило к снижению их токсичности, показатель EC_{50} составил значение 19,3 мг/л (Amiano et al., 2012). В статье Марконе с соавторами (Marccone

et al., 2011) продемонстрировано отсутствие токсичности анатаза и рутила для *D. similis* при концентрации до 100 мг/л.

В работах, посвященных высшим растениям, также как и в случае использования наночастиц серебра, были получены неоднозначные результаты. При концентрации 1000 мг/кг установлено значительное снижение энергии прорастания томатов *Solanum lycopersicum* после 1 часа замачивания в суспензии наночастиц размером 25 нм (Raliya et al., 2015). Исследования роста томата *L. esculentum* показали, что при концентрации наночастиц оксида титана 100 и 150 мг/л наблюдается снижение энергии прорастания семян, угнетение развития морфологических структур растений: длины корня, высоты стебля, количества настоящих листьев (Вардуни и др., 2017). Иные исследователи на том же тест-объекте при использовании наночастиц размером 27 нм после 48-часового замачивания семян эффекта не наблюдали до концентрации 4000 мг/л (Song et al., 2013). Другими авторами сообщается об улучшении фотосинтетической функции в листьях того же тест-объекта (Qi et al., 2013). Реакция также отсутствовала и при воздействии наночастиц на капусту *Brassica campestris* и салат *Lactuca sativa* в течение 15 дней после 48-часового замачивания в суспензии при концентрации 5000 мг/л (Song et al., 2013). В исследовании, выполненном на кукурузе *Z. mays* и азиатском рисе *O. sativa*, было подтверждено отсутствие эффекта после двухчасового замачивания семян в суспензии наночастиц размером 21 нм при концентрации до 2000 мг/л (Yang et al., 2015). Однако в другой работе установлено существенное снижение энергии прорастания кукурузы *Z. mays* и горошка нарбонского *Vicia narbonensis* в присутствии рассматриваемых наночастиц (Castiglione et al., 2011). Аналогичное снижение энергии прорастания было экспериментально доказано для семян пшеницы *Triticum aestivum*, когда анатазная форма наночастиц оказывала существенное влияние при концентрации 150 мг/л, в то время как смесь анатаза и рутила не воздействовала на скорость линейного роста (Lague et al. 2011) и биомассу побегов (Moll et al., 2017), влияние проявлялось лишь в снижении биомассы корня (Silva et al., 2016). Полученные

данные согласуются с результатами одновременного изучения пшеницы *T. aestivum*, фасоли *P. vulgaris* и амаранта *Amaranthus cruentus*. В этих экспериментах после замачивания и обработки семян суспензиями наночастиц, было доказано отсутствие воздействия на скорость начального роста по сравнению с контрольными образцами растений (Астафурова и др., 2011). В другом исследовании было найдено, что эффект наночастиц зависит от их концентрации в субстрате. Так, масса корней и побегов, а также содержание хлорофилла превышали контрольные образцы при концентрации наночастиц менее 60 мг/кг, в то время как более высокие их уровни подавляли ростовые процессы (Rafique et al., 2018). Однако было установлено, что наночастицы диоксида титана могут оказывать положительное воздействие на прорастание семян и рост высших растений. Например, в присутствии наночастиц в концентрации 10 мг/л время прорастания семян сократилось на 34%, и улучшился их рост (Feizi et al., 2012). Более высокие концентрации наночастиц не оказывали стимулирующего эффекта, что подтверждает результаты ранее упомянутого исследования Лару с коллегами (Larue et al., 2011). В работе Зенга с коллегами (Zheng et al., 2005) высказано предположение, что наночастицы титана в определенных концентрациях могут усиливать поглощение воды и, таким образом, увеличивать скорость прорастания путем фотообразования АФК. Кроме того было установлено положительное влияние наночастиц на процессы фотосинтеза и образования фотосинтетических пигментов. Так, наночастицы способствовали трехкратному повышению скорости фотосинтеза растений томатов и значительно увеличивали (на 45%) биосинтез хлорофилла по сравнению с необработанным контролем (Mingfang et al., 2013). Стимулирующее действие на рост стебля томата *L. esculentum* на 14-й и 21-й дни было продемонстрировано для наночастиц титана в концентрации 40 мг/л (Вардуни и др., 2017).

В некоторых публикациях сообщается о цитотоксических эффектах наночастиц диоксида титана в отношении различных типов клеток. Так, в

исследовании Занга и Сана (Zhang, Sun, 2004) найдено фотокаталитическое уничтожение клеток рака ободочной кишки человека наночастицами при концентрации 200 мг/л. Другими авторами было установлено значительное снижение митохондриальной функции в клетках печени мыши, подвергнутых воздействию наночастиц при концентрации 100-250 мг/л (Hussain et al., 2005). Аналогичный эффект был описан и для клеток микроглии головного мозга при концентрации наночастиц 2,5-120 мг/л, что сопровождалось образованием АФК (Long et al., 2006). Интересно, что наночастицы титана обладают способностью нарушать фагоцитарную функцию альвеолярных макрофагов (Renwick et al., 2001). При этом они не оказывают воздействия на рост и морфологию клеток остеобластов, изолированных из остеосаркомы человека и фибробластов мыши (Ramires et al., 2001), а также клеток эндотелия человека (Peters et al., 2004).

Изучение особенностей поведения наночастиц диоксида титана различных размеров выявили повышенную токсичность для более мелких частиц. Так 50%-ное снижение прироста водоросли *Desmodesmus subspicatus* в присутствии частиц размером 25 нм наблюдалось при 4 мг/л, а в присутствии наночастиц размером 100 нм эффект уменьшился в 13 раз (Hund-Rinke, Simon, 2006). В той же работе на водных рачках *D. magna* было показано, что LD₅₀ в присутствии наночастиц размером 25 нм составляет 1,5 мг/л, а в присутствии размером 100 нм вследствие низкой токсичности показатель определить не удалось. В исследовании влияния только анатазных частиц с размером менее 25 нм на рост водоросли *Chlorella sp* и *Scenedesmus sp*, найденные величины EC₅₀ составили 16,1 мг/л и 21, 2 мг/л соответственно (Sadiq et al., 2011). При этом микронная форма тех же наночастиц проявила вдвое меньшую токсичность.

Увеличение токсического действия наночастиц при уменьшении их размера было подтверждено на клеточной культуре. В линии бронхиальных эпителиальных клеток человека частицы размером 10 и 20 нм вызывали повреждения ДНК, образование ПОЛ, перекиси водорода и оксида азота, в то

время как наночастицы размером 200 нм и более подобных эффектов не вызывали (Gurr et al., 2005).

1.3.3. Наночастицы диоксида кремния

Поскольку кремний – химический элемент, не обладающий заметной токсичностью, то диоксиду кремния отдается меньшее предпочтение в исследованиях токсичности наночастиц (Асанова, Полонский, 2019).

При оценке токсического действия наночастиц диоксида кремния размером 11-14 нм на одноклеточную водоросль *Dunaliella salina* было найдено существенное снижение прироста, показатель EC_{50} составил 0,169 мг/л (Ayatallahzadeh Shirazi et al., 2016). Для морской водоросли *D. tertiolecta* аналогичное 50%-ное снижение прироста было получено при концентрации наночастиц (размер 20 нм), равной 188 мг/л (Manzo et al., 2015). Эксперименты, выполненные другими авторами с наночастицами размером 20-50 нм, не выявили заметного эффекта на прирост водоросли *Chlorella sp.* в диапазоне концентраций до 1000 мг/л (Ji et al., 2011). Результаты влияния наночастиц размером 14 нм на *D. magna* при 72-часовой экспозиции, свидетельствовали о достижении порога 50%-ной смертности организмов при концентрации 29,7 мг/л (Clement, 2013).

В экспериментах на высших растениях установлено, что рассматриваемые наночастицы не влияют на всхожесть, но способны ингибировать рост корней резуховидки Таля *A. thaliana* (Lee, 2010) и не уменьшают длину корней и побегов салата *L. sativa* (Shah, 2009). При использовании наночастиц диоксида кремния, помеченных флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), было найдено, что растения риса *O. sativa* способны поглощать частицы, однако, при концентрации менее 50 мг/л они не оказывают никакого влияния на прорастание семян (Nair., 2011), но способствуют увеличению биомассы побегов и массы зерна (Liu et al., 2009). В то же время фитотесты с тыквой *Cucurbita pepo* продемонстрировали, что наночастицы могут улучшить защитные механизмы растений против солевого стресса (Siddiqui, Al-Whaibi, 2014), а замачивание в суспензии наноструктурной

двуокиси кремния саженцев лиственницы приводит к стимуляции роста и улучшению их качества (Lin et al., 2004). Наночастицы способны повышать всхожесть семян кукурузы *Z. mays* (Suriyaprabha et al., 2012), а также сокращать время прорастания семян, увеличивать их энергию прорастания и массу проростков томата *L. Esculentum* (Siddiqui, Al-Whaibi, 2014).

На клетках бронхоальвеолярной карциномы человека было показано снижение их жизнеспособности в течение 24-72 часов при концентрации 10 - 100 мг/л, что происходило в результате высвобождения малондиальдегида и лактатдегидрогеназы, образования ПОЛ и повреждения мембраны (Lin et al., 2006). Интересно, что наночастицы оказывают слабое воздействие на воспалительный процесс и пролиферацию клеток эндотелия человека (Peters, 2004).

Исследования зависимости токсичности наночастиц от размера дали противоречивые результаты. Так, на бактериях *B. subtilis* и *E. coli* было показано, что размер наночастиц не влияет на антибактериальную активность (Adams et al., 2006). Отсутствие зависимости эффекта от размера наночастиц (15 и 46 нм) было подтверждено и на клетках бронхоальвеолярной карциномы человека (Lin et al., 2006).

Однако эксперименты с разноразмерными наночастицами (30, 48, 118 и 535 нм) показали, что жизнеспособность кератиноцитов мыши снижается с уменьшением размера частиц при дозах 10-200 мг/л (Yu et al., 2009). Так, и на культуре *P. tricornutum* меньшая токсичность отмечена для более крупных наночастиц диоксида кремния, значения EC_{50} для наночастиц размерами 14 нм, 22 нм и 300 нм составили 48,6 мг/л, 160 мг/л и 225 мг/л, соответственно (Clement, 2013). В том же исследовании был найден аналогичный эффект для рачков *D. magna* в 72 часовой экспозиции. В исследовании на *P. subcapitata*, также было показано увеличение токсического эффекта наночастиц при уменьшении размера, в то время как микроразмерные частицы оказались нетоксичными при концентрации до 1000 мг/л (Van Hoeske et al., 2008). Аналогичное действие

наночастиц диоксида кремния (5, 26, 78 нм) продемонстрировано на культуре *Chlorella kessler* – большей токсичностью обладали частицы меньшего размера (Fujiwara, 2008).

Эти данные не согласуются результатами исследования, в котором продемонстрировано, что токсический эффект на водоросль *C. vulgaris* крупных частиц диоксида кремния размером 300 нм наступал при концентрации 472 мг/л, в то время как частицы размерами 14 и 22 нм эффекта не оказали (Clement, 2013). В исследовании на гепатоцитах человека, было найдено изменение токсичности наночастиц в следующем порядке: 20 нм > 7 нм > 50 нм, в диапазоне концентраций 20-640 мг/л (Lu et al., 2011).

Таким образом, полученные результаты на различных тест-объектах весьма неоднозначны. Это вызвано не только отсутствием единых стандартов для проведения исследования биотестирования наночастиц, выбором разных тест-функций и условий проведения экспериментов, но и характеристикой самих наночастиц. Установлено, что техногенные наночастицы могут оказывать как положительное, так и отрицательное или нейтральное влияние на различные тест-объекты. Обзор современной научной литературы показывает, что зависимости реакций организмов в ответ на действие наночастиц от уровня их биологической организации исследованы недостаточно; в источниках приводятся противоречивые результаты влияния наночастиц различного размера на ростовые показатели тест-организмов; практически не изучены ответные реакции модельных ферментных систем в присутствии наночастиц. Все эти вопросы требуют дальнейшего изучения.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

В данной работе были проведены исследования на восьми тестовых объектах, занимающих разные экологические ниши и представляющих различные уровни биологической организации: овес посевной *Avena sativa* L, вешенка обыкновенная *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm, тропический люминесцирующий гриб *Neonothopanus nambi* (Speg.) R.H. Petersen & Krisai, водные рачки *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg, одноклеточная водоросль *Chlorella vulgaris* Beijer, микромицет, вызывающий корневую гниль у зерновых культур, *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker, ферментативные биолюминесцентные системы с NADH:FMN-оксидоредуктазой и люциферазой, а также трипсином (Таблица 2.1.1.).

Таблица 2.1.1. – Классификация объектов исследования.

Уровни биологической организации	Основная среда обитания	Царство	Биологический вид
Многоклеточный	Агрэкосистемы	Высшие растения	Овес посевной <i>Avena sativa</i>
	Лесные экосистемы	Высшие грибы	Вешенка обыкновенная <i>Pleurotus ostreatus</i>
	Тропические леса		Люминесцентный гриб <i>Neonothopanus nambi</i>
	Водные экосистемы	Животные	Рачки <i>Ceriodaphnia affinis</i>

Таблица 2.1.1. Продолжение.

Одноклеточный	Водные экосистемы	Низшие растения	Зеленая водоросль <i>Chlorella vulgaris</i>
	Агроэкосистемы	Низшие грибы*	Конидии корневой гнили зерновых <i>Bipolaris sorokiniana</i>
Молекулярный	Искусственная среда	Ферментные системы	Биферментная система NADH:FMN- оксидоредуктаза и люцифераза
			Трехферментная система с трипсином

*В экспериментах использовали только конидии гриба, которые условно считались одноклеточными организмами

Эффективность воздействия наночастиц на исследуемые тест-объекты оценивали по показателю EC_{50} и EC_{20} – величины концентрации наночастиц, при которых исследуемые параметры снижались на 50% и 20% по отношению к контролю соответственно.

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.

2.2. Материалы

В качестве материалов исследования были выбраны наночастицы, наиболее часто используемые при производстве потребительских товаров.

1) Препарат наночастиц серебра производства «Наносеребро «Аргитос» (ООО НПП «Синтек Нано», Россия), который был представлен взвесью в 0,05 %

водном растворе поливинилпирролидона. Концентрация наночастиц в препарате составляла 250 ppm; наночастицы имеют шаровидную форму размерами 15–25 нм.

2) Наночастицы диоксида титана (TiO_2) производства «Plasmotherm» (Россия), представленные порошкообразной смесью двух форм анатаза и рутила шаровидной формы размером 100–190 нм.

3) Наночастицы диоксида кремния (SiO_2) производства «Plasmotherm» (Россия), которые были представлены двумя видами наночастиц, различающимися по размеру 10-15 нм и 100–190 нм. Оба препарата имеют порошкообразный вид и шаровидную форму частиц.

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.

2.3. Методы культивирования различных тест-организмов и измерения ростовых показателей в условиях действия наночастиц

2.3.1. Высшие растения (овес посевной *Avena sativa*)

Фитотоксичность наночастиц определялась на семенах и проростках высшего растения *A. sativa*, согласно методической рекомендации (МР 2.1.7.2297-07). В эксперимент отбирались неповрежденные семена овса. Проращивание семян, исходная всхожесть которых составляла не менее 80%, осуществлялось в чашках Петри. Для проведения эксперимента в каждой чашке раскладывали по 25 сухих семян. Далее в чашку вносили суспензию исследуемых наночастиц или водопроводную воду в качестве контроля в объеме 5 мл (Рисунок 2.3.1.1.).

Закрытые чашки термостатировались при температуре 20-23 °С в течение 3 суток. После подсчета числа проросших семян все образцы возвращались в термостат так, чтобы общее время инкубации составило 7 суток. Каждый из вариантов эксперимента одновременно проводился в 3-х параллелях

(повторностях). По истечении срока проращивания измеряли массу корней, массу проростков и длину максимально развитого корешка в контрольных и опытных образцах (Рисунок 2.3.1.2.).



Рисунок 2.3.1.1. Семена овса, расположенные на фильтровальной бумаге в чашке Петри с внесенной водопроводной водой или суспензией наночастиц.

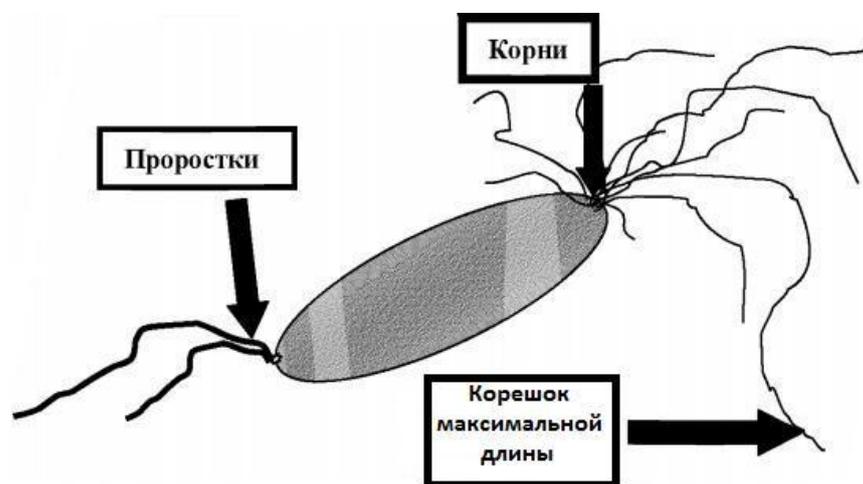


Рисунок 2.3.1.2. Схематическое изображение прорастающего семени овса (МР 2.1.7.2297-07).

Изменение исследуемых ростовых показателей, а именно энергии прорастания семян овса, массы корней и проростков, длины корешка, в опытных вариантах по отношению к контролю рассчитывали по формуле:

$$I = 100\% \cdot (\overline{X_K} - \overline{X_0}) / \overline{X_K} \quad (1)$$

где $\overline{X_K}$ и $\overline{X_0}$ средние значения исследуемых показателей в контроле и опыте соответственно.

Каждая серия экспериментов выполнялась три раза.

2.3.2. Высшие ксилотрофные грибы *Pleurotus ostreatus* и *Neonothopanus nambi*

В работе изучали ростовые реакции ксилотрофных грибов в ответ на воздействие наночастиц. Для определения роста мицелия грибы культивировали на чашках Петри на агаризованной синтетической среде следующего состава (г): $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 1, NaCl - 0,1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5, CaCO_3 - 0,1, аспарагин моногидрат - 1, цитрат калия (3-х замещенный) - 1, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,01, кофейная кислота - 0,05, сахароза - 20, агар - 20; дистиллированная вода до 1 л.

Среду стерилизовали 20 минут при 110 °С, разливали по чашкам Петри слоем 4-5 мм, вносили грибной инокулят и инкубировали при 27 °С в течение 5-7 суток (Рисунок 2.3.2.1.).

После колонизации грибом центра чашки, на свободную от мицелия поверхность среды с помощью пипетки, каплями ($\approx 0,25$ мл) наносили концентрированную суспензию наночастиц. Чашки инкубировали еще 5-7 суток до полного зарастания поверхности среды мицелием. О проявлении фунгистатической активности судили по наличию или отсутствию в местах нанесения капель зон свободных от мицелия.

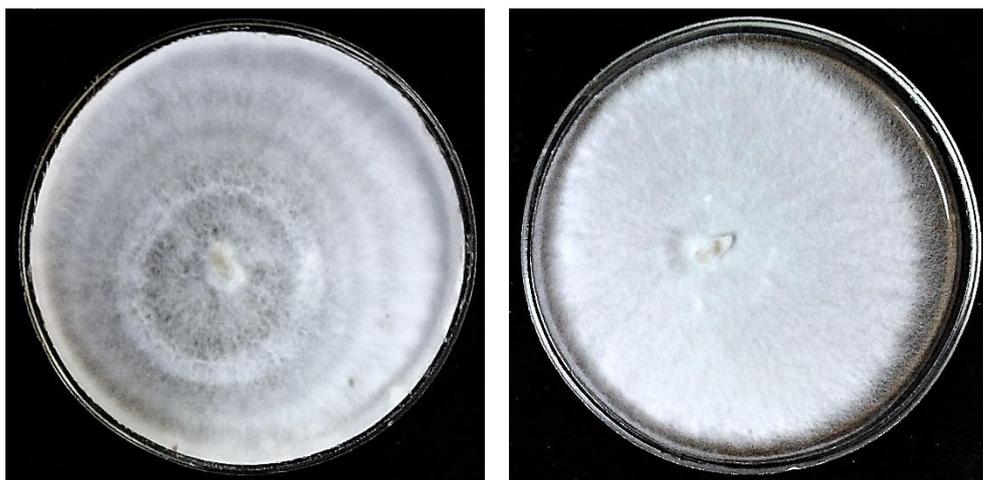
*P. ostreatus**N. nambi*

Рисунок 2.3.2.1. Рост мицелия грибов *P. ostreatus* и *N. nambi* на синтетической агаризованной среде.

Зависимость линейной скорости роста мицелия грибов от содержания наночастиц в субстрате определяли с помощью стеклянных трубок (Рисунок 2.3.2.2.).

Для приготовления субстрата использовали измельченную пшеничную солому, которую увлажняли раствором среды, содержащей стимулирующие рост грибов добавки (г/л): K_2HPO_4 – 1; аспарагин моногидрат – 1; сусло экстракт – 1; MnSO_4 – 0,001 (Дементьев и др., 2015). В готовый субстрат добавлялись различные концентрации наночастиц или дистиллированную воду в качестве контроля. Субстрат порциями по 30 г помещали в стеклянные трубки длиной 100 мм и внутренним диаметром 12 мм. С одного конца субстрат фиксировали ватным тампоном и дополнительно кусочком силиконового шланга, верхнюю часть трубки оставляли открытой. Трубки с субстратом помещали в пробирки с ватными пробками и стерилизовали 30 минут при 110 °С. Стерильный субстрат инокулировали кусочками мицелия грибов и инкубировали в термостате при 27 °С. Каждый из вариантов эксперимента одновременно проводился в 5-ти параллелях (повторностях). Замеры линейной скорости роста мицелия по субстрату производили с интервалом в 3 суток после начала роста.



Рисунок 2.3.2.2. Размещение стеклянной трубки с субстратом в пробирке.

Изменение исследуемых показателей в опытных образцах по отношению к контролю рассчитывали по формуле:

$$I = 100\% \cdot (\overline{X}_K - \overline{X}_0) / \overline{X}_K \quad (2)$$

где \overline{X}_K и \overline{X}_0 средние значения линейной скорости роста мицелия в контроле и в опыте, соответственно.

Каждая серия экспериментов выполнялась три раза.

2.3.3. Представители ракообразных (*Ceriodaphnia affinis*)

Эксперименты по оценке реакции водных рачков *C. affinis* в ответ на действие различных наночастиц проводились согласно методикам (РД.118-02-90; ФР.1.39.2007.03221.), основанной на определении смертности тест-организмов при воздействии токсических веществ, содержащихся в тестируемой воде по сравнению с контролем. Контролем служила отстояная и проаэрированная водопроводная вода.

Для получения синхронизированной культуры рачков отбирали одну самку средних размеров с выводковой камерой, заполненной эмбрионами, и помещали в стеклянный стакан объемом 50 мл, заполненный на 15 мл культивационной водой (Рисунок 2.3.3.1.).



Рисунок 2.3.3.1. Культура ракообразных *C. Affinis* для отбора самок с выводковой камерой.

Отродившуюся молодь переносили по одной в 10-60 таких же стаканов, заполненных на 15 мл культивационной водой. Третье поколение рачков рассматривали как синхронизированную культуру.

В экспериментах использовали по 10 сосудов объемом 30 мл для контрольной тестируемой воды и различных концентраций суспензий наночастиц (Рисунок 2.3.3.2.). В каждый сосуд наливали по 15 мл контрольной воды или тестируемой суспензии и помещали по одной особи односуточной цериодафнии.



Рисунок 2.3.3.2. Стаканы с суспензиями наночастиц и одной особью односуточной цериодафнии.

Цериодафний кормили дрожжевой суспензией перед началом эксперимента и в последующие сутки. Учет выживших цериодафний проводили через 24 и 48 часов от начала эксперимента. Неподвижных особей считали погибшими, если они не начинали двигаться в течение 15 секунд после легкого покачивания стакана. Величина смертности в контрольном варианте не превышала 10%.

О токсичности наночастиц судили по доле выживших особей в тестируемой воде по сравнению с контролем:

$$I = 100\% \cdot (\overline{X}_K - \overline{X}_0) / \overline{X}_K \quad (3)$$

где \overline{X}_K и \overline{X}_0 - средние значения количества цериодафний, выживших в контрольных и опытных емкостях.

Серия экспериментов выполнялась три раза.

2.3.4. Культура микроводоросли *Chlorella vulgaris* Beijer

Эксперименты по определению ростовой реакции пресноводной микроводоросли *C. vulgaris* Beijer в ответ на действие различных наночастиц проводились на культуре микроводоросли, находящейся в экспоненциальной стадии роста. Хлорелла культивировалась на 50%-ной среде Тамия в культиваторе КВ-05 при температуре 36 °С и непрерывном облучении белым светом от светодиодных источников интенсивностью 60 Вт/м². Поступление углекислого газа из воздушной среды (0,03%) обеспечивалось постоянным активным перемешиванием растущей культуры водоросли.

Оценка ростовой реакции микроводоросли в ответ на действие различных 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). Методика основана на регистрации различий в величине оптической плотности тест-культуры водоросли хлорелла, выращенной на среде, не содержащей токсических веществ (контроль) и в

тестируемых пробах. Измерение оптической плотности суспензии водоросли позволяет оперативно контролировать изменение численности клеток в контрольном и опытном вариантах токсикологического эксперимента, проводимого в специализированном многокюветном культиваторе КВМ-05 (Рисунок 2.3.4.1.).



Рисунок 2.3.4.1. Многокюветный культиватор КВМ-05.

В этом приборе в одинаковых условиях по интенсивности света (40 Вт/м^2), температуре ($36 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) и обеспечению CO_2 (0,03%) одновременно выращивали 24 пробы с тест-культурами водоросли хлорелла в прозрачных флаконах с 5,5 мл 2%-ной среды Тамия. Прирост тест-культур оценивали по изменению оптической плотности суспензии водоросли в тех же флаконах с помощью прибора ИПС-03 (Рисунок 2.3.4.2.).

Начальная оптическая плотность засеваемых тест-культур водоросли во флаконе диаметром 2 см при длине волны 560 нм составляла 0,005. Каждый из 6-ти вариантов экспериментов, одновременно проводимых в культиваторе КВМ-05, выполнялся в 4-х аналитических повторностях (параллелях). Снижение оптической плотности в опытных образцах по отношению к контролю в процентном отношении рассчитывали по формуле:

$$I_{\text{оп}} = 100\% \cdot (\overline{D_K} - \overline{D_0}) / \overline{D_K} \quad (4)$$

где \overline{D}_K и \overline{D}_0 средние значения оптической плотности в контроле и в опыте, соответственно.



Рисунок 2.3.4.2. Приборы для культивирования микроводоросли КВ-05 и измерения оптической плотности культуры ИПС-03.

Кроме ростовой реакции микроводоросли в ответ на действие наночастиц 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 (Рисунок 2.3.4.3.). Величина данного показателя, представляющего собой отношение интенсивностей миллисекундной замедленной флуоресценции при возбуждении светом высокой и низкой интенсивностей, многократно снижается при подавлении фотосинтетической активности растительных клеток (Григорьев и др., 2013).

Для оценки токсичности наночастиц по показателю ОПЗФ в кюветы опытных вариантов вносили по 5 мл препарата частиц различной концентрации, в контрольном варианте использовали дистиллированную воду. Тест-культуру водоросли с оптической плотностью 0,5 добавляли в кюветы в объеме 0,25 мл. В результате концентрация клеток в кюветах составляла около 300 тыс. клеток/мл.

Каждый из 6-ти вариантов экспериментов, одновременно проводимых в приборе Фотон-10, выполнялся в 4-х аналитических повторностях (параллелях).

а



б



Рисунок 2.3.4.3. Прибор для измерения ОПЗФ водоросли *Chlorella vulgaris* флуориметр Фотон 10 (а), и набор кювет для работы (б).

Перед измерением величины ОПЗФ пробы в течение 1 часа подвергались засветке в культиваторе КВМ-05 при температуре 36 ± 1 °С. Отдельные эксперименты проводили без 1-часовой световой экспозиции. Снижение величины ОПЗФ в опытных образцах по отношению к контролю рассчитывали по формуле:

$$I_{3\Phi} = 100\% \cdot (\overline{X}_K - \overline{X}_0) / \overline{X}_K \quad (5)$$

где \overline{X}_K и \overline{X}_0 средние значения ОПЗФ в контроле и опыте, соответственно.

Каждая серия экспериментов выполнялась пять или более раз.

2.3.5. Микромикеты (*Bipolaris sorokiniana*)

В работе выполняли эксперименты по определению реакции конидий микромицетов *B. sorokiniana* в ответ на действие различных наночастиц (Hodges, 1975; Pratt, 2006; Nechet et al., 2006). Для образования конидий гриб

культивировали на агаризованной среде Чапека в течение 7-10 суток при температуре 27 °С (Рисунок 2.3.5.1.).



Рисунок 2.3.5.1. Культивирование микромицетов *B. sorokiniana* в чашке Петри.

Для оценки влияния наночастиц на процесс прорастания конидий на предметное стекло наносили 20 мкл исследуемой суспензии наночастиц или стерильной воды в качестве контроля. В исследуемую каплю добавляли конидии, собранные микробиологической петлей с поверхности колонии гриба. После этого предметное стекло помещали во влажную камеру на 5-6 часов. Каждый из вариантов эксперимента одновременно проводился в 3-х параллелях (повторностях).

После этого выполняли микроскопирование с помощью микроскопа «ЛОМО», Россия. Для проведения такой процедуры выбирали не менее 100 конидий в каждом варианте эксперимента и подсчитывали долю проросших конидий.

Снижение доли проросших конидий в опытных образцах по отношению к контролю рассчитывали по формуле:

$$I = 100\% \cdot (\bar{X}_K - \bar{X}_0) / \bar{X}_K \quad (6)$$

где \overline{X}_K и \overline{X}_0 средние значения доли проросших конидий в контроле и опыте, соответственно.

Каждая серия экспериментов выполнялась три и более раз.

2.4. Оценка влияния наночастиц на ферментные системы

2.4.1. Биolumинесцентная система с NADH:FMN-оксидоредуктазой и люциферазой

В работе использовали лиофилизированный препарат высокоочищенных ферментов (КРАБ), содержащий люциферазу EC 1.14.14.3 из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* и NADH:FMN-оксидоредуктазу EC 1.5.1.29 из *Vibrio fischeri*, произведенный в лаборатории нанобиотехнологии и биolumинесценции Института биофизики СО РАН (Красноярск). Один флакон КРАБ содержал 0,5 мг люциферазы и 0,15 единиц активности NADH:FMN-оксидоредуктазы. Флакон КРАБа выдерживали на льду в течение всего времени проведения экспериментов. В работе использовали следующие реактивы: FMN («Serva», Германия); NADH («Gerbu», Германия); тетрадеканаль («Merck», Германия). Для приготовления растворов использовали 0,05 М калий-фосфатный буфер pH 6,9. Раствор 0,0025 % миристинового альдегида готовили добавлением к 50 мкл 0,25%-ного спиртового раствора альдегида 5 мл 0,05 М буфера (Kratasyuk et al., 2001; Vetrova et al., 2007).

Интенсивность свечения биферментной сопряженной системы NADH:FMN – оксидоредуктаза–люцифераза измеряли в реакционной смеси следующего состава:

300 мкл 0,05 М калий фосфатного буфера pH 6,9,

2-4 мкл раствора КРАБа,

50 мкл 0,0025% раствора тетрадеканалья,

50 мкл 0,4 мМ раствора NADH,

10 мкл 0,5 мМ М раствора FMN.

В кювету билюминометра Lumat LB 9507 (Berthold Technologies, Германия) вносили последовательно все компоненты реакционной смеси, быстро перемешивали, помещали кювету в билюминометр и регистрировали величину максимальной интенсивности свечения (Рисунок 2.4.1.1.).

Для исследования действия наночастиц на биферментную систему, сначала регистрировали контрольное свечение биферментной системы в реакционной смеси представленной выше, при добавлении в качестве контрольного раствора 50 мкл дистиллированной воды (I_k). Далее измеряли интенсивность свечения в присутствии исследуемых наночастиц (I_o), для этого вместо контрольного образца в кювету вносили 50 мкл изучаемого вещества заданной концентрации.



Рисунок 2.4.1.1. Билюминометр и компоненты смеси для проведения анализа.

Ответную реакцию ферментной системы (биотеста) определяли по величине остаточного свечения $(I_o/I_k) \cdot 100\%$. Каждый из вариантов эксперимента проводился в 5-х и более параллелях (повторностях). Каждая серия экспериментов выполнялась три раза.

2.4.2. Биolumинесцентная система с трипсином

В работе использовали трипсин поджелудочной железы свиней (Sigma, США). Реакционная смесь содержала все вышеперечисленные для биферментной системы препараты и 10 мкл раствора трипсина, который получали разведением 4 мг фермента в 4 мл буфера 0,05 М рН 6,9 (Петушков и др., 1983; Есимбекова и др., 2017).

Измеряемым параметром этой системы является константа спада, вычисляемая по формуле:

$$k_{\text{сп}} = \ln \frac{I_1/I_2}{\Delta t} \quad (7)$$

где I_1 – максимум интенсивности свечения системы, I_2 – интенсивность свечения системы через заданное время после достижения максимума, Δt – время (в минутах), за которое I_1 достигает I_2 .

Для определения активности эндопротеазы в реакционной смеси перечисленного выше состава сначала вычисляли константу спада биферментной реакции $k_{\text{сп фон}}$ (без добавления трипсина). Затем в другую кювету, содержащую все указанные выше компоненты, добавляли 10 мкл раствора трипсина и 50 мкл дистиллированной воды. Далее рассчитывали константу спада свечения в присутствии контрольного образца ($k_{\text{сп контр}}$). Для определения константы спада свечения в присутствии анализируемого образца ($k_{\text{сп оп}}$) в кювету вместо 50 мкл контрольного образца вносили такое же количество суспензии исследуемых наночастиц. Каждый из вариантов эксперимента проводился в 5-ти и более параллелях (повторностях).

Реакцию биотеста определяли по изменению относительной активности эндопротеазы (А), рассчитываемой по формуле:

$$A = \frac{k_{\text{оп}} - k_{\text{сп фон}}}{k_{\text{сп контр}}} \cdot 100\% \quad (8)$$

где $k_{\text{сп фон}}$ – константа спада биферментной системы без добавления трипсина,

$k_{\text{сп контр}}$ – константа спада трехферментной системы с трипсином, $k_{\text{сп оп}}$ – константа спада трехферментной системы с трипсином в присутствии наночастиц.

Каждая серия экспериментов выполнялась три раза.

ГЛАВА 3. РЕАКЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ РАЗЛИЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ НА ПРИСУТСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ В СРЕДЕ

3.1. Многоклеточные организмы

3.1.1. Изменение ростовых показателей семян и проростков овса посевного *Avena sativa* под воздействием наночастиц

Проблема воздействия наночастиц на фотосинтезирующие организмы стоит наиболее 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.

Растительным объектам по праву отдается предпочтение при выполнении биотестирования различных химических веществ. Данные тест-объекты отличаются огромным видовым и морфологическим разнообразием, проявляя высокую чувствительность к широкому классу токсических соединений, в том числе наночастиц.

В настоящем исследовании нами были изучены реакции овса посевного *A. sativa* в ответ на действие наночастиц при использовании семян и проростков (Асанова, Полонский, 2017а; Асанова и др., 2017). Эксперименты выполняли в чашках Петри (Рисунок 3.1.1.1.).

Результаты зафиксировали четкую негативную реакцию растений в ответ на воздействие наночастиц серебра. Так, при подсчете проросших семян овса в присутствии наночастиц серебра на 3 сутки выяснилось, что концентрация, при которой наблюдается 50%-ное снижение энергии прорастания, составляет 20 мг/л. Изучение морфометрических показателей проростков показало, что аналогичное снижение длины корешков, массы корней и проростков достигается при меньших концентрациях, величины EC_{50} составили 13, 7 и 7 мг/л соответственно (Рисунок 3.1.1.2.).



Рисунок 3.1.1.1. Проростки овса посевного *A. sativa* в чашках Петри на 7 сутки от замачивания семян.

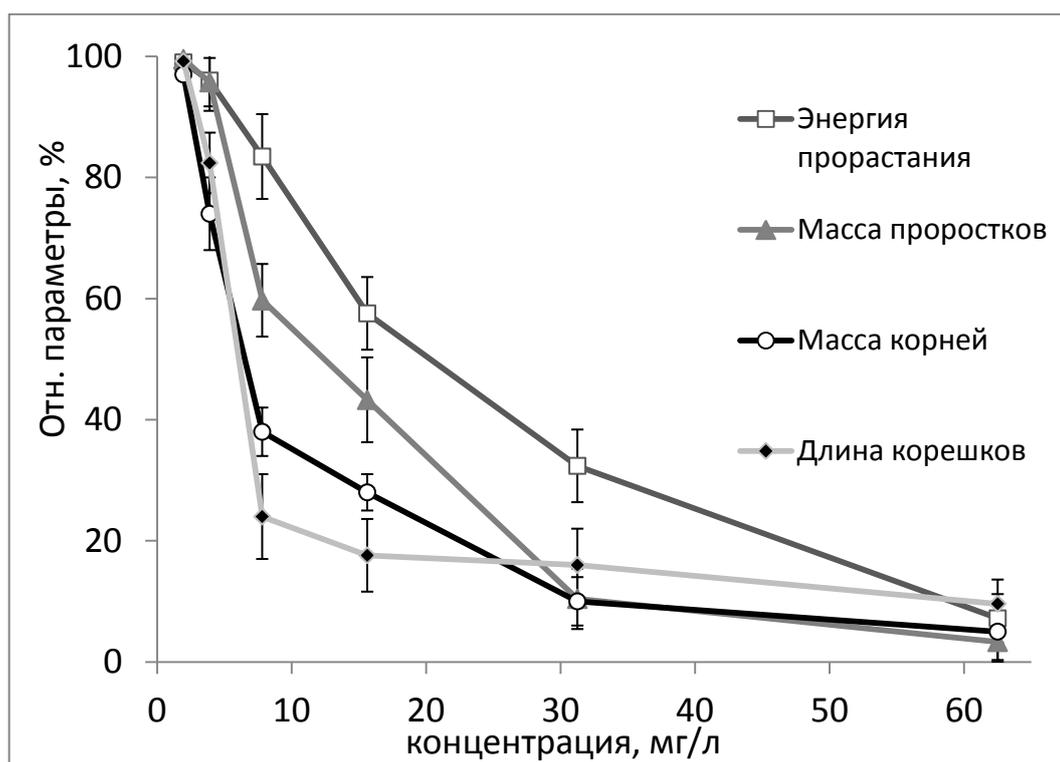


Рисунок 3.1.1.2. Зависимость энергии прорастания семян овса на 3 сутки, а также массы побегов и корней, длины корешков проростков на 7 сутки от концентрации наноразмерного серебра (по отношению к контролю).

При исследовании влияния наночастиц диоксида титана в настоящей работе нами использована наиболее часто используемая в коммерческих

продуктах порошкообразная смесь наноразмерных частиц анатаза и рутила сферической формы, размером 100-190 нм.

В результате было найдено, что присутствие данных наночастиц оказывает слабое воздействие на массу коней и массу побегов, значения EC_{50} в эксперименте определить не удалось, однако 20% снижение этих показателей (значения EC_{20}) достигались при концентрации 11 и 12 мг/л соответственно (Рисунок 3.1.1.3.).

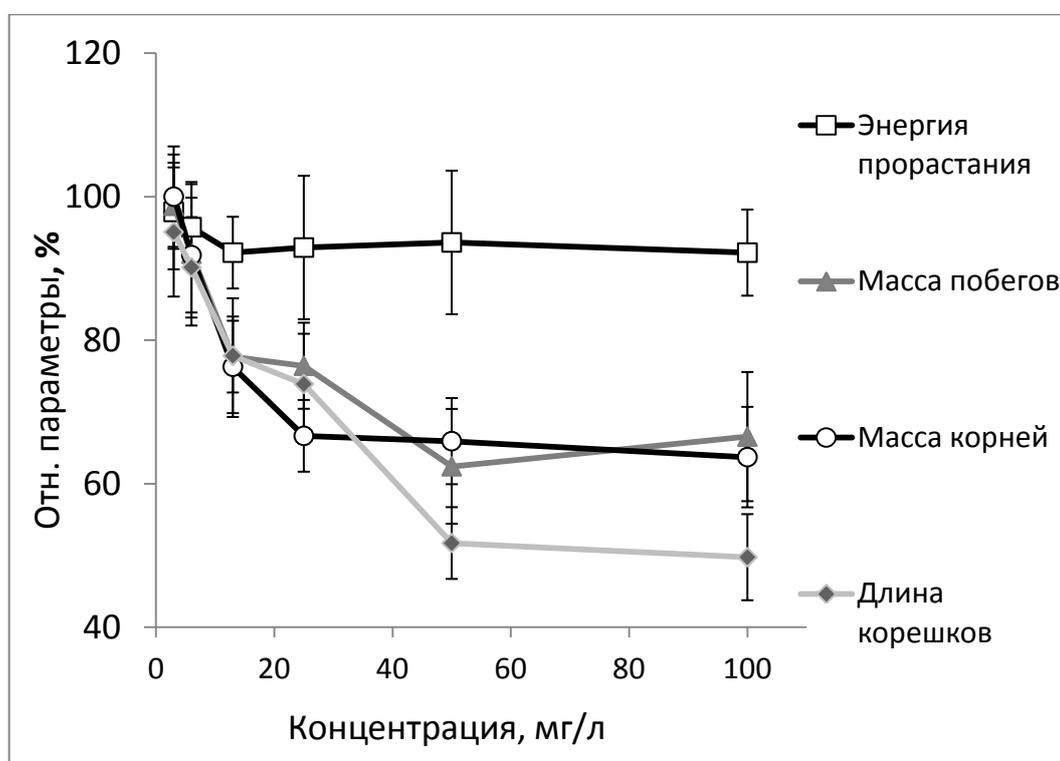


Рисунок 3.1.1.3. Зависимость энергии прорастания семян овса посевного на 3 сутки, а также массы побегов и корней, длины корешков проростков на 7 сутки от концентрации наноразмерного диоксида титана (по отношению к контролю).

Наиболее чувствительным параметром оказалась длина корешка, 50%-ное уменьшение которой зарегистрировано при относительно высокой концентрации наночастиц, равной 90 мг/л. Уменьшение энергия прорастания семян овса в диапазоне концентраций наночастиц диоксида титана до 100 мг/л не было статистически значимым относительно контрольных образцов (Рисунок 3.1.1.3.).

Изучение влияния наночастиц диоксида кремния размером 100-120 нм на семена и проростки овса позволило выявить, что самым чувствительным параметром является масса корней. Уменьшение этого показателя на 20% отмечено при концентрации наночастиц 20 мг/л, однако показатель EC_{50} в эксперименте определить не удалось (Рисунок 3.1.1.4.).

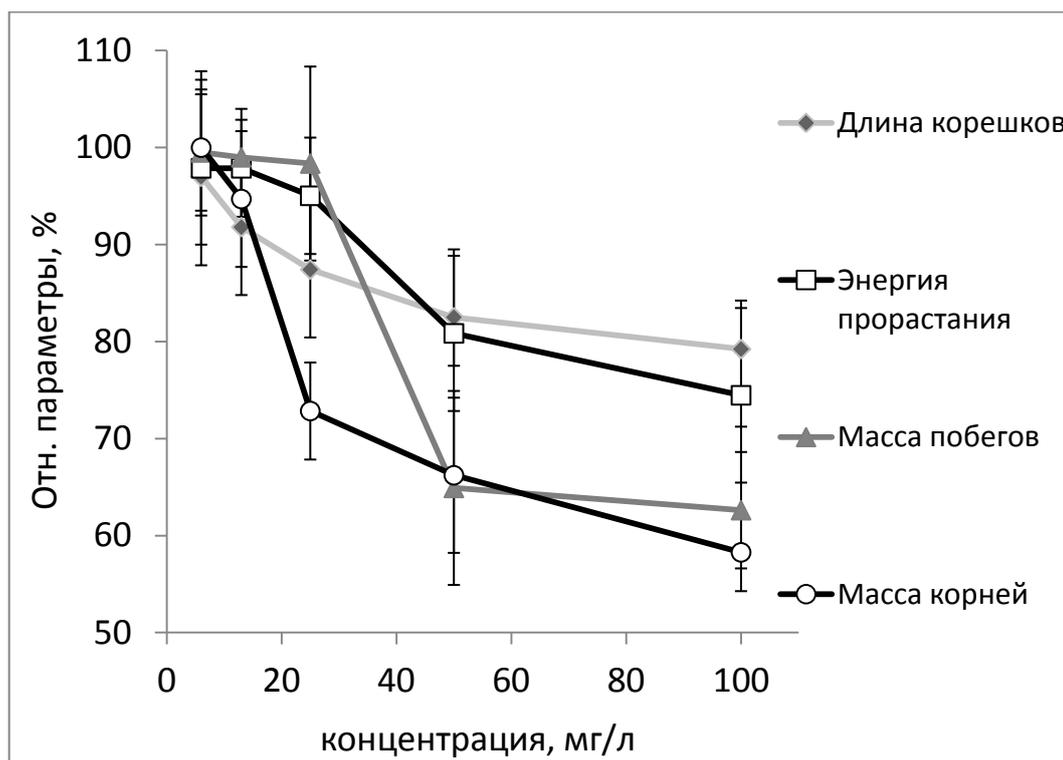


Рисунок 3.1.1.4. Зависимость энергии прорастания семян овса посевного на 3 сутки, а также массы побегов и корней, длины корешков проростков на 7 сутки от концентрации наночастиц диоксида кремния размером 100-120 нм (по отношению к контролю).

Снижение параметров массы побегов, энергии прорастания и длины корешка на 20% установлено при концентрации крупных наночастиц свыше 39, 57 и 92 мг/л соответственно, при этом показатель EC_{50} определить не удалось в диапазоне концентраций до 100 мг/л.

Наночастицы диоксида кремния размером 10-15 нм оказали слабое влияние на семена и проростки овса. Наиболее чувствительным параметром также

выступала масса корней, значение EC_{20} зафиксировано при концентрации наночастиц 14 мг/л (Рисунок 3.1.1.5.). Реакция других ростовых показателей овса в ответ на введение в среду частиц размером 10-15 нм оказалась менее выраженной, чем на присутствие в ней частиц размером 100-120 нм. Энергия прорастания семян уменьшалась относительно контрольного образца незначительно, длина корешка и масса побегов не изменялись в ответ на введение наночастиц диоксида кремния размером 10-15 нм в диапазоне концентраций до 100 мг/л.

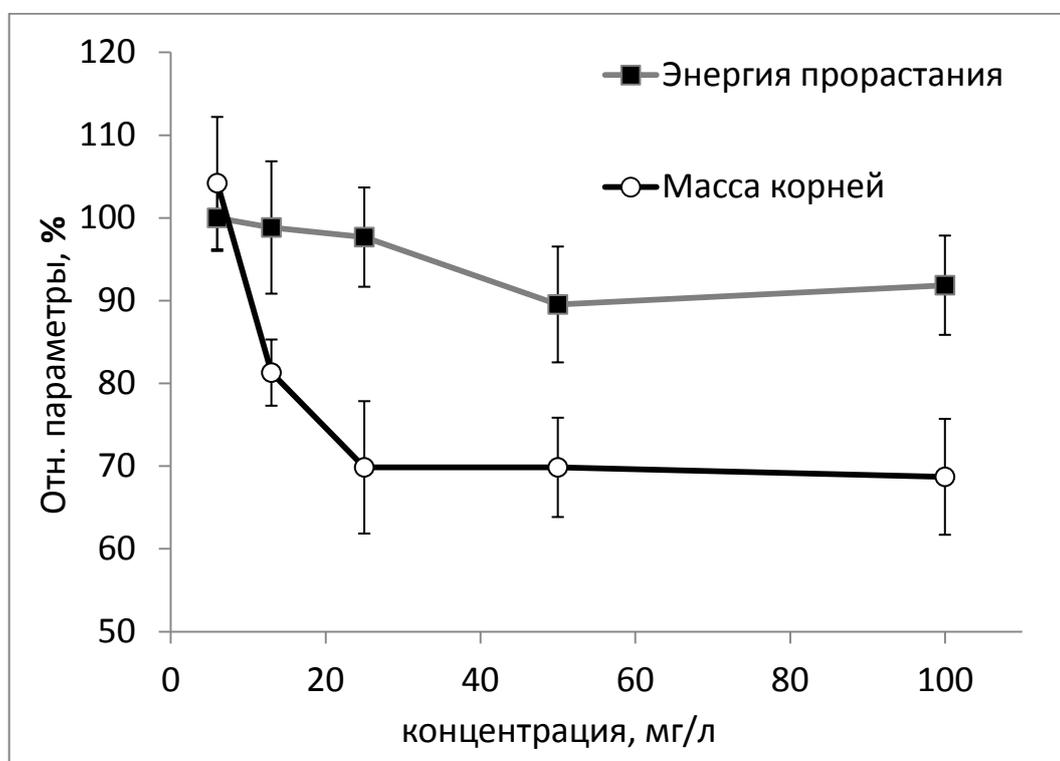


Рисунок 3.1.1.5. Зависимость энергии прорастания семян овса посевного на 3 сутки, а также массы корней проростков на 7 сутки от концентрации наночастиц диоксида кремния размером 10-15 нм (по отношению к контролю).

Согласно литературным данным, наночастицы способны аккумулироваться в теле растений, что было обнаружено и подтверждено с использованием различных методов (Zhu et al., 2008; Kurepa et al., 2010; Ma et al., 2011). При этом было найдено, что вход и транслокацию наночастиц могут осуществлять как корни, так и листья растений (Ma et al., 2015).

Так как диаметр пор клеточной стенки, специфичной для растений, находится в диапазоне от 5 до 20 нм (Раздорский, 1955; Talreja, Kumar, 2018), то исследуемые в настоящей работе наночастицы серебра и мелкие частицы диоксида кремния (размером 15-20 нм) могли диффундировать сквозь нее. Как известно, преодоление клеточной мембраны возможно путем эндоцитоза (Wang et al., 2011b) и посредством образования комплексов с транспортными белками (Yadav et al., 2014). Наночастицы серебра могли взаимодействовать с мембранными белками и, активируя сигнальные пути, приводить к ингибированию пролиферации клеток, как было показано в исследовании других авторов (Gopinath et al., 2010).

В то время частицы крупного размера могли проникнуть внутрь посредством гидатод, стигм и устьиц (Hossain, 2015) или, нарушив целостность клеточной стенки и мембраны. Так, в нашем эксперименте с частицами диоксида кремния размером 100-120 нм было продемонстрировано большее угнетение ростовых процессов овса посевного по сравнению с таковым в присутствии частиц размером 10-15 нм. Кроме того для крупных частиц диоксида титана также был показан токсический эффект на этом объекте. Механическое повреждение клеточной стенки и мембраны могло являться следствием, изменения клеточной проницаемости (Wild, Jones, 2009). Как известно, повреждение и проницаемость мембран имеют решающее значение для клеточного функционирования и дальнейшего проникновения наночастиц (Silva et al., 2016).

Внутри цитоплазмы с помощью водородных взаимодействий и стерических эффектов наночастицы, вероятно, образовывали так называемую корону белка – комплекс наночастиц и белков. Такие комплексы, размером 20-50 нм могут перемещаться в другие клетки через плазмодесмы (Deng et al., 2014, Lin et al., 2009). Наночастицы диоксида титана в свою очередь могли разрушать микрофиламенты цитоскелета, нарушая работу плазмодесм, как было показано в исследовании других авторов (Wang et al., 2011a). Также наночастицы могли взаимодействовать с органеллами и нарушать обменные процессы,

способствовать появлению окислительного стресса и генетических модификаций (Castiglione et al., 2011; Pakrashi et al., 2014; Silva et al., 2016; Rafique et al., 2017). Наночастицы диоксида титана могли вызывать задержку или останавливать клеточный цикл в контрольной точке G0/G1, что в конечном итоге, вероятно, приводило к снижению скорости митоза, как было продемонстрировано в ряде работ (Barrena et al., 2009; Castiglione et al., 2011; Silva et al., 2016).

Известно, что наночастицы серебра обладают высоким сродством к кислороду, что приводит к образованию окисленных поверхностей частиц с хемосорбированным ионом серебра (Henglein, 1998; Wang et al., 2016в). Так, в коллоидной системе серебра возможно образование трех различных форм: собственно наночастицы серебра, наночастицы серебра с адсорбированными ионами на поверхности и свободные ионы серебра (Liu, Hurt, 2010). В литературе высказано предположение о том, что токсические свойства наночастиц серебра обусловлены присутствием свободных ионов (Kittler et al., 2010; Beer et al., 2012; Sakamoto et al., 2015). В нашей работе (Асанова, Полонский, 2017б) при сравнении наночастиц серебра и их ионов был показан более выраженный токсический эффект для наночастиц, что скорее всего свидетельствует о том, что механизм токсичности обусловлен всеми формами. Поэтому, находясь в водной суспензии или внутри клетки, серебряные наночастицы могли вызывать вторичные токсические эффекты.

Описанные в данном разделе ростовые реакции семян и проростков овса посевного в ответ на применение в наших экспериментах наночастиц были максимальными в случае использования наносеребра. Вероятно, большинство из перечисленных выше возможных механизмов негативного влияния последнего обеспечивали его токсические свойства относительно исследуемого тест-объекта.

3.1.2. Изменение ростовых показателей высших грибов *Pleurotus ostreatus* и *Neonothopanus nambi*, происходящее под влиянием наночастиц

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.

В доступной нам литературе не было найдено экспериментальных данных о реакции высших грибов в ответ на введение в питательную среду наночастиц, что, вероятно, вызвано относительно низкой чувствительностью этого тест-объекта.

В настоящей работе для проведения исследования были выбраны два вида ксилотрофных грибов, обитающих в лесах и тропических джунглях, вешенка обыкновенная *P. ostreatus* и тропический люминесцирующий вид *N. nambi*.

Влияние наночастиц серебра на рост мицелия грибов определяли в два этапа. На первом этапе оценивали действие наносеребра на рост мицелия на агаризованной синтетической среде в чашках Петри. Было показано, что в месте нанесения исходной суспензии наносеребра оставались свободные зоны, которые постепенно зарастали воздушным мицелием. При нанесении капель, содержащих суспензию наночастиц TiO_2 и SiO_2 размерами 100-120 и 10-15 нм в концентрациях 1000 мг/л, заметного ингибирования роста мицелия грибов выявлено не было. Незначительные, едва заметные пятна в месте нанесения наночастиц двуокиси титана на колонии гриба *P. ostreatus* были различимы в первые двое суток после полного зарастания субстрата мицелием, однако после этого времени они исчезли (Рисунок 3.1.2.1.).

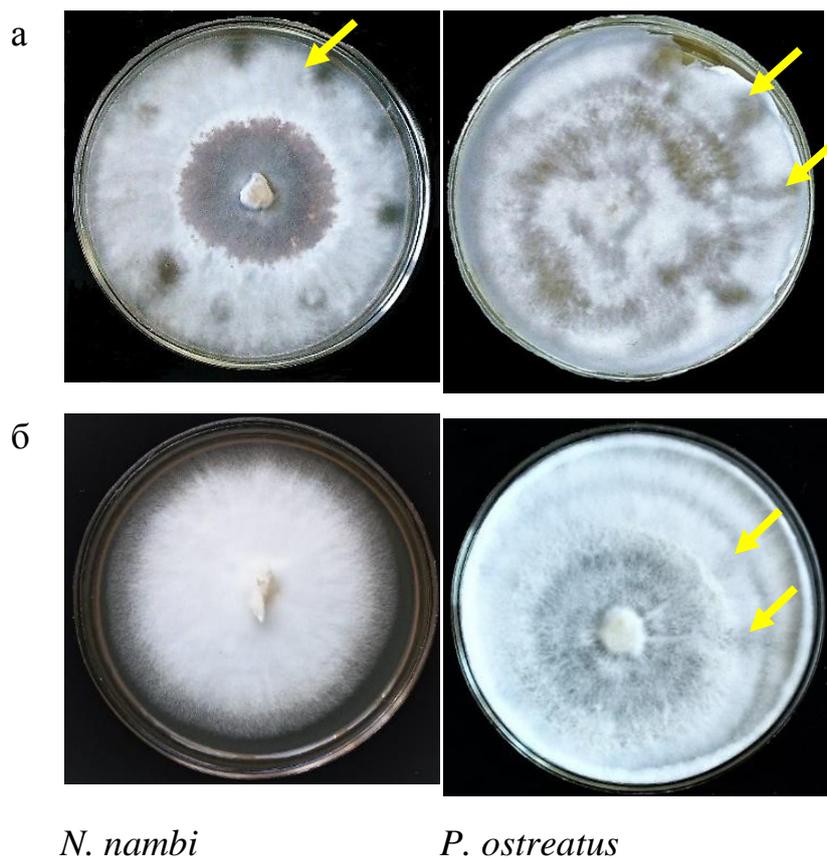
*N. nambi**P. ostreatus*

Рисунок 3.1.2.1. Ингибирование роста мицелия грибов в зонах внесения наносеребра при концентрации 250 мг/л (а) и в зонах внесения наночастиц диоксида титана при концентрации 1000 мг/л (б).

На втором этапе эксперимента была проведена количественная оценка ростовой реакции мицелия ксилотрофных грибов в ответ на внесение в трубки с питательной средой только наночастиц серебра. После двухсуточной лаг-фазы (задержки роста) мицелий грибов стал активно распространяться по субстрату (Рисунок 3.1.2.2.).

Выяснилось, что гриб *P. ostreatus* вдвое более чувствителен к наночастицам серебра, чем *N. nambi*, значения EC_{50} составили 14 и 31 мг/л, соответственно (Рисунок 3.1.2.3.) (Асанова и др., 2018). Найденный эффект, вероятно, обусловлен различием в толщине гиф мицелия рассматриваемых культур грибов, а также физическими эффектами, которые из этого следуют.



Рисунок 3.1.2.2. Распространение мицелия гриба *P. ostreatus* по субстрату на десятые сутки культивирования.

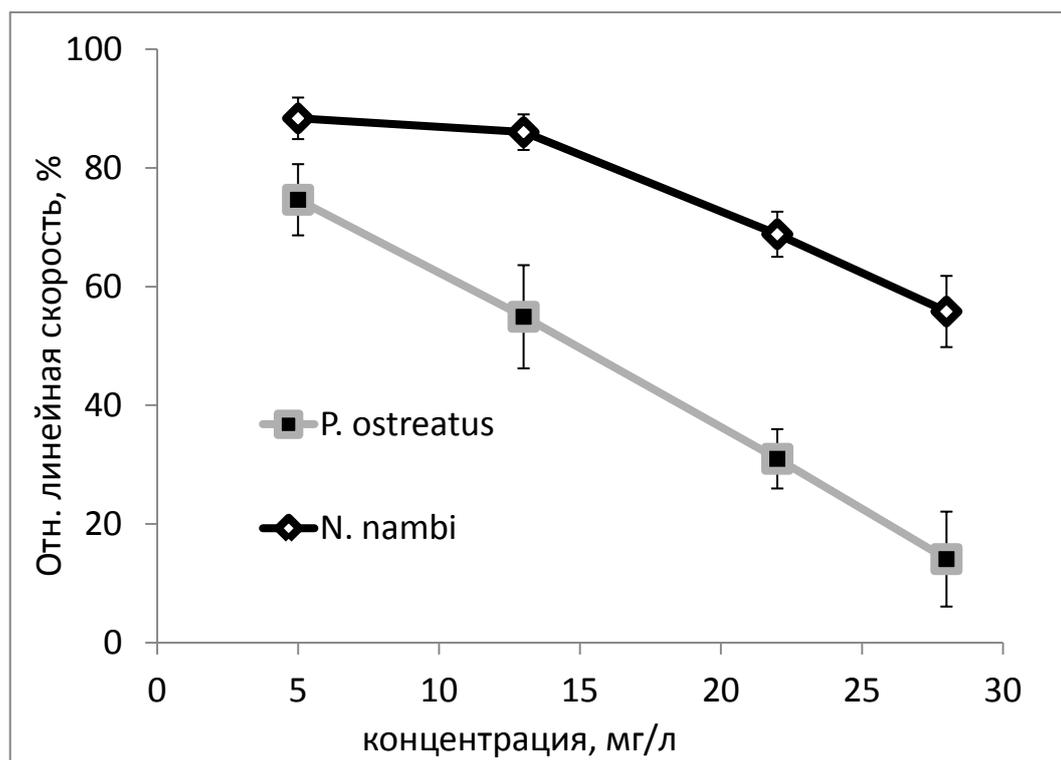


Рисунок 3.1.2.3. Относительная линейная скорость роста мицелия грибов *N. nambi* и *P. ostreatus* в присутствии различных концентраций наносеребра (по отношению к контролю).

Можно предположить, что более тонкие гифы гриба *N. Nambi* в сравнении с гифами *P. ostreatus* имеют больший контакт с твердым субстратом, покрытым адсорбированными наночастицами. Последние создают эффект экранирования поверхности субстрата, что ограничивает доступ гриба к источнику питательных веществ. Дополнительно при непосредственном контакте наночастиц с мицелием, свободные ионы серебра способны повреждать клеточную стенку и ингибировать его рост.

Так как приблизительный диаметр поры грибов в клеточной стенке составляет около 30 нм (Flegler et al., 1976), исследуемые наночастицы серебра и диоксида кремния, размером меньше диаметра поры, могли проникать через клеточную стенку. Наночастицы способны изменять проницаемость клеточной мембраны, связывать поверхностные белки и попадать в цитоплазму или механически разрушать липидный бислой, приводя к гибели клетки гриба (Xia et al., 2016; Koduru et al., 2018).

Вероятно, негативное воздействие наночастиц серебра может быть обусловлено испусканием иона внутри клетки, которое способствует торможению роста мицелия. В то время как наночастицы диоксида кремния размером 10-15 нм, аккумулируясь в клетках, могли вызывать отдаленные во времени эффекты. Так, наночастицы в своем первоначальном виде или в форме иона могли вызвать митохондриальную дисфункцию и генерирование АФК, что привело к повреждению белков и нуклеиновых кислот и, наконец, ингибировало ростовые функции клеток (Patra et al., 2012).

3.1.3. Изменение выживаемости рачков *Ceriodaphnia affinis*, происходящее под влиянием наночастиц

Планктонные ракообразные являются трофическим и энергетическим связующим звеном между первичными продуцентами (водорослями) и вторичными консументами (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.

Ракообразные обладают повышенной чувствительностью к широкому списку загрязняющих веществ, имеют короткий жизненный цикл и легко культивируются. Поэтому они являются удобными модельными организмами в водной токсикологии (Мичукова и др., 2007).

Вначале нами была оценена чувствительность культуры рачков на модельном токсиканте бихромате калия. Согласно методике (ФР.1.39.2007.03221.), культура является пригодной к проведению биотестирования, если диапазон концентраций модельного токсиканта, при котором в течение 24 часов гибнет 50 % дафний, составляет 0,9 - 2,0 мг/л. В нашем исследовании 50%-ная гибель организмов наблюдалась при концентрации 1 мг/л (Рисунок 3.1.3.1.). Это означает пригодность культуры *C. affinis* к проведению экспериментов с наночастицами.

Реакцию водных рачков *C. affinis* в ответ на действие наночастиц оценивали по изменению выживаемости тест-организмов за 24 и 48 часов. Установлено, что наиболее значимое негативное влияние на цериодафний оказывали наночастицы серебра (Асанова, Полонский, 2018). В опытном варианте с ними 50%-ное снижение выживаемости рачков (по отношению к контролю) отмечено при концентрации токсиканта, равной 0,15 мг/л независимо от экспозиции 24 или 48 часов (Рисунок 3.1.3.2.).

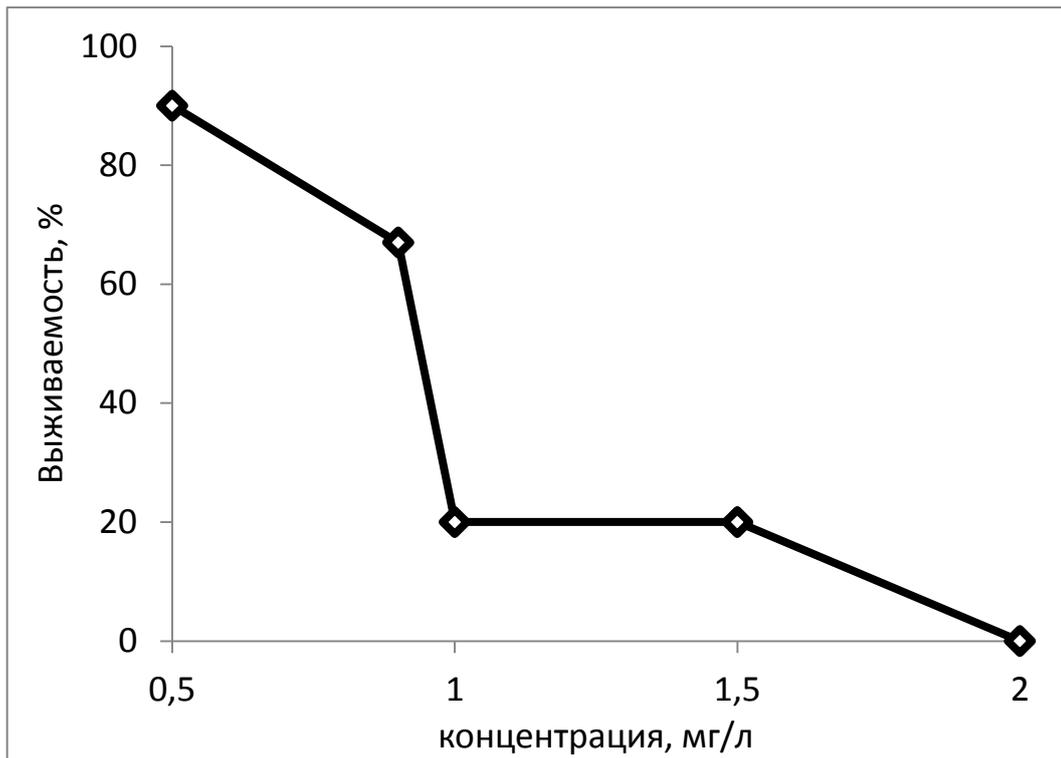


Рисунок 3.1.3.1. Выживаемость водных рачков *C. affinis* в присутствии модельного токсиканта бихромата калия за 24 часа.

Найденная величина указанного показателя совпадает с результатами исследования, выполненного на культуре *C. dubia* (Angel et al., 2013). Авторы определили, что значение параметра EC_{50} в 48-часовой экспозиции с наночастицами размером 14 нм, покрытыми цитратом, составляет 0,15 мг/л. Близкие по величине данные были зарегистрированы в экспериментах на *D. magna* при 96 часовой экспозиции с суспензиями, содержащими наночастицы серебра размером 35 нм, когда показатель EC_{50} составил 0,1 мг/л (Gaiser et al., 2011).

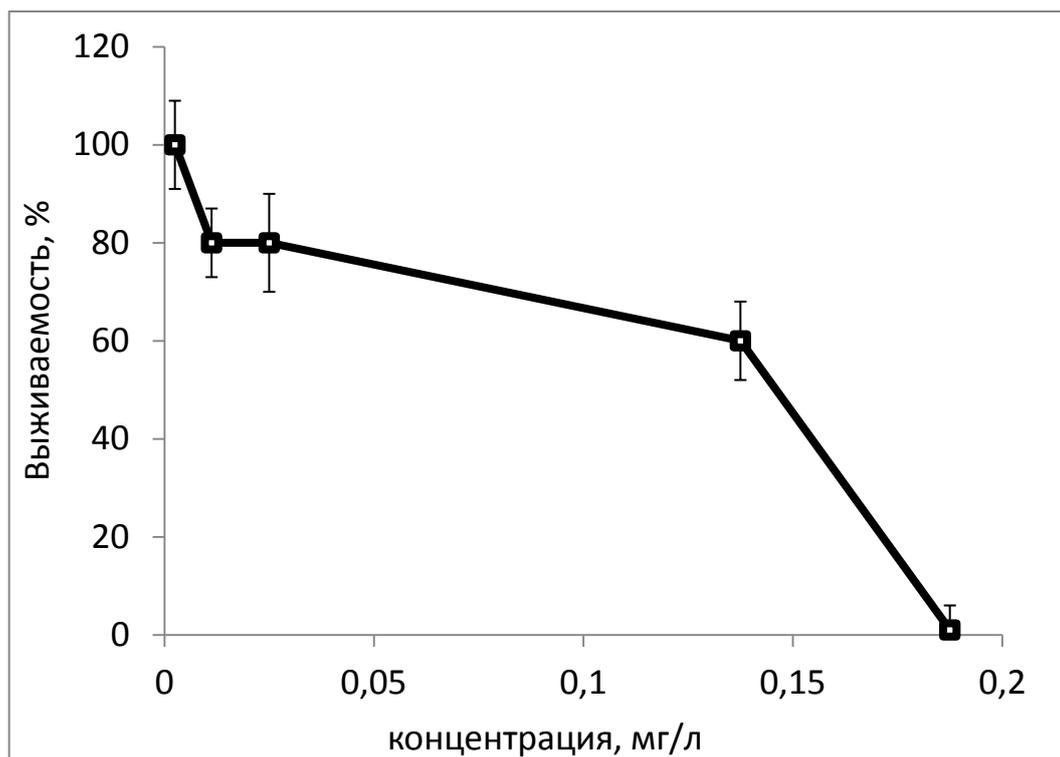


Рисунок 3.1.3.2. Выживаемость водных рачков *C. affinis* в присутствии различных концентраций наночастиц серебра в 48-часовой экспозиции.

Выживаемость цериодафний в присутствии диоксида титана была исследована в диапазоне концентраций до 5 мг/л. При превышении данного значения концентрации наблюдалась чрезмерная мутность суспензии, что затрудняло визуальную оценку состояния особей в стеклянном стакане. Вследствие такого физического эффекта острого токсического воздействия наночастиц, регистрируемого по выживаемости цериодафний, зарегистрировано не было. Гибель рачков за 24 и 48 часов при концентрации до 5 мг/л не превышала уровня 10% по сравнению с контролем. Отсутствие негативного влияния смеси анатаза и рутила при концентрации до 100 мг/л на *D. similis* также было показано в литературе (Marcone et al., 2012; Novak et al., 2018).

Изучение влияния наночастиц диоксида кремния размером 100-120 нм на выживаемость рачков *C. affinis* показало, что за 24 часа показатель EC_{50} был зафиксирован при величине 14 мг/л. При увеличении длительности экспозиции вдвое значение EC_{50} изменилось незначительно. Для водных рачков наночастицы

диоксида кремния на порядок меньшего размера (10-15 нм) оказались менее токсичны. Результаты показали, что при увеличении длительности экспозиции в эксперименте токсический эффект наночастиц диоксида кремния на *C. affinis* возрастал, что проявилось в 50%-ном снижении выживаемости особей при концентрациях 40 и 53 мг/л (Рисунок 3.1.3.3.).

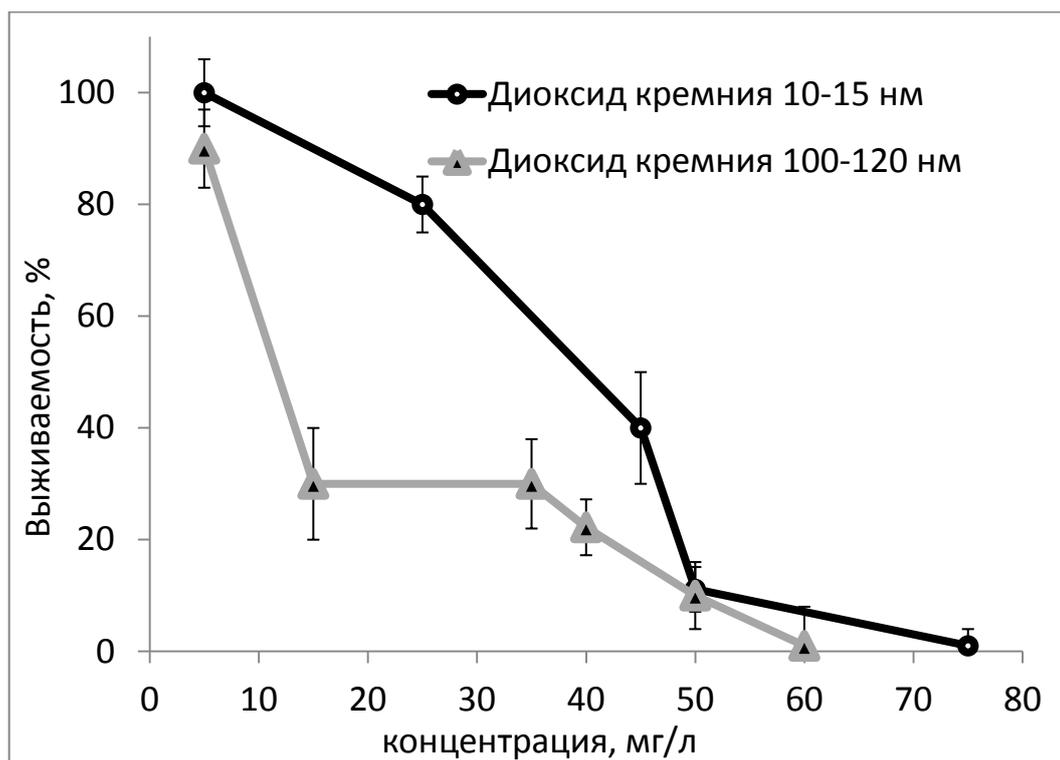


Рисунок 3.1.3.3. Выживаемость водных рачков *C. affinis* в присутствии различных концентраций наночастиц диоксида кремния размером 100-120 нм и 10-15 нм в 48-часовой экспозиции.

Близкие по величине результаты были получены на культуре *D. magna*, 50%-ное снижение выживаемости в присутствии наночастиц диоксида кремния размером 14 нм в условиях 72-часовой экспозиции было установлено при концентрации, равной 29,7 мг/л (Clement, 2013).

По-видимому, негативное влияние наночастиц на выживаемость рачков реализуется в виде нескольких механизмов. В начале эксперимента частицы, вероятно, могли оказывать механическое воздействие на организм. Так, на

примере диоксида титана показано, что наночастицы способны адсорбироваться на поверхности тела рачков, покрывая при этом почти всю поверхность. Последнее препятствует нормальному их передвижению и способно оказывать другие негативные эффекты (Novak et al, 2018). Позже часть наночастиц могла оказаться в кишечнике (Lovern et al, 2008; Zhu et al, 2009; Dalai et al, 2013; Vacchetta et al, 2017; Novak et al, 2018), где они могли ассимилироваться в ткани. Вероятно, токсическое влияние диоксида кремния размером 10-15 нм на рачков во вторые сутки экспозиции является проявлением указанного эффекта. Ассимилированные наночастицы вполне способны запускать процесс клеточного окислительного стресса, о чем свидетельствует увеличение активности ряда компенсаторных ферментов (Kim et al, 2010; Dalai et al, 2013; Lv et al, 2017). Кроме этого наночастицы могли оказывать отрицательное воздействие внутри кишечника, например, ингибировать пищеварительные ферменты, как это показано на примере фуллерена (Lv et al, 2017), или изменять морфологию эпителиальной ткани (Dalai et al, 2013; Heinlaan et al, 2011; Mendonca et al, 2011). Токсический эффект наночастиц серебра, по-видимому, вызван тем, что они способны абсорбироваться клеточной мембраной и проникать через неё внутрь клетки. Во-первых, это приводит к нарушению ионного обмена клетки, и, в конечном счете, затрудняет выход ионов серебра из нее. Во-вторых, проникновение наночастиц внутрь клетки приводит к образованию реакционно-способных форм кислорода (Henglein, 1998; Lok et al, 2006).

Некоторые авторы объясняют токсические свойства свободных ионов серебра их способностью нарушать приток ионов натрия в клетки, что приводит к гибели организма (Glover, Wood, 2004; Evanoff, Chumanov, 2015). Кроме того высвобождение ионов серебра из наночастиц возможно внутри кишечного просвета, что вызывает тем самым вторичные токсические эффекты (Glover, Wood, 2004).

Заключение по разделу 3.1.

Итак, проведенные нами исследования на *A. sativa* показали, что наиболее сильная негативная ростовая реакция этих растений имела место в присутствии наночастиц серебра (Таблица 3.1.4.1.).

Таблица 3.1.4.1. Показатели EC_{50} исследуемых наночастиц по отношению к ростовым функциям овса посевного.

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	-*	-*	-*	-*

«-» – Эффект не наблюдался, показатель EC_{50} определить не удалось в диапазоне концентраций до 100 мг/л.

«-*» – Наблюдался слабый эффект, показатель EC_{50} определить не удалось в диапазоне концентраций до 100 мг/л.

Высокие концентрации диоксида титана способствовали снижению длины корешка и незначительному уменьшению массы побегов и корней. Крупные наночастицы диоксида кремния оказывали слабое воздействие на все исследуемые ростовые функции, в то время как мелкие частицы способствовали только снижению массы корня. Было найдено, что самым чувствительным органом растений овса к воздействию наночастиц серебра является корень.

Наночастицы серебра обладали фунгистатической активностью по отношению к *N. nambi* и *P. ostreatus* (EC_{50} 14 и 31 мг/л соответственно). Судя по ростовой реакции исследуемых грибов, наночастицы TiO₂ и SiO₂ размерами 100-

120 и 10-15 нм при концентрациях до 1000 мг/л не проявили фунгистатической активности.

Наиболее сильное негативное воздействие на водные рачки *C.affinis* оказывали также наночастицы серебра, при этом ответная реакция не зависела от длительности экспозиции (Рисунок 3.1.4.1.).

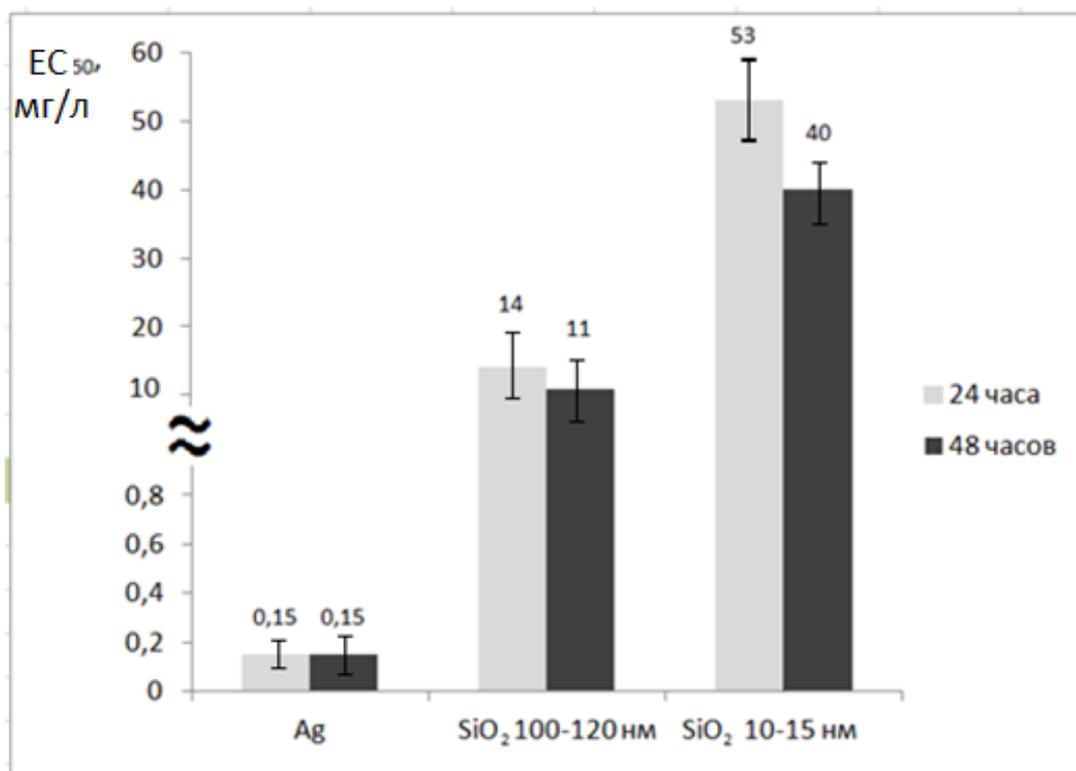


Рисунок 3.1.4.1. Динамика выживаемости (показатель EC_{50}) водных рачков *C. affinis* под влиянием наночастиц серебра, диоксида кремния размером 100-120 нм и 10-15 нм в экспериментах при 24- и 48-часовой экспозициях.

Наночастицы диоксида титана для исследуемых тест-организмов оказались не токсичными 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 большего размера, при этом негативное воздействие частиц меньшего размера повышалось с увеличением длительности экспозиции.

3.2. Одноклеточные организмы

3.2.1. Изменение ростовых и фотосинтетических показателей водоросли *Chlorella vulgaris* под воздействием наночастиц

3.2.1.1. Изменение прироста микроводоросли в присутствии наночастиц

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.

При проведении биотестирования одноклеточная водоросль *C. vulgaris* является одним из наиболее часто используемых тест-объектов. Для данной водоросли характерно интенсивное размножение делением материнской клетки до 4–8 раз в сутки с выходом большого количества автоспор (до 32). В наших экспериментах численность клеток такой культуры, определяемая прямым счетом в камере Горяева, составляла 60-70 тысяч клеток/мл, а за 22 часа культивирования оптическая плотность водорослевой суспензии увеличивалась в 30 раз. Данная характеристика является чувствительным параметром, измеряемым в относительно короткой временной экспозиции.

В настоящем исследовании численность клеток культуры оценивалась по величине оптической плотности суспензии водоросли в присутствии наночастиц и без них (контроль) по завершению заданной экспозиции. Оптимальное время экспозиции составило 22 часа, за данное время достигалась максимальная численность клеток водорослей в контроле (без наночастиц), при этом культура не успевала адаптироваться к этим веществам в опыте (Рисунок 3.2.1.1.1.).

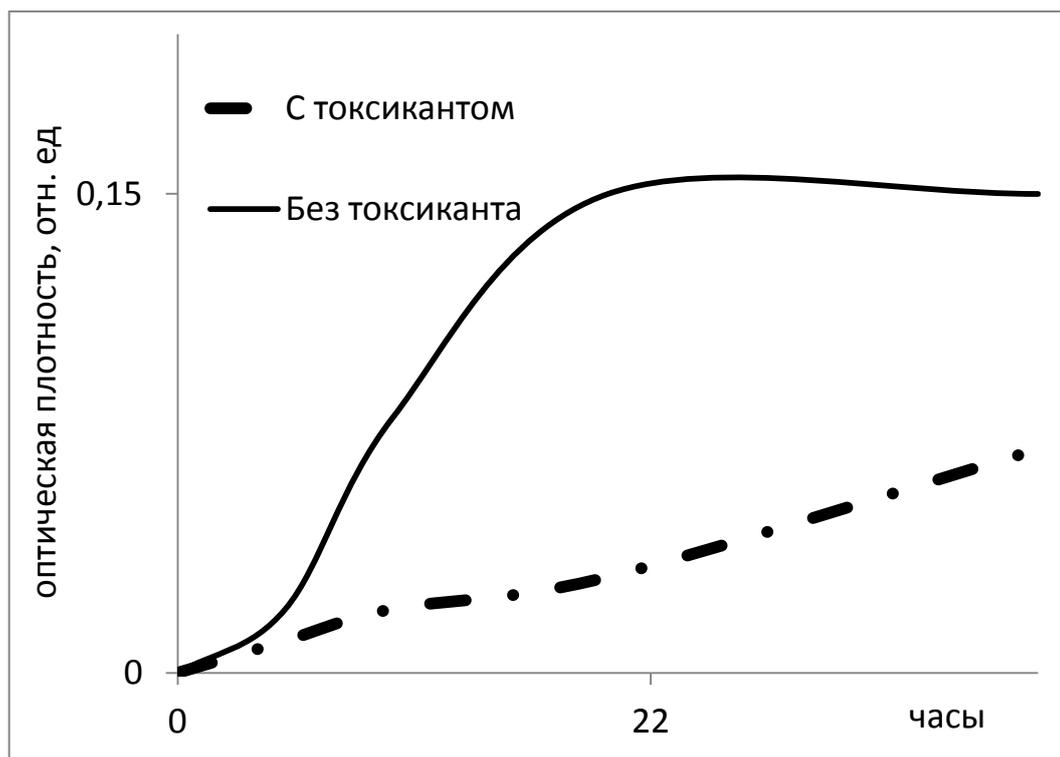


Рисунок 3.2.1.1.1. Временной ход изменения оптической плотности культуры водоросли *C. vulgaris*.

Для оценки качества культуры водоросли вначале определялась ее чувствительность по отношению к модельному токсиканту бихромату калия ($K_2Cr_2O_7$). Согласно известной методике (Моргалев и др., 2010), при хорошем состоянии культуры водоросли и правильно поставленном эксперименте после 22 часов культивирования 50%-ное подавление прироста по сравнению с контролем должно наблюдаться в диапазоне концентраций бихромата калия 0,4–1,6 мг/л. В нашем эксперименте 50%-ное ингибирование ростовой функции было отмечено при концентрации этого вещества 0,7 мг/л. Это означает пригодность культуры к выполнению опытов с наночастицами (Рисунок 3.2.1.1.2., Рисунок 3.2.1.1.3.).

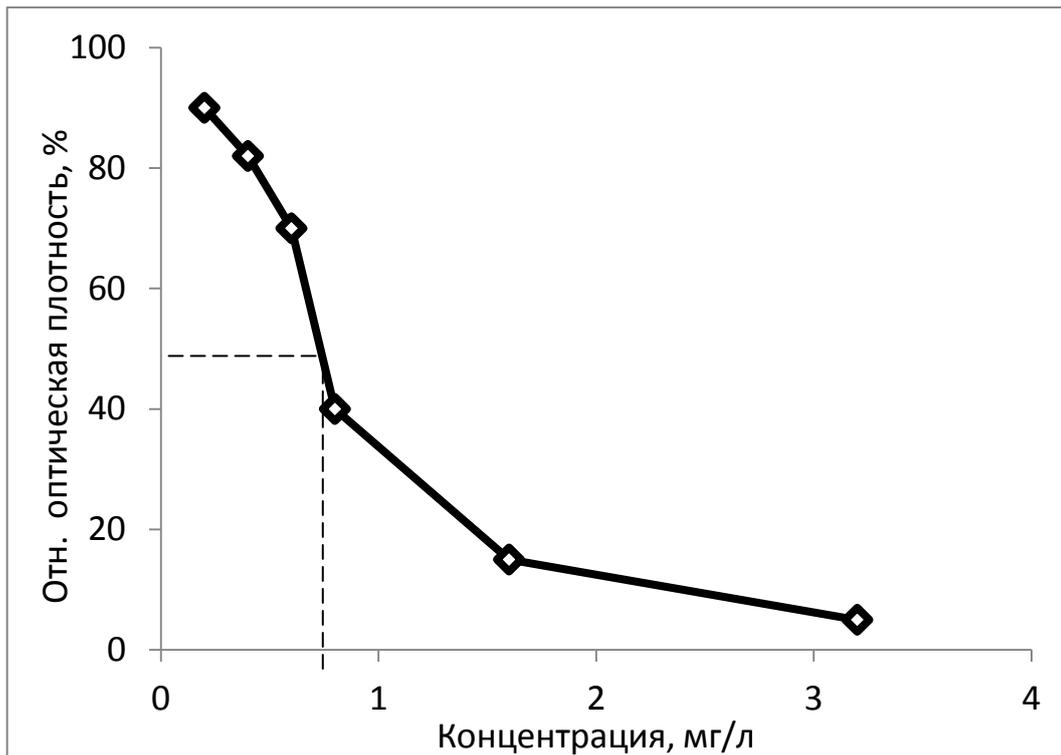


Рисунок 3.2.1.1.2. Изменение относительной оптической плотности культуры *C. vulgaris* в присутствии различных концентраций модельного токсиканта бихромата калия за 22 часа культивирования (относительно контроля).



Рисунок 3.2.1.1.3. Культивирование водоросли *C. vulgaris* в присутствии различных концентраций наночастиц.

В настоящем исследовании нами были изучены ростовые реакции прироста водоросли хлореллы в ответ на действие наночастиц (Асанова, Полонский, 2017а; Асанова и др., 2017).

Результаты продемонстрировали резкое подавление прироста культуры водоросли с увеличением концентрации наночастиц серебра в питательной среде (Рисунок 3.2.1.1.4.).

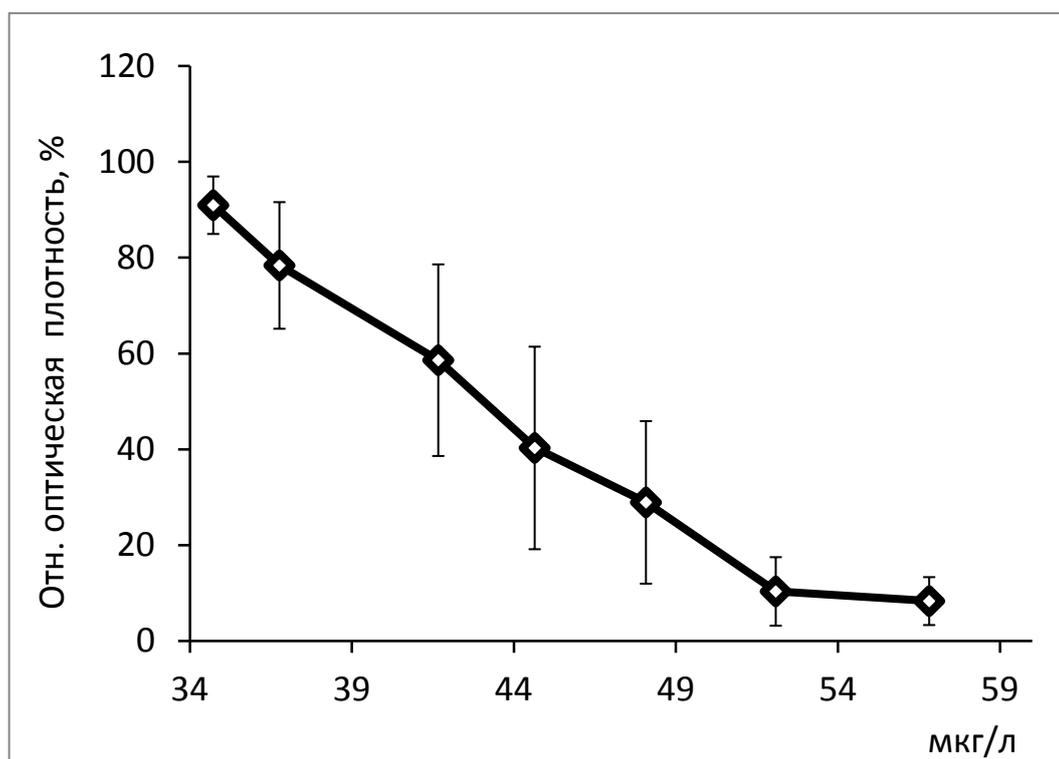


Рисунок 3.2.1.1.4. Изменение относительной оптической плотности культуры хлореллы после 22 часов культивирования (по отношению к контролю) в присутствии наночастиц серебра.

Значение концентрации, при котором регистрировалось снижение оптической плотности культуры на 50% по отношению к контролю, составило 0,045 мг/л. Следует подчеркнуть, что в условиях наших экспериментов реакция культуры хлореллы на присутствие наночастиц серебра наблюдалась в достаточно узком диапазоне концентраций. Так, заметного снижения роста культуры водоросли в присутствии в среде этих частиц в концентрации 0,035 мг/л не было

отмечено, тогда как концентрация наносеребра, равная 0,056 мг/л полностью подавляла прирост клеток. Установленное нами значение EC_{50} торможения роста культуры в присутствии наночастиц серебра соответствует результатам исследования других авторов, выполненного на водоросли *P. subcapitata* (Ribeiro et al., 2014), которые определили, что 50%-ное торможение роста этой культуры после 72-часовой световой экспозиции в присутствии наночастиц Ag происходит при концентрации 0,032 мг/л.

В наших экспериментах было показано слабое воздействие наночастиц диоксида титана на ростовую реакцию культуры водоросли хлорелла, показатель EC_{20} составил 3 мг/л. При превышении концентрации 5 мг/л наблюдалась мутность суспензии, что препятствовало оценке ростовой реакции водоросли по оптической плотности культуры.

Исследования характера влияния наночастиц диоксида кремния на прирост водоросли хлорелла выявили, что частицы размером 10-15 нм оказывают существенно меньшее воздействие, чем более крупные частицы, размером 100-120 нм. Так, если для частиц большего размера 50%-ное подавление роста наблюдалось при концентрации 8 мг/л, то для мелких частиц такого воздействия не было выявлено вовсе даже при концентрации 100 мг/л. При этом 20% снижение прироста отмечалось при концентрации мелких наночастиц диоксида кремния 50 мг/л (Рисунок 3.2.1.1.5.).

Эксперименты, выполненные другими авторами с относительно мелкими наночастицами диоксида кремния (20-50 нм), также не обнаружили заметного эффекта на прирост водоросли *Chlorella sp.* в диапазоне концентраций до 1000 мг/л (Ji et al., 2011).

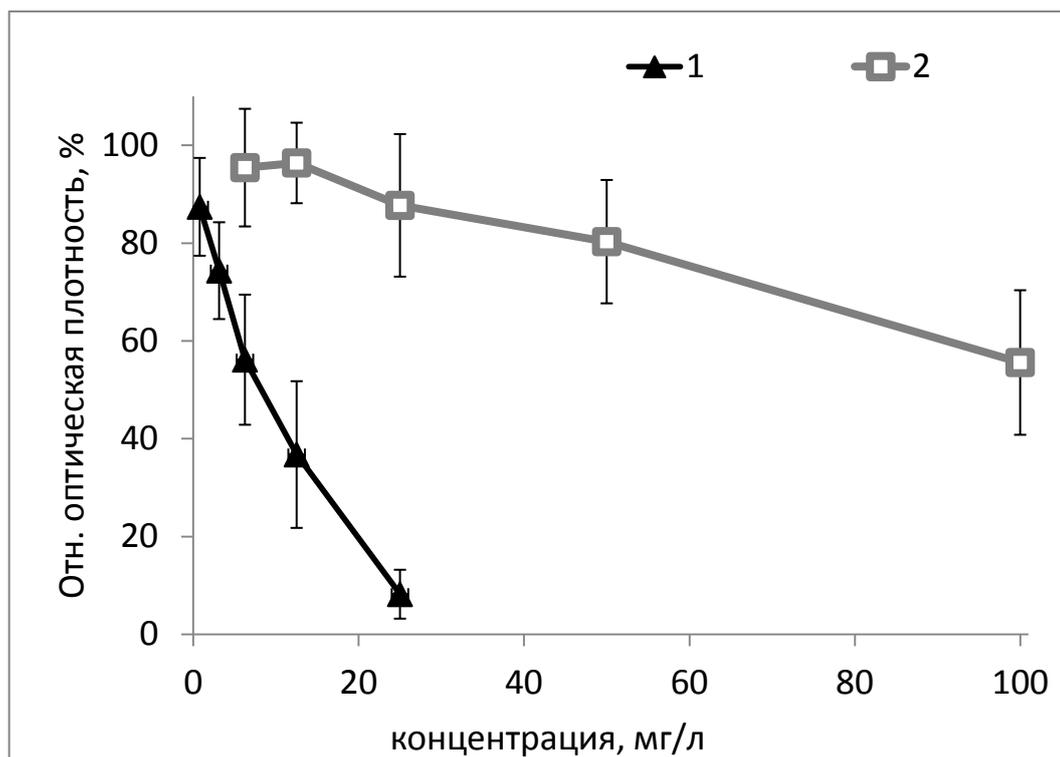


Рисунок 3.2.1.1.5. Изменение относительной оптической плотности суспензии хлореллы после 22 часов культивирования при различных концентрациях наночастиц (по отношению к контролю): 1 – диоксида кремния размером 100-120 нм, 2 – диоксида кремния размером 10-15 нм.

3.2.1.2. Изменение фотосинтетической функции микроводоросли в присутствии наночастиц

Клетки водоросли *C. vulgaris* имеют шаровидную форму и содержат один чашеобразный хлоропласт. Присутствие токсического вещества может оказывать воздействие на функционирование хлоропласта, тем самым изменять фотосинтетическую активность клетки водоросли.

Величина относительного показателя замедленной флуоресценции (ОПЗФ), представляет собой отношение интенсивностей миллисекундной замедленной флуоресценции при возбуждении светом высокой и низкой интенсивностей. Значение этого параметра многократно снижается при подавлении фотосинтетической активности растительных клеток.

В начале каждого эксперимента определялась чувствительность культуры водоросли путем регистрации изменений ОПЗФ в присутствии модельного токсиканта $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ в концентрации 0,02 мг/л по отношению к контролю. Культура считалась чувствительной при снижении ОПЗФ на 80% и более по отношению к контролю в присутствии указанной концентрации данного вещества.

Нами было изучено изменение фотосинтетической функции микроводоросли в присутствии наночастиц (Асанова, Полонский, 2017а; Асанова и др., 2017) (Рисунок 3.2.1.2.1.).

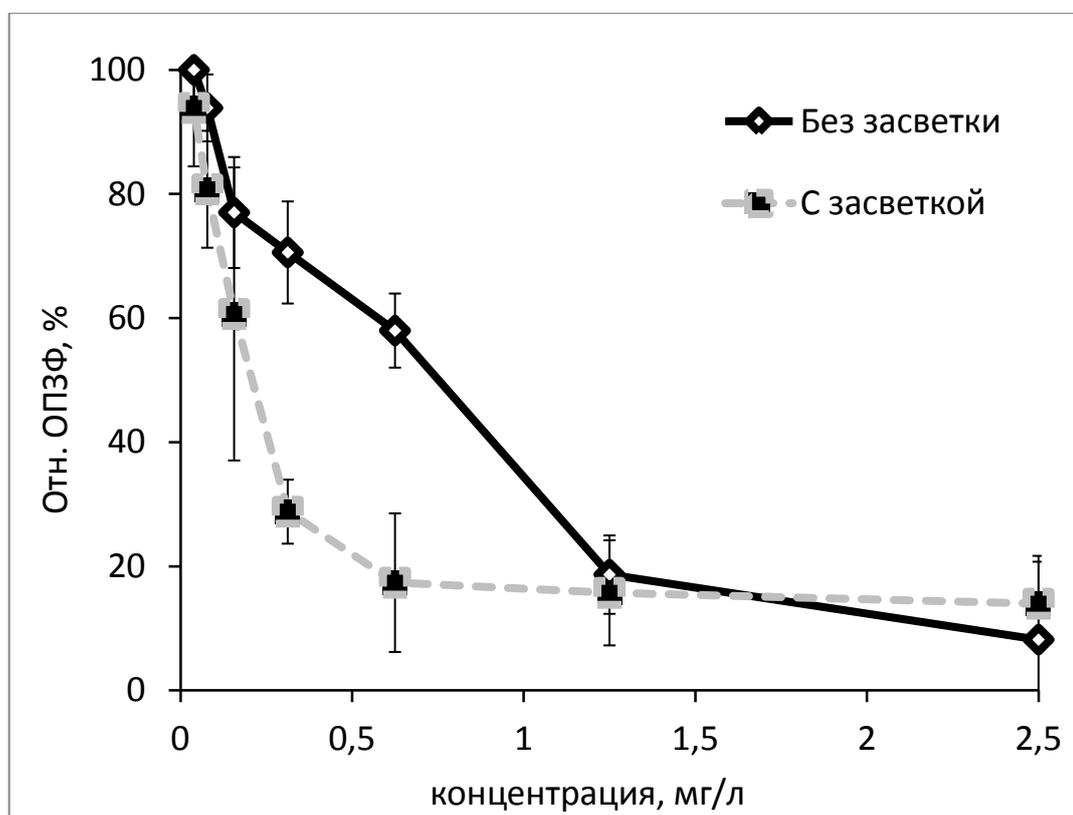


Рисунок 3.2.1.2.1. Изменение показателя ОПЗФ водоросли до и после 1-часовой экспозиции (по отношению к контролю) в средах с различным содержанием наноразмерного серебра.

При исследовании изменения величины ОПЗФ культуры хлореллы в ответ на внесение в среду наночастиц серебра негативное воздействие было

зарегистрировано уже в первые минуты эксперимента (Асанова, Полонский, 2017а). После добавления наносеребра в культуру водоросли значение EC_{50} составило 0,8 мг/л, что может свидетельствовать о влиянии исследуемых наночастиц на первичные реакции фотосинтеза. После 1-часовой световой экспозиции аналогичный эффект наблюдался при существенно более низкой концентрации наносеребра (0,1 мг/л). Очевидно, что световой фактор и дополнительная экспозиция культуры хлореллы способствовали усилению негативной реакции фотосинтетического аппарата водоросли в ответ на воздействие наночастиц.

В опытах, выполненных на водоросли *S. quadricauda* (Тодоренко и др., 2014), было показано, что наночастицы серебра размером 80 нм способны увеличивать светочувствительность водорослей, а также блокировать потенциальную активность фотосистемы II при концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М (~5,4 мг/л).

При изучении влияния наночастиц диоксида титана на ОПЗФ хлореллы нами не было зарегистрировано значительного снижения величины данного показателя в диапазоне концентраций до 100 мг/л (Рисунок 3.2.1.2.2.) Вероятно, указанные наночастицы не оказывали прямого воздействия на первичные реакции фотосинтеза. Снижение величины ОПЗФ хлореллы на 20% в присутствии наночастиц диоксида титана удалось зарегистрировать после 1-часовой засветки при концентрации 13 мг/л. Данный эффект, вероятно, обусловлен фотокаталитической активностью наночастиц диоксида титана. Известно, что лампы накаливания создают слабое УФ излучение, что способствовало увеличению токсического эффекта после световой обработки (Zhang, Sun, 2004; Gurr et al., 2005; Hund-Rinke, Simon, 2006; Dalai et al., 2013; Iswarya et al, 2015).

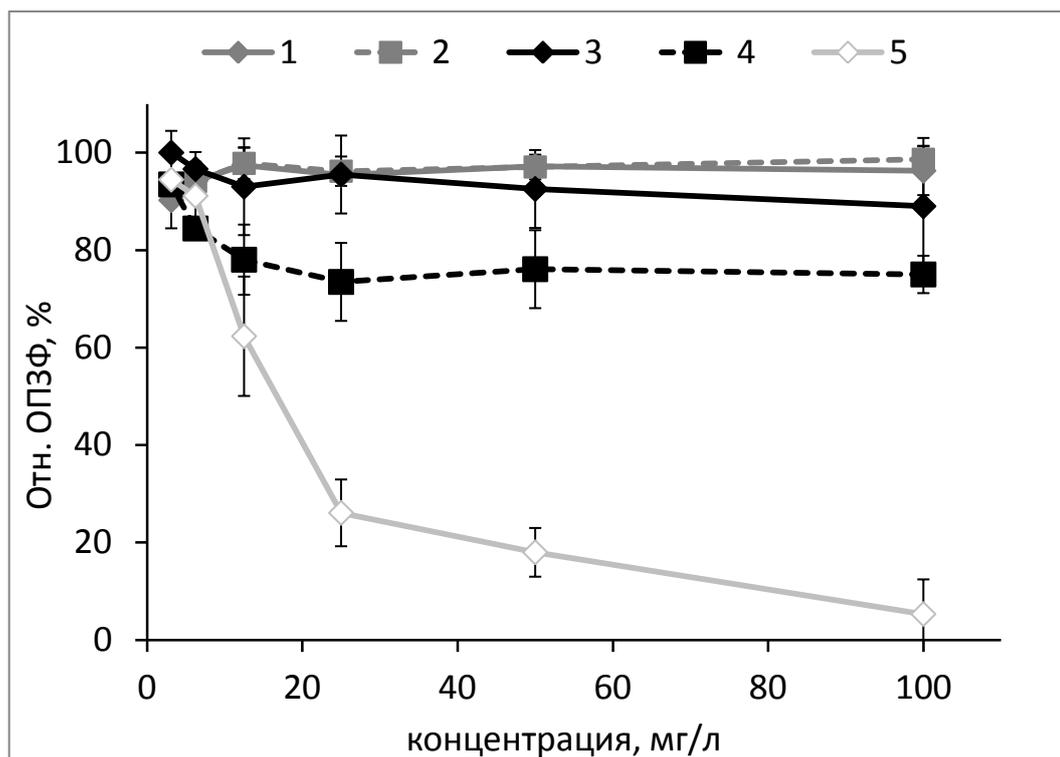


Рисунок 3.2.1.2.2. Изменение показателя ОПЗФ (по отношению к контролю) культуры водоросли хлореллы при различной концентрации наночастиц: 1 и 2 - диоксида кремния размером 10-15 нм до и после световой экспозиции, соответственно, 3 и 4 - диоксида титана до и после световой экспозиции, соответственно; 5 - диоксида кремния размером 100-120 нм до световой экспозиции.

В экспериментах было установлено, что внесение в среду частиц диоксида кремния размером 100-120 нм сопровождается быстрым снижением показателя ОПЗФ водоросли хлорелла, свидетельствуя о существенном подавлении фотосинтетической функции клеток (Рисунок 3.2.1.2.2.). Значение EC_{50} составило величину 16 мг/л. После 1-часовой экспозиции эффект на ЗФ усиливался и проявлялся в снижении свечения при возбуждении светом как высокой, так и низкой интенсивности. Наночастицы диоксида кремния размером 10-15 нм статистически значимого влияния на величину ОПЗФ водоросли в диапазоне до 100 мг/л не оказывали. Дополнительная засветка не усилила воздействия этих наночастиц на фотосинтез микроводоросли.

Вероятнее всего, крупные наночастицы диоксида кремния и диоксида титана повреждали клеточную стенку водоросли, что приводило к ее механическому разрушению, или выступали в качестве связующих агентов между клетками и, образуя агрегаты, подавляли их рост (Harris, 2013; Wang et al., 2016a). Мелкие наночастицы диоксида кремния и серебра, могли преодолевать клеточную стенку посредством диффузии через поры. Не исключена возможность, что торможение прироста водоросли за 22 часа было вызвано проникновением наночастиц в клетки путем эндоцитоза (Wang et al., 2016b). Кроме того, находясь в прямом контакте с водорослью, частицы могли увеличивать проницаемость мембраны клетки и входить в цитоплазму (Dalai et al., 2013; Marchello et al., 2018). Присутствуя в цитоплазме, наночастицы, вероятно, образовывали множественные АФК, которые в последующем приводили к повреждению мембраны и клеточной стенки водоросли (Wang et al., 2016b; Marchello et al., 2018;), а также вызывали окислительный стресс и повреждения ДНК, белков и клеток (Dalai et al., 2013).

В нашей работе (Асанова, Полонский, 2017б) на одноклеточных организмах *Paramecium caudatum* было установлено, что наночастицы серебра оказывают более сильное токсическое воздействие, чем их ионы, причем данный эффект увеличивался во времени. Скорее всего, это было вызвано медленным растворением в водной среде наночастиц с образованием свободных ионов, которые вносят дополнительный вклад в токсическое воздействие в условиях длительной временной экспозиции. Дополнительно наночастицы серебра с адсорбированными на поверхности ионами могли сами в свою очередь адсорбироваться на поверхности клетки водоросли и высвободить ионы, которые затем могли диффундировать в клетку (Liu, Hurt, 2010; Zouzelka et al., 2016). Эффект адсорбции различных наночастиц на поверхности клеток был отмечен в нескольких исследованиях (Liu, Hurt, 2010; Anjali et al., 2012). Известно, что свободные ионы серебра, находящиеся внутри клеток, способны ингибировать дыхательные ферменты и вызывать окислительный стресс

вследствие образования АФК (Kim et al., 2007; Navarro et al., 2008; Wang et al., 2016в). Кроме того они могут связывать серосодержащие и фосфорсодержащие молекулы (цистеин, таурин и т.д.), участвующие в антиоксидантной защите клетки (Pappa et al., 2007).

Наночастицы диоксида титана, вероятно, оказывали эффект затенения на клетки водоросли, уменьшая доступ света, необходимого для фотосинтеза, как было показано в литературе (Navarro et al., 2008; Aruoja et al., 2009; Marchello et al., 2018). Создавая высокую мутность суспензии при концентрации более 5 мг/л, наночастицы опосредовано или путем агрегации на поверхности клетки могут ингибировать прирост культуры микроводоросли (Navarro et al., 2008; Wang et al., 2016в).

По-видимому, повреждение клеточной стенки и мембраны и, как следствие, миграция наночастиц через них оказывают токсический эффект в короткой временной экспозиции, проявившийся в снижении ОПЗФ до проведения процедуры засветки. Увеличение негативного влияния наночастиц после 1-часовой засветки свидетельствует о включении других механизмов повреждения, связанных, главным образом, с образованием ионов серебра. Уменьшение прироста культуры хлореллы в 22-часовой экспозиции, по-видимому, явилось следствием наличия всех указанных выше механизмов токсичности наночастиц.

3.2.2. Изменение показателей прорастания конидий микромицетов *Bipolaris sorokiniana* под воздействием наночастиц

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.

В то же время некоторые представители микромицетов являются опасными патогенами, которые поражают растения, нанося существенный ущерб агросистемам, а также вызывают заболевания у человека и животных.

В настоящем исследовании микромицеты представлены одним из самых вредоносных видов патогенных организмов, возбудителем корневой гнили *B. sorokiniana*. Непосредственным объектом изучения служили конидии гриба, прорастание которых оценивалось во времени (Рисунок 3.2.2.1.) (Асанова и др., 2018).

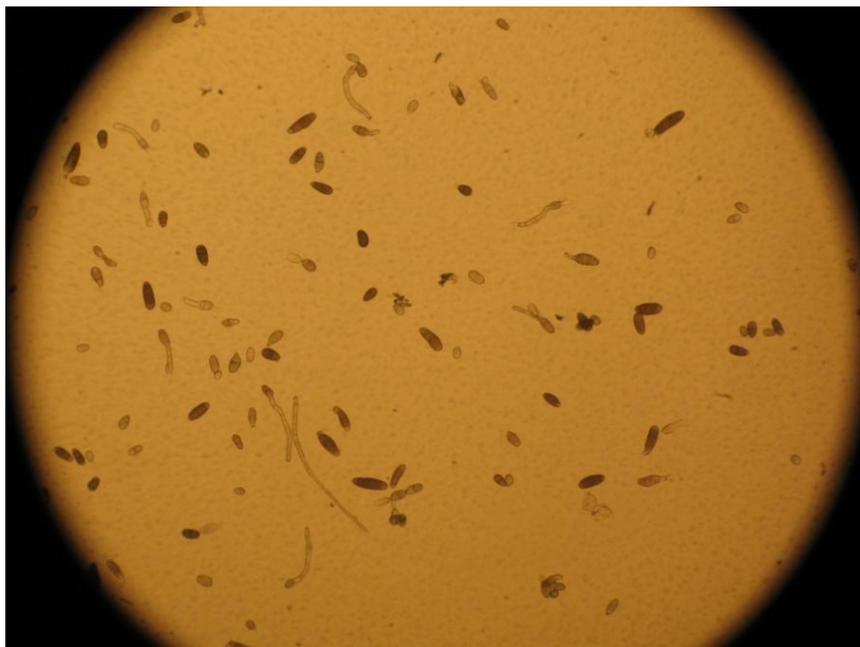


Рисунок 3.2.2.1. Конидии корневой гнили зерновых *B. sorokiniana* под микроскопом в 400-кратном увеличении.

В данной работе конидии микромицета условно приняты за аналог одноклеточного организма.

Вначале было определено оптимальное время экспозиции для проведения экспериментов. Выяснилось, что за 5-5,5 часов достигается максимальное количество проросших конидий в условиях контроля (без наночастиц) (Рисунок 3.2.2.2.).

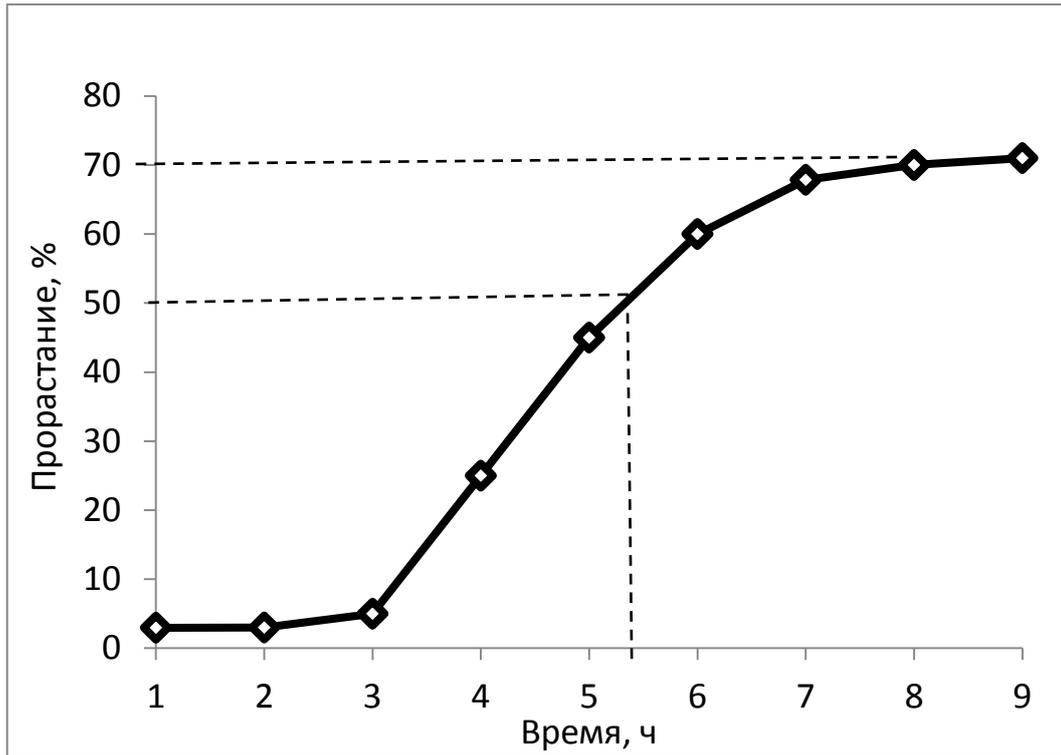


Рисунок 3.2.2.2. Изменение количества проросших конидий во времени (по отношению к общему количеству конидий).

В результате определения прорастания конидий *B. sorokiniana* в присутствии наночастиц серебра была установлена негативная ростовая реакция – уменьшение доли проросших конидий, значение EC_{50} при этом составило 30 мг/л (Рисунок 3.2.2.3.). При исследовании прорастания конидий микромицетов в присутствии в среде наночастиц TiO_2 , а также SiO_2 размерами 100-120 и 10-15 нм заметного ингибирования ростовой реакции найдено не было.

Ингибирующие свойства наночастиц в отношении ряда низших грибов объясняются в литературе с помощью различных механизмов. Так, наночастицы вследствие малых размеров, могут преодолевать клеточную стенку и, проникая через мембрану, повреждать митохондрии и рибосомы, а также вызвать конденсацию и маргинацию хроматина, приводя к апоптотической гибели клеток (Xia et al., 2016).

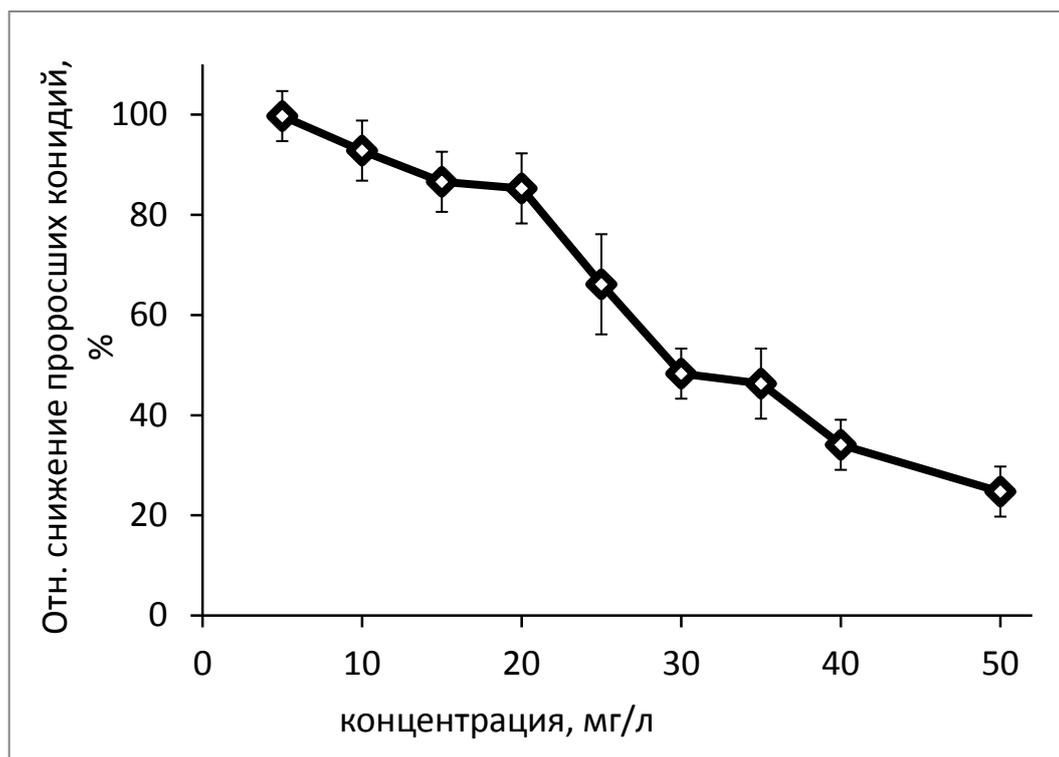


Рисунок 3.2.2.3. Изменение относительного количества проросших конидий *B. sorokiniana* в присутствии различных концентраций наносеребра

Кроме того наночастицы способны связывать транспортные белки и разрушать протонные насосы, увеличивая проницаемость белково-липидного бислоя (Kim et al., 2009). Последнее приводит к проникновению наночастиц в цитоплазму (Feng et al., 2000; Koduru et al., 2018), что в конечном итоге сопровождается нарушением ее целостности и гибели клеток (Xia et al., 2016).

Токсическое действие наночастиц серебра также может объясняться с позиций участия свободных ионов, которые, в свою очередь, тоже могут вызывать митохондриальную дисфункцию и генерировать образование АФК, что приводит к повреждению белков и нуклеиновых кислот и, наконец, ингибирует пролиферацию клеток (McShan et al., 2014; Koduru et al., 2018).

Заключение по разделу 3.2.

Проведенные исследования на культуре микроводоросли *C. vulgaris* показали, что ростовая и фотосинтетическая функции снижались в наибольшей степени под воздействием наночастиц серебра и диоксида кремния размером 100-120 нм. В присутствии наночастиц диоксида кремния размером 100-120 нм после проведения 1-часовой засветки культуры хлореллы регистрировался острый негативный эффект в изменении показателя ОПЗФ. Эффект проявлялся в уменьшении свечения при возбуждении микроводоросли светом как высокой, так и низкой интенсивности (Таблица 3.2.3.1.).

Таблица 3.2.3.1. - Показатели EC_{50} исследуемых наночастиц для одноклеточной водоросли *C. vulgaris*, мг/л.

EC_{50} , 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	_*	-	_***

«-» – Эффект не наблюдался, показатель EC_{50} определить не удалось в диапазоне концентраций до 100 мг/л (если не указано иное)

«-*» – Наблюдался слабый эффект, показатель EC_{50} определить не удалось в диапазоне концентраций до 100 мг/л.

«-**» – Наблюдался острый негативный эффект при концентрации превышающей 6 мг/л, показатель EC_{50} определить не удалось.

Интересно, что интегральный ростовой параметр (прирост) культуры водоросли оказался более чувствительным показателем по сравнению с ОПЗФ

хлорофилла к действию наночастиц. Однако чувствительность ОПЗФ увеличивалась после введения процедуры непродолжительной предварительной засветки культуры в тестируемой пробе, что может свидетельствовать о влиянии наночастиц на механизм фотосинтеза.

В результате выполнения экспериментов, в которых производили учет прорастания конидий микромицета *B. sorokiniana*, было найдено, что наночастицы диоксида титана и кремния в отношении этого объекта фунгицидных свойств не проявляли. В условиях присутствия наночастиц серебра была отмечена ответная негативная реакция микромицета, а 50%-ное подавление прорастания конидий фиксировалось при концентрации наносеребра, равной 30 мг/л.

3.3. Ферментативные системы

3.3.1. Функционирование биферментной системы с NADH:FMN-оксидоредуктазой и люциферазой

Представление о том, что в основе жизни лежит сложно организованная сопряженная деятельность многих ферментных систем, позволяет предполагать, что появление дезорганизации отдельных звеньев этой деятельности может привести к нарушению функционирования ткани или органа. Очевидно, что, по изменению активности ферментов, происходящей в присутствии наночастиц, можно судить о биохимических механизмах воздействия этих веществ на организм. В настоящее исследование включены ферменты, являющиеся представителями разных классов и выполняющие ключевые функции метаболических процессов живых организмов. Так, NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза является NADH-зависимой дегидрогеназой, которая играет важную роль в энергетическом обмене и процессе дыхания растительных и животных клеток.

При проведении биолюминесцентных анализов используют биферментную систему с NADH:FMN-оксидоредуктазой и люциферазой (реакции 1 и 2). В реакции (1) люцифераза катализирует реакцию окисления длинноцепочечных алифатических альдегидов при участии восстановленного флавинмононуклеотида, продуктом реакции является излучение света в синезеленой области спектра. Для обеспечения люциферазы восстановленным флавинмононуклеотидом применяется сопряжение люциферазной реакции с реакцией, катализируемой NADH:FMN-оксидоредуктазой (реакция 2).

люцифераза



NADH:FMN-оксидоредуктаза



Принцип люциферазных методов анализа состоит в обнаружении токсических свойств тестируемых веществ и смесей по их влиянию на биolumинесцентные ферментативные реакции. В основе биolumинесцентных тестов лежит ингибирование люциферазы компонентами анализируемых смесей, что способствует спаду интенсивности свечения (Рисунок 3.3.1.1.).

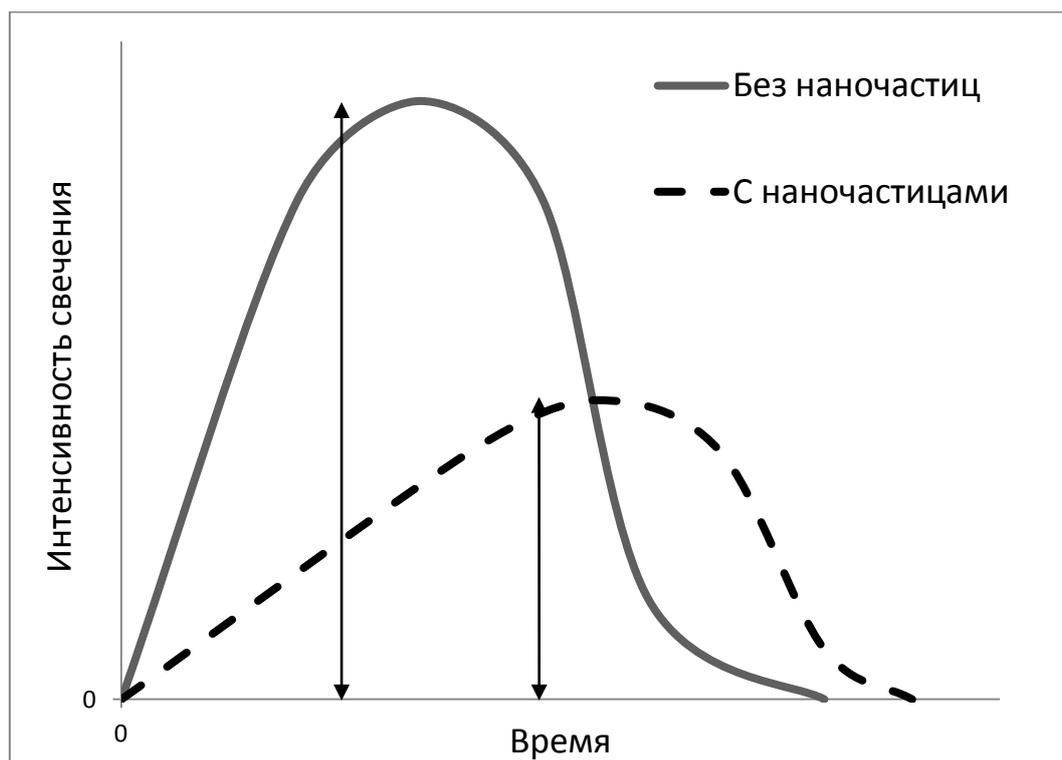


Рисунок 3.3.1.1. Схема проведения биolumинесцентного тестирования

В настоящем исследовании нами было изучено изменение интенсивности свечения биolumинесцентной системы в ответ на действие наночастиц (Есимбекова и др., 2017). Поскольку регистрация биolumинесцентного сигнала в присутствии наночастиц осуществляется оптическим способом, вначале необходимо определить абсорбционные характеристики исследуемых наночастиц во избежание искажения результатов исследования.

Известно, что максимум сигнала биolumинесценции приходится на диапазон длин волн 490 – 495 нм. В случае превышения оптической плотности суспензий исследуемых наночастиц значения $D=0,1$ в указанном диапазоне длин

волн, полученные значения биолюминесцентного сигнала необходимо умножить на коэффициент коррекции k . Коэффициенты коррекции оптических характеристик исследуемых суспензий k рассчитывают по формуле (Алешина и др., 2010):

$$k = \frac{1}{\sum_{i=1}^n \frac{g(\lambda_i)}{D_i(\lambda_i) \left(\frac{L}{l}\right)} \left[1 - \exp\left(-D_i(\lambda_i) \left(\frac{L}{l}\right)\right)\right]} \quad (9)$$

где $g(\lambda_i)$ – доля интенсивности биолюминесценции на длине волны λ_i от суммарной интенсивности биолюминесценции при оптическом пути длиной L ; $D_i(\lambda_i)$ – значение поглощения суспензий наноматериала на длине волны λ_i при оптическом пути l . Величину L принимали равной 1 см для биотестов с использованием растворимой биолюминесцентной системы.

Величина поглощения наночастиц серебра превышала показатель $D=0,1$ при концентрации выше 1,6 мг/л (Рисунок 3.3.1.2.). Так при концентрациях наносеребра, превышающих данную, была проведена корректировка биолюминесцентного анализа.

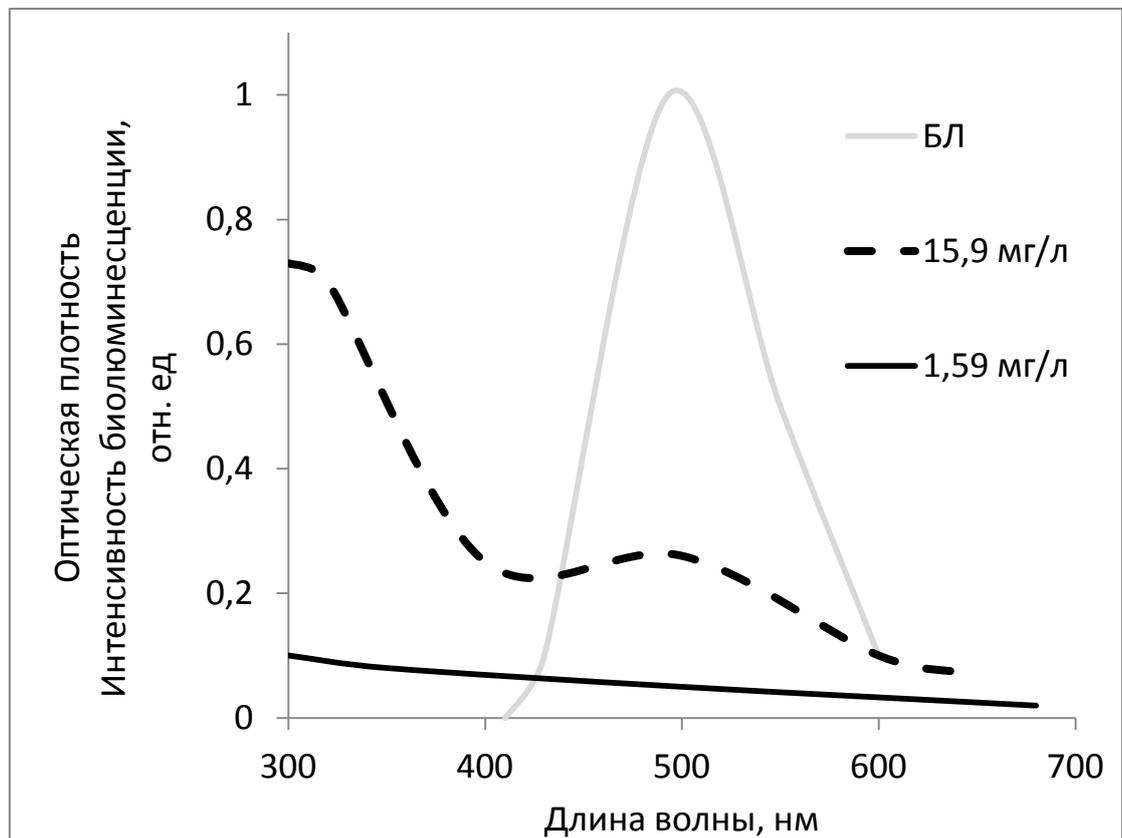


Рисунок 3.3.1.2. Спектры поглощения суспензий наночастиц серебра при концентрации 1,59 и 15,9 мг/л и нормированный спектр испускания бактериальной биолюминесценции.

Полученные спектры поглощения суспензий наночастиц диоксида титана и диоксида кремния размерами 10-15 и 100-120 нм в максимальных концентрациях, используемых в экспериментах с биолюминесцентными системами, приведены на рисунке 3.3.1.3. Оптическая плотность исследуемых суспензий наночастиц не превышала значение 0,1 в диапазоне максимума биолюминесцентной интенсивности. Следовательно, вследствие низкой поглощательной способности указанных суспензий, корректировка результатов биолюминесцентного анализа не требуется.

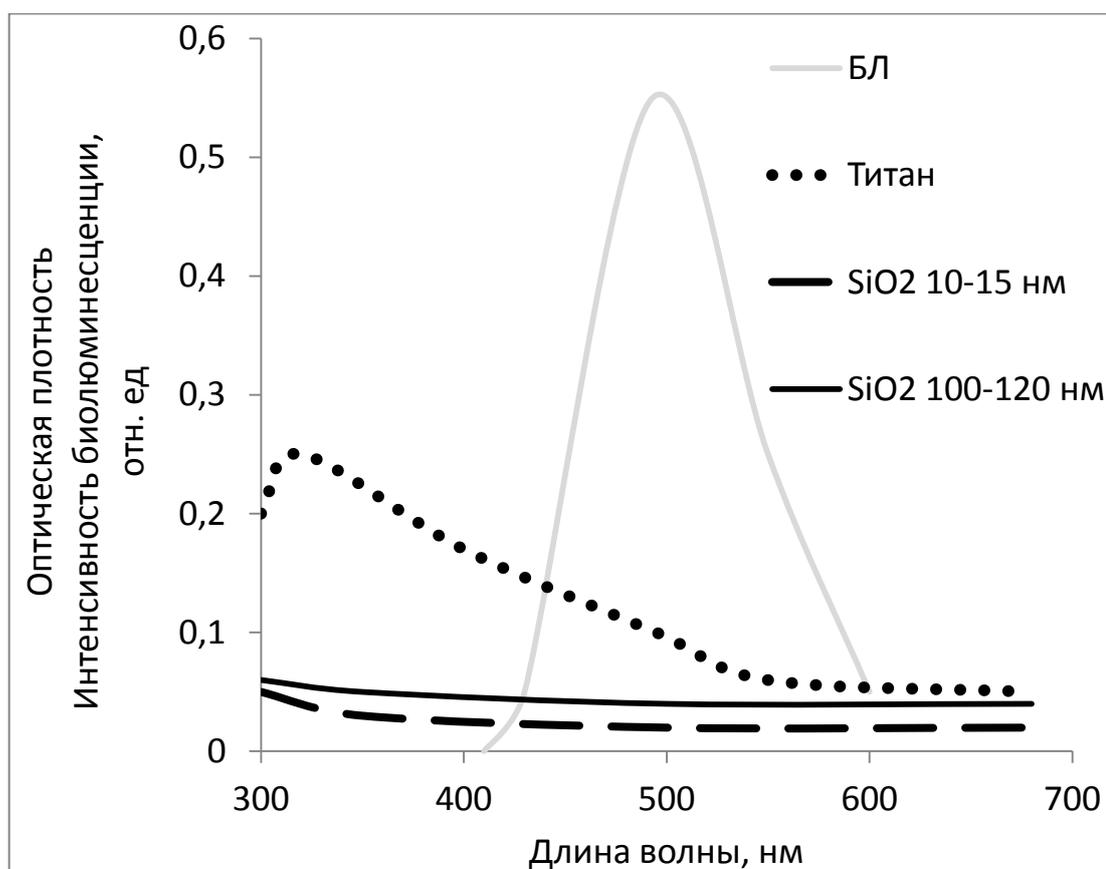


Рисунок 3.3.1.3. Спектры поглощения суспензий наночастиц диоксида титана и кремния (размерами 10-15 и 100-120 нм) и нормированный спектр испускания бактериальной биолюминесценции.

В биолюминесцентном исследовании нами был использован препарат наночастиц серебра, представляющий собой суспензию наночастиц с концентрацией 20 г/л в водном растворе NaNO_3 с концентрацией 5 г/л, синтезированных на кафедре физической и неорганической химии ИЦМиМ Сибирского федерального университета. Вначале было определено токсическое действие раствора NaNO_3 на растворимую биферментную систему светящихся бактерий. В этом случае в реакционную смесь вместо исследуемого образца добавляли 50 мкл нитрата натрия. Было показано, что раствор нитрата натрия при концентрации 5 г/л уменьшает интенсивность свечения биферментной системы на 10%, двукратное разведение раствора не оказывало воздействия на ферментную систему. Таким образом, было выяснено, что раствор нитрата натрия не влияет на результаты исследования, так как в экспериментах образцы наночастиц разбавляли в два и более раз.

На рисунке 3.3.1.4. представлены полученные экспериментальные данные по влиянию наночастиц серебра на активность биферментной системы после корректировки биолюминесцентного анализа и без него. Можно видеть, что наночастицы серебра оказывали значительный ингибирующий эффект на активность ферментов биолюминесцентной биферментной системы светящихся бактерий, показатели EC_{50} составили 17 мг/л. Поглощательная способность исследуемых наночастиц при данной концентрации не оказала существенного влияния на результат биолюминесцентного анализа.

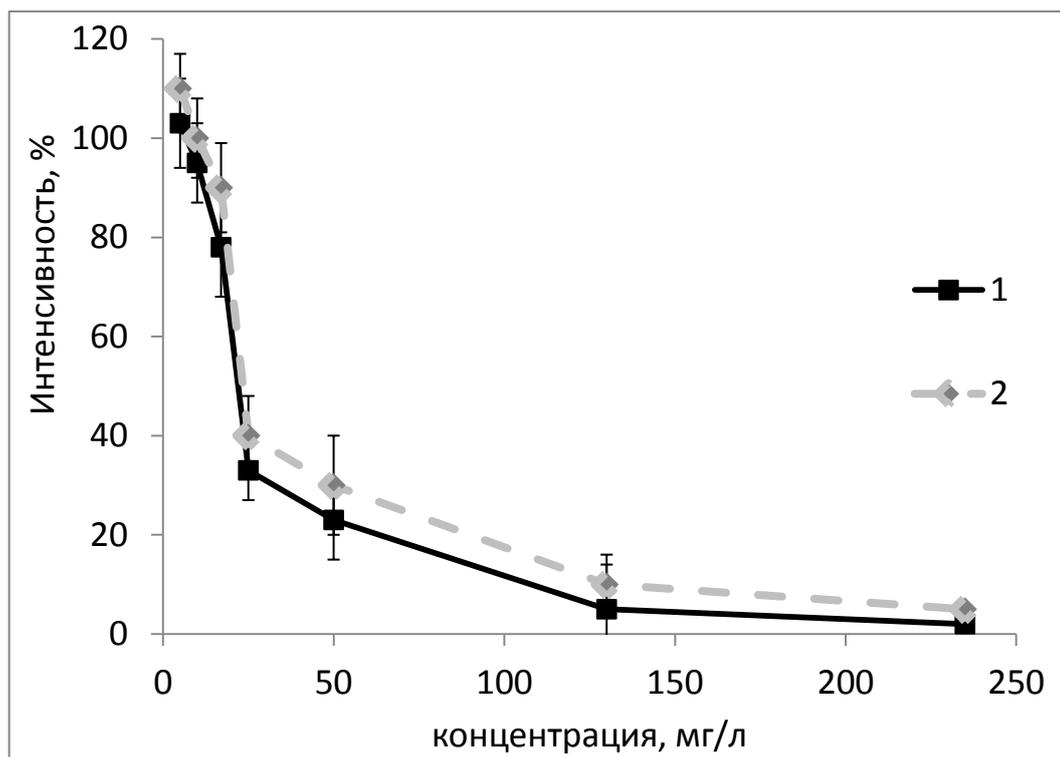


Рисунок 3.3.1.4. Зависимость остаточной интенсивности свечения биферментной системы с NADH:FMN-оксидоредуктазой и люциферазой от концентрации наночастиц серебра, 1 – экспериментальные результаты, 2 – результаты, скорректированные с учетом оптических свойств дисперсных суспензий наночастиц серебра.

При изучении суспензий наночастиц диоксида титана было найдено, что исследуемая взвесь оказывает существенное воздействие на параметры биолюминесцентной системы (Рисунок 3.3.1.5.). Так, снижение остаточного свечения биферментной системы на 50% наблюдалось при концентрации наночастиц 13 мг/л.

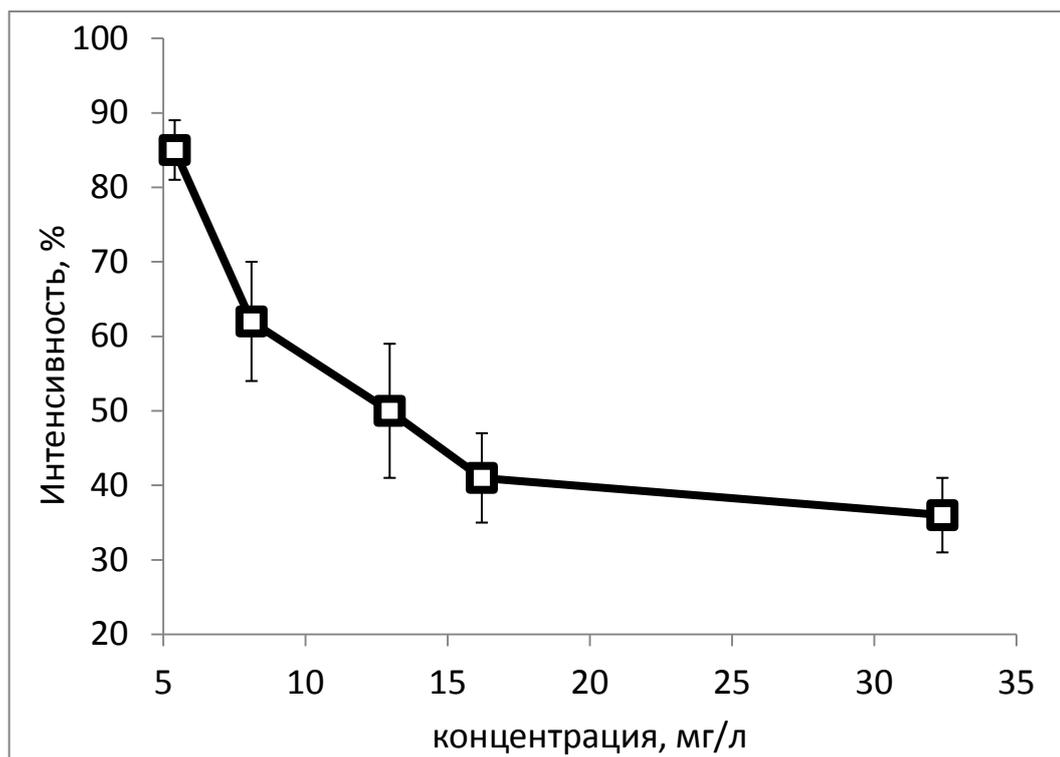


Рисунок 3.3.1.5. Зависимость остаточной интенсивности свечения биферментной системы с NADH:FMN-оксидоредуктазой и люциферазой от концентрации наночастиц TiO₂, размером 100 – 190 нм.

Наночастицы диоксида кремния размерами 100-120 нм и 10-15 нм также оказали существенное влияние на биферментную систему. Частицы диоксида кремния размером 10-15 нм вызывали 50% снижение интенсивности свечения при концентрации 216 мг/л, а частицы размером 100-120 нм при концентрации 50 мг/л (Рисунок 3.3.1.6.).

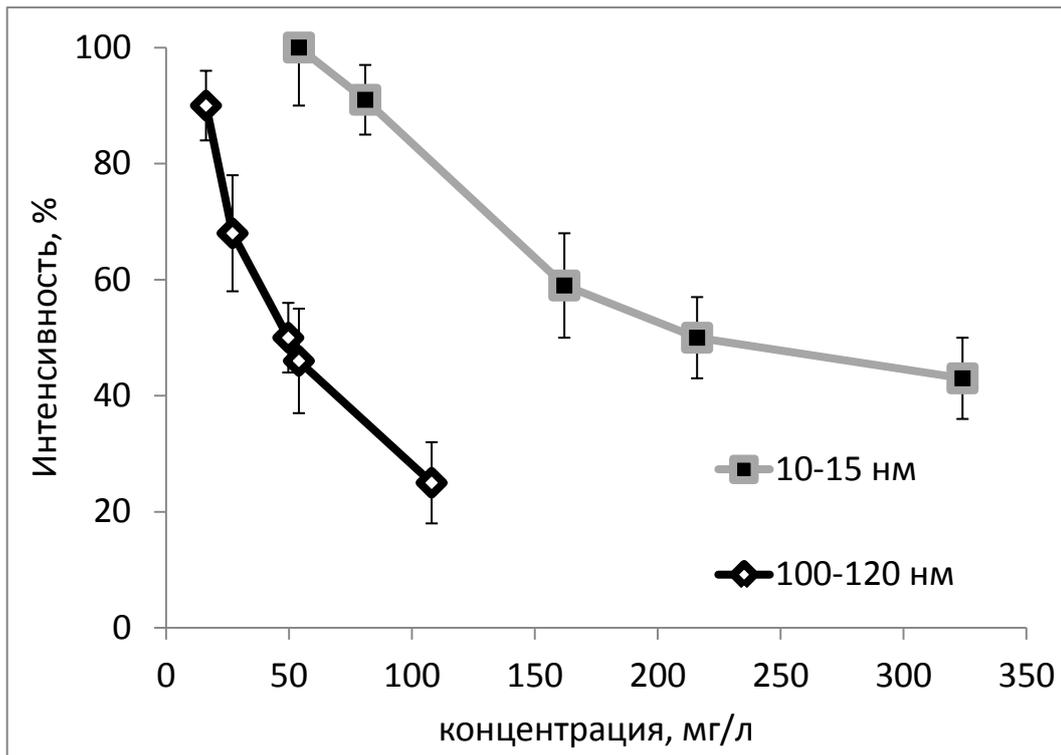


Рисунок 3.3.1.6. Зависимость остаточной интенсивности свечения биферментной системы с NADH:FMN-оксидоредуктазой и люциферазой от концентрации наночастиц SiO₂, размерами 10-15 нм и 100-120 нм.

3.3.2. Функционирование триферментной системы с трипсином

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.

Известно, что потребляемая пища подвергается ферментативному разложению в желудочно-кишечном тракте, большая часть которого принадлежит процессам, происходящим в двенадцатиперстной кишке. 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.

Трипсин расщепляет пептидные связи белков пищи между лизином и аргинином, а также активирует химоотрипсиноген путем частичного протеолиза.

В нашей работе (Esimbekova и др., 2017) было показано использование билюминесцентного метода измерения активности протеолитических ферментов для оценки воздействия пищевых добавок, которыми могут выступать, в том числе, наночастицы, на функционирование пищеварительной системы, а также для оценки риска возможного их потребления.

Анализ активности трипсина проводили билюминесцентным методом по константе спада билюминесцентной реакции. При введении в реакционную смесь протеолитических белков они осуществляют гидролиз люциферазы и NADH:FMN-оксидоредуктазы, что сопровождается резким спадом интенсивности свечения. Схема анализа представлена на рисунке 3.3.2.1.

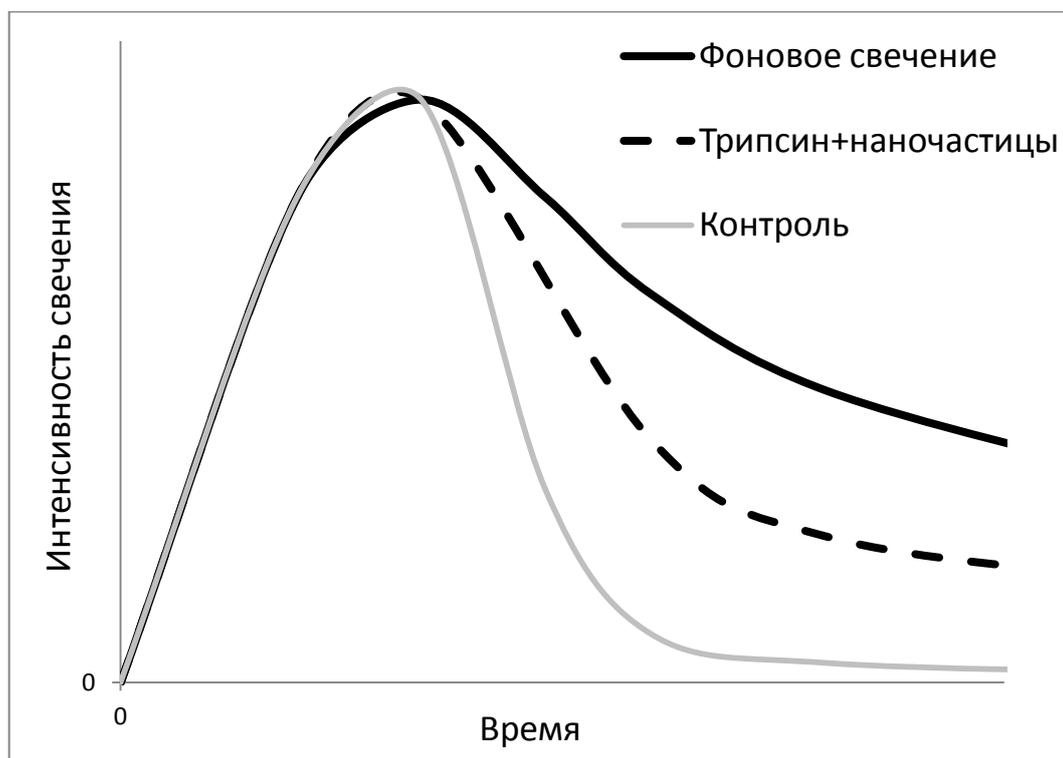


Рисунок 3.3.2.1. Схема изменения параметров билюминесцентной реакции с NADH:FMN-оксидоредуктазой и люциферазой в присутствии трипсина.

По сравнению с результатами, изложенными в предыдущем разделе о влиянии на биферментную систему, воздействие суспензий наночастиц диоксида титана и кремния на активность трипсина было выражено значительно слабее. Наночастицы TiO_2 ингибировали активность трипсина в большей степени по сравнению с наночастицами SiO_2 , показатель EC_{50} для диоксида титана составил 15 мг/л (Рисунок 3.3.2.2.). При этом для частиц кремния размером 10-15 и 100-120 нм показатели EC_{50} и EC_{20} установить в эксперименте не удалось.

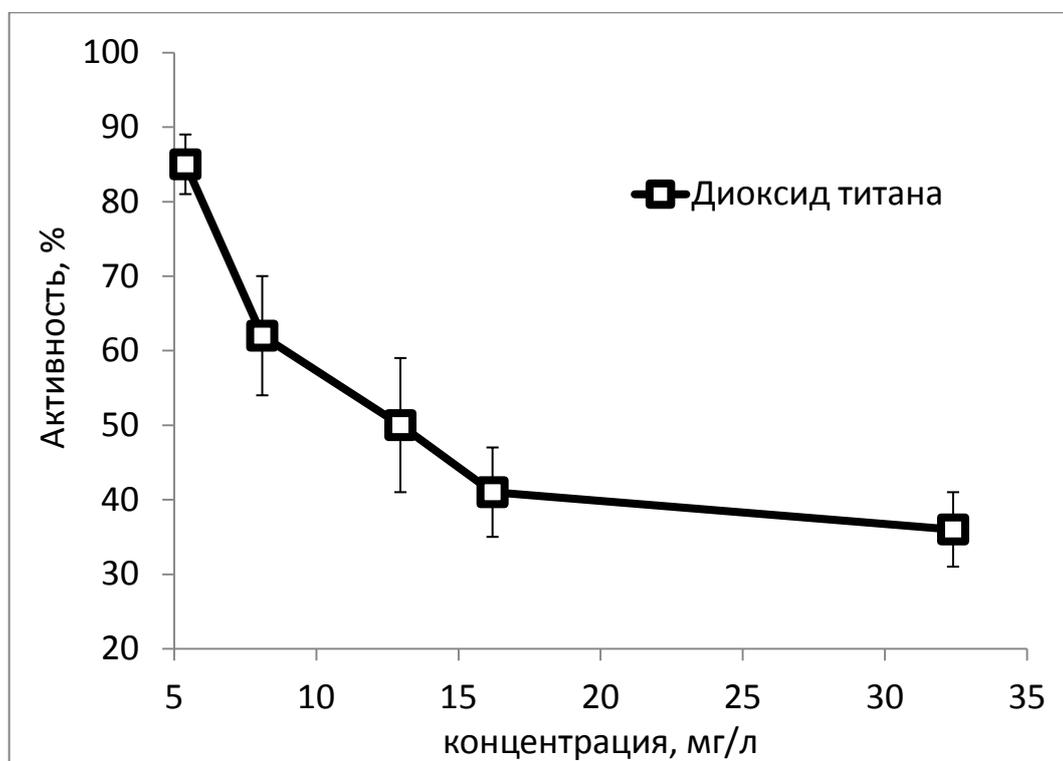


Рисунок 3.3.2.2. Изменение относительной активности трипсина в присутствии различных концентраций диоксида титана.

Выполненное нами исследование недавно было продолжено другими авторами. В бакалаврской работе Я.В. Фрицлер (науч. рук.: Е.Н. Есимбекова (2017) было показано более существенное ингибирующее воздействие наночастиц диоксида титана и кремния на фермент трипсин. Показатели EC_{50} составили 11,1 мг/л, 55,7 мг/л и 45,9 мг/л для наночастиц диоксида титана, диоксида кремния размером 10-15 и 100-120 нм соответственно. Кроме того указанными авторами

были изучены токсические свойства наночастиц серебра на примере образцов, используемых нами в настоящей работе. В итоге им удалось зарегистрировать наличие значительного ингибирующего действия наносеребра в отношении фермента трипсина, показатель EC_{50} составил 1,8 мг/л (Рисунок 3.3.2.3.).

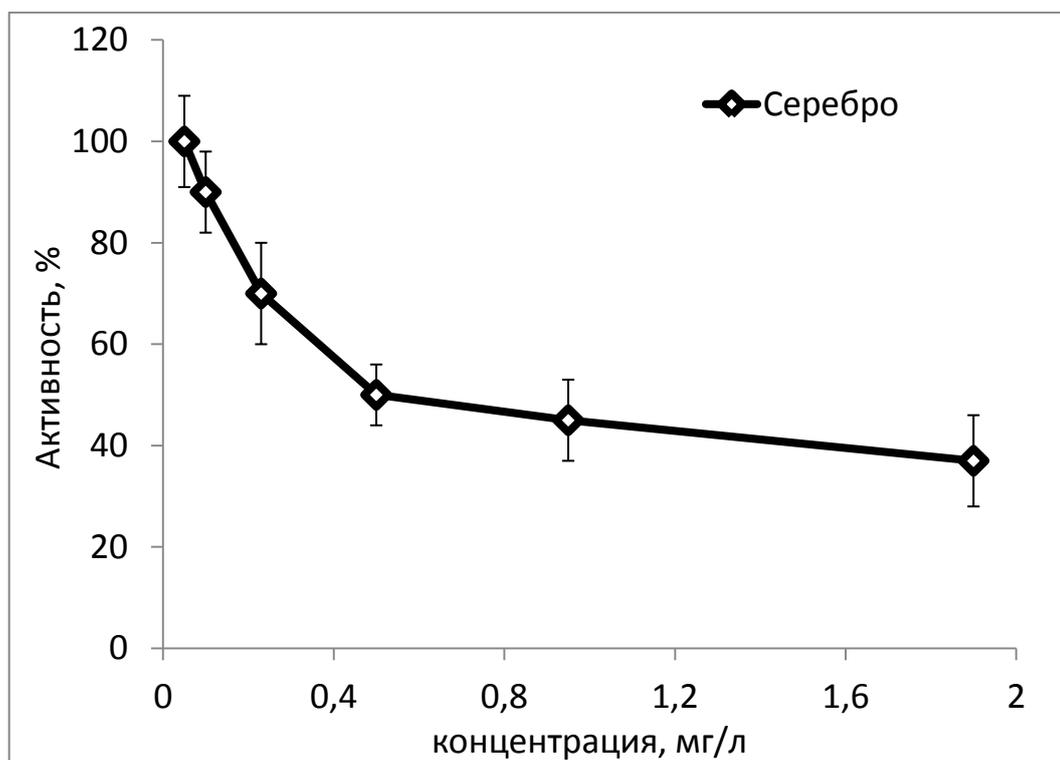


Рисунок 3.3.2.3. Изменение относительной активности трипсина в присутствии различных концентраций наночастиц серебра (Фрицлер, 2017).

Тем же коллективом авторов исследовались другие ферментативные системы при воздействии наночастиц (Фрицлер, 2017), среди них моноферментные реакции с бутерилхолинэстеразой, с алкогольдегидрогеназой, с NADH:FMN-оксидоредуктазой; биферментная реакция с NADH:FMN-оксидоредуктазой и люциферазой; трехферментная система с NADH:FMN-оксидоредуктазой, люциферазой и алкогольдегидрогеназой. В результате была установлена наибольшая чувствительность к действию наночастиц у моноферментных реакций с NADH:FMN-оксидоредуктазой и с алкогольдегидрогеназой, показатели EC_{50} для наночастиц серебра составили 0,6 и

0,9 мг/л соответственно, для диоксида титана 2,4 и 3,3 мг/л соответственно, для наночастиц диоксида кремния 10-15 нм 14,9 и 15,5 мг/л соответственно, для наночастиц диоксида кремния 100-120 нм 12,1 и 14,5 мг/л соответственно. Наиболее токсичными оказались наночастицы серебра и титана, наночастицы диоксида кремния проявляли токсическое действие на порядок ниже, и их эффект не зависел от размера частиц.

Негативная реакция ферментативных систем в ответ на присутствие наночастиц, скорее всего, была обусловлена образованием ранее упомянутой так называемой «белковой короны». Ферменты за счет ван-дер-ваальсовых и электростатических сил, стерических эффектов могут окутывать поверхность наночастиц, что способствует изменению конформации белковой молекулы и, как следствие, потерю ее активности.

Заключение по разделу 3.3.

Наночастицы серебра и титана оказали существенное ингибирующее воздействие на ферментативные системы с NADH:FMN-оксидоредуктазой и люциферазой и с трипсином (Таблица 3.3.3.1.).

Наночастицы диоксида кремния большего размера ингибировали ферментативную биферментную систему сильнее, чем частицы мелкого размера. Наиболее сильное влияние на активность трипсина оказали также наночастицы серебра (Фрицлер, 2017) и диоксида титана.

Таблица 3.3.3.1. Показатели EC_{50} исследуемых наночастиц для ферментативных биолюминесцентных систем с и трипсином, мг/л.

EC ₅₀ , мг/л	Ag	TiO ₂	SiO ₂	SiO ₂
	15-25 нм	100-190 нм	10-15 нм	100-120 нм
NADH:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза	17	13	216	50
Трипсин	*2	15	-	-

«-» – Эффект не наблюдался, показатель EC₅₀ определить не удалось в диапазоне концентраций до 1000 мг/л.

«-*» – Заимствованный показатель (Фрицлер, 2017).

ГЛАВА 4. АНАЛИЗ РЕАКЦИИ ОБЪЕКТОВ РАЗНЫХ УРОВНЕЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ

В настоящей работе проведены исследования на восьми тестовых объектах, занимающих разные экологические ниши и представляющих различные уровни биологической организации (Таблица 4.1.1.).

Таблица 4.1.1. Показатели ЕС₅₀ для всех исследуемых тест-объектов, мг/л.

Тест-объект	Тест-функция	Ag	TiO ₂	SiO ₂	
		15-25 нм	100-190 нм	10-15 нм	100-120 нм
<i>Многочелюстные организмы</i>					
<i>A. sativa</i>	Энергия прорастания	20	-	-	_*
	Масса побегов	7	_*	-	_*
	Масса корней	7	_*	_*	_*
	Длина корешка	13	90	-	_*
<i>P. ostreatus</i>	Скорость роста мицелия	14	- до 1 г/л	- до 1 г/л	- до 1 г/л
<i>N. nambi</i>		31	-	-	-
<i>C. affinis</i>	Выживаемость	0,15	- до 5 мг/л	40	11

Таблица 4.1.1. Продолжение.

Одноклеточные организмы					
<i>C. vulgaris</i>	Прирост	0,05	-* до 5 мг/л	-	8
	Состояние фотосинтетического аппарата до световой экспозиции	0,80	-	-	16
	Состояние фотосинтетического аппарата после световой экспозиции	0,11	-*	-	-**
Конидии <i>B. sorokiniana</i>	Проращивание конидий	30	-	-	-
Ферментативные системы					
NADH:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза	Интенсивность свечения билюминесцентной реакции	17	13	216	50
Активность трипсина	Константа спада билюминесцентной реакции	#2	15	- до 1 г/л	- до 1 г/л

«-» – Эффект не наблюдался, показатель EC_{50} определить не удалось в диапазоне концентраций до 100 мг/л (если не указано иное).

«-*» – Наблюдался слабый эффект, показатель EC_{50} определить не удалось в диапазоне концентраций до 100 мг/л (если не указано иное).

«-**» – Наблюдался острый негативный эффект при концентрации превышающей 6 мг/л, показатель EC_{50} определить не удалось.

#Заимствованный показатель (Фрицлер, 2017)

Для сравнения чувствительности тест-объектов был проведен ранговый дисперсионный анализ Фридмана. Для этого с целью упрощения математических расчетов вместо абсолютных значений EC_{50} использовали обратные значения. Эти

величины можно интерпретировать как уровень токсичности НЧ для тест-организмов. В тех случаях, когда EC_{50} не удавалось определить из-за слишком малой токсичности наночастиц, величина $1/EC_{50}$ принималась за 0. Дисперсионный анализ Фридмана показал, что ответные реакции исследуемых тест-объектов на воздействие наночастиц статистически значимо различаются ($p = 0,05$) (Рисунок 4.1.).

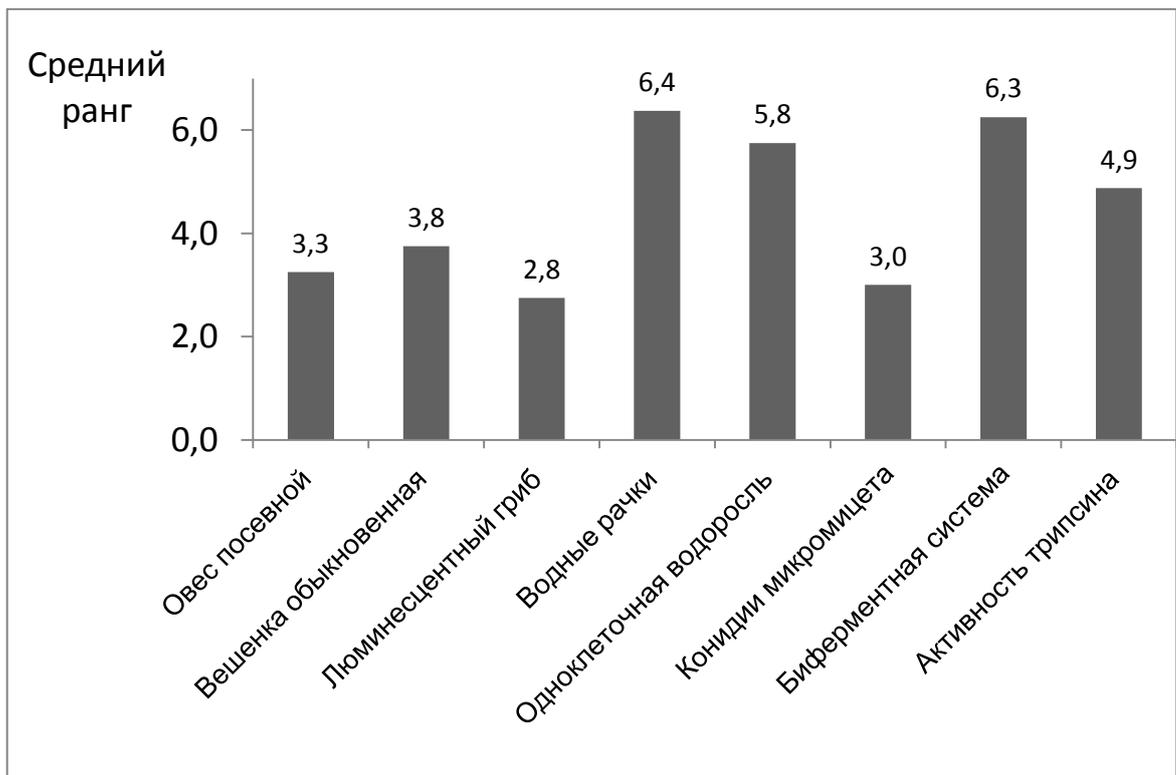


Рисунок 4.1. Диаграмма рангов чувствительности исследуемых тест-объектов к наночастицам (значение среднего ранга пропорционально чувствительности тест-объекта).

Высокая чувствительность к действию наночастиц была зарегистрирована у одноклеточной водоросли *C. vulgaris* (ранг 5,8). Однако на другой фотосинтезирующий организм овес посевной *A. sativa* наночастицы оказали гораздо меньшее воздействие (ранг 3,3). Так, 50%-ное снижение биомассы побегов у высшего растения происходило при концентрации наночастиц серебра, на порядок превышающей таковую для 50%-ного ингибирования

функционирования фотосинтетического аппарата микроводоросли, а 50%-ное падение энергии прорастания семян овса посевного наблюдалось при концентрации, в 400 раз превышающей необходимую для 50%-ного снижения прироста хлореллы. Диоксид титана и крупные наночастицы диоксида кремния оказывали существенное негативное влияние на прирост микроводоросли, в то время как реакция овса посевного в присутствии диоксида титана проявилась только в снижении длины корня. По-видимому, при воздействии рассматриваемых наночастиц на многоклеточный организм отрицательному влиянию подвергается лишь часть клеток, что может быть ликвидировано рядом компенсаторных механизмов, в то время как негативное действие на одноклеточные организмы означает повреждение всего организма (Schrimmer et al., 2013).

Водные рачки *C. affinis* подобно одноклеточной водоросли проявили высокую чувствительность к используемым в экспериментах наночастицам (ранг 6,4). Следует выделить, что поскольку глобальный выброс техногенных наночастиц происходит преимущественно в водоемы, именно представители водных экосистем находятся сегодня в опасной зоне риска. По результатам выполненной оценки функционирования очистных сооружений в заливе Сан-Франциско, концентрация наночастиц серебра в сточных водах достигает 1 мкг/л, диоксида титана и диоксида кремния 10 мкг/л (Keller and Lazareva, 2014). При этом в очищенных сточных водах концентрация диоксида титана может достигать 4 мкг/л (Gottschalk et al., 2009). Приведенные величины в 50 раз меньше значения, при котором в наших экспериментах наблюдалось 50%-ное угнетение прироста водоросли хлорелла, и в 150 раз меньше концентрации, необходимой для регистрации 50%-ного уровня выживаемости цериодафний. Однако к настоящему времени данная разница концентраций могла существенно сократиться в условиях возрастающего производства продуктов, содержащих наночастицы.

Грибы являются сравнительно устойчивыми организмами к воздействию техногенных наночастиц. 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). При этом к действию наночастиц серебра одноклеточные конидии оказались вдвое устойчивее, чем представленный многоклеточным мицелием *P. ostreatus*. Этот экспериментальный факт, по-видимому, является следствием особой морфологии конидий грибов, позволяющей выживать в экстремальных абиотических условиях, в том числе при высоких концентрациях наночастиц в окружающей среде.

Биферментная система аналогично рачкам и одноклеточной водоросли проявила высокую чувствительность к наночастицам (ранг 6,3). Более детальный анализ выявляет, что высокий средний ранг биферментной системы обусловлен чувствительностью тест-объекта ко всем исследуемым типам наночастиц, при этом уровень ответной реакции биферментной системы на каждый вид НЧ был существенно ниже. Удивительно, что, несмотря на простоту биологической организации и отсутствие компенсаторных механизмов, ферментативные системы проявили сравнительно низкую ответную реакцию к каждому типу исследуемых наночастицам. Так, уменьшение функциональной активности биферментной системы происходило при концентрации наночастиц серебра приблизительно равной значению таковой, которая была необходима для снижения энергии прорастания семян и длины корешка овса посевного, а также скорости роста мицелия вешенки обыкновенной.

Наиболее чувствительной среди ферментативных систем, оказалась система с трипсином к действию наночастиц серебра, при этом данная система оказалось нечувствительной к наночастицам диоксида кремния. К действию наночастиц диоксида титана трипсин продемонстрировал 7-кратную устойчивость по сравнению с наночастицами серебра (ранг 4,9). Выделим, что к воздействию наночастиц диоксида титана обе ферментативные системы проявили самую высокую чувствительность среди исследуемых тест-объектов. Так, наночастицы диоксида титана оказали вдвое большее влияние на биферментную систему и

систему с трипсином, чем на прирост одноклеточной водоросли, и в 6 раз большее воздействие, чем на длину корешка овса посевного. Поэтому в случае использования наночастиц диоксида титана можно отметить тенденцию падения чувствительности тест-объектов с увеличением уровня их биологической организации. Для двух других типов наночастиц аналогичной тенденции обнаружено не было. Таким образом, в целом можно заключить, что реакция различных тест-объектов в ответ на воздействие наночастиц не зависела от уровня биологической организации.

В ряде опубликованных работ также не прослеживалась зависимость чувствительности тест-объектов к наночастицам от уровня биологической организации. Так, в работе (Vazquez-Mucoz et al., 2017) на примере серебра было показано, что наночастицы проявляют почти одинаковое негативное воздействие в диапазоне концентраций от 1 до 100 мг/л независимо от выбора тест-объекта (вирусы, бактерии, микроводоросли, грибы, клетки животных и человека). Аналогичный эффект для тех же частиц был продемонстрирован в исследовании на *E. coli*, *S. aureus*, мезенхимальных стволовых клетках человека и мононуклеарных клетках периферической крови, где наночастицы проявили токсичность ко всем тест-объектам в узком диапазоне концентраций от 12,5 до 50 мг/л (Greulich, 2012).

В других работах также не было найдено зависимости ингибирующего влияния наночастиц на тест-объекты от уровня их биологической организации. При сравнении реакций одноклеточной водоросли *P. subcapitata*, двух представителей водных рачков *D. pulex*, *C. dubia*, взрослых и ювенальных особей рыбок *D. rerio* было установлено наибольшее влияние наночастиц на водных рачков (Griffitt et al., 2008). В более поздней работе была зафиксирована высокая чувствительность к наночастицам водных рачков *C. sphaericus* по сравнению с одноклеточной водорослью *R. subcapitata* и рыбками *D. rerio* (Wang et al., 2012). Спустя два года результаты подтвердились в исследовании Рибейро с коллегами (Ribeiro et al., 2014) и работе Иваска с соавторами (Ivask et al., 2014). В первом

водные рачки *D. magna* оказались самыми чувствительными тест-организмами по сравнению с одноклеточной водорослью *P. subcapitata* и рыбками *D. Rerio*; во втором рачки *D. magna* обогнали по чувствительности культуры бактерий *E. coli*, *P. fluorescens*, дрожжи *S. cerevisiae*, одноклеточную водоросль *P. subcapitata* и линии клеток фибробластов мыши.

Для сравнения уровня токсического воздействия наночастиц проведен ранговый дисперсионный анализ Фридмана также как и в предыдущем случае. Показано, что уровни токсического 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 легко образовывать ионы, как променстрировано в литературе (Kittler et al., 2010; Beer et al., 2012; Sakamoto et al., 2015; Cvjetko et al., 2017; Lubick, 2018).

Поэтому в нашем исследовании (Асанова, Полонский, 2017а, 2017б) проведено сравнение эффекта наночастиц серебра и их ионов по отношению к фотосинтезирующим организмам и инфузории *P. caudatum*. Так, в экспериментах с *C. vulgaris* при замене суспензии наночастиц на водные растворы нитрата серебра было продемонстрировано, что ионы обладают большей токсичностью по сравнению с наночастицами на два порядка. Уменьшение прироста клеток на 50% наблюдалось при концентрации нитрата серебра 0,51 мкг/л.

Можно предположить, что массовая доля ионов серебра, образующихся в растворе наночастиц, соответствует отношению значений EC₅₀ ионов серебра к EC₅₀ наночастиц. Указанное значение составляет согласно нашим расчетам около 0,7 %. Данная величина хорошо согласуется с результатом исследований,

приведенным в литературе (Zouzelka, 2016), согласно которому количество ионов в растворе составляло 6 % и 0,15% для наночастиц серебра размером 5 нм и 37 нм соответственно.

Ионная форма серебра оказала более сильное воздействие и на показатель замедленной флуоресценции по сравнению с наноразмерными частицами: величина EC_{50} снизилась также на 2 порядка. Однако в отличие от наночастиц токсический эффект ионов серебра не зависел от световой экспозиции. Показатели EC_{50} для нитрата серебра до и после 1-часовой световой засветки составили 1,2 и 1,7 мкг/л.

При исследовании семян и проростков овса также было показано существенное угнетение исследуемых показателей по сравнению с контрольными образцами. Наиболее чувствительным органом овса к ионам серебра оказался корень, значения EC_{50} составили 0,88 и 0,81 мг/л для массы и длины корня соответственно. По таким показателям как энергия прорастания и масса побегов, значения EC_{50} оказались на порядок выше и составили 9 и 6,4 мг/л соответственно.

В экспериментах с *P. caudatum* было продемонстрировано, что наночастицы серебра оказывают более сильное токсическое воздействие по сравнению с таковым их ионов: В 24-часовой экспозиции значения EC_{50} для наночастиц и ионов в отношении инфузорий составили 0,8 и 15,1 мг/л соответственно. При этом за сутки токсичность наночастиц серебра возросла почти в 17 раз. Можно предположить, что данный эффект был вызван медленным образованием в водной среде свободных ионов, которые оказывают дополнительное токсическое воздействие в условиях длительной экспозиции (Асанова, Полонский, 2017б).

Токсический эффект наночастиц и их ионов объясняется в литературе проникновением сквозь клеточную стенку и мембрану, изменением проницаемость последней, повреждением мембранные белков, нуклеиновых кислот и ферментов, индуцируя образования в клетке АФК (Park et al., 2010; Chairuangkitti et al., 2012; Hwang et al., 2012; Oukarroum et al., 2012; McShan et al.,

2014). По мнению многих авторов, наночастицы серебра, по-видимому, проявляют некоторую степень токсичности по отношению ко всем организмам и клеточным культурам (Liau et al., 1997; Zhao, Stevens, 1998; Foldbjerg et al., 2009; Chernousova, Epple, 2013).

Наночастицы диоксида титана оказали наибольшее токсическое воздействие в отношении ферментативных систем. Исследование токсичности данных наночастиц в отношении чувствительных тест-организмов *C. affinis* и *C. vulgaris* было затруднено вследствие мутности раствора до 5 мг/л. Для наночастиц диоксида титана было показано усиление токсического эффекта после 1-часовой световой засветки в отношении одноклеточной водоросли (ранг 2,1).

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 крупных частиц в отношении всех исследуемых тест-объектов. Так на примере многоклеточного организма водного рачка *C. affinis* показано, что крупные наночастицы являются в 4 раза более токсичными, чем мелкие. В случае использования в качестве тест-объекта овса посевного *A. sativa* крупные наночастицы оказывали негативный эффект (хотя и выраженный слабо) на все исследуемые ростовые показатели, в то время как токсическое влияние мелких частиц проявилось в снижении лишь массы корней. По-видимому, крупные частицы, превышающие диаметр поры клеточной стенки корней овса посевного, не могли пройти через нее и оказывали преимущественно механическое

повреждение. Последнее визуально, вероятно, проявлялось в некотором снижении массы корней и длины корешков, а также массы побегов.

Механическое повреждение клеточной стенки и мембраны микроводоросли крупными наночастицами приводило к полному разрушению клеток и их агрегации, что отразилось в существенном снижении прироста культуры и в остром токсическом эффекте, зафиксированном по активности фотосинтетического аппарата. В то же время на одноклеточную водоросль мелкие наночастицы диоксида кремния воздействия не оказали. По-видимому, они постепенно аккумулировались в клетках и оказывали негативный эффект только в длительной временной экспозиции. Поэтому заметного ростового эффекта рассматриваемых наночастиц не было выявлено по отношению к водоросли и к массе овса посевного, слабый эффект был зафиксирован только при измерении длины корешков за 7 суток.

При исследовании биферментной системы, крупные наночастицы оказались токсичнее мелких более чем в 4 раза.

Итак, в случае использования диоксида кремния установлено, что крупные наночастицы обладают более высоким ингибирующим эффектом по сравнению с мелкими частицами для объектов разных уровней биологической организации, принадлежащих различным экологическим нишам.

Описанные в литературе исследования влияния наночастиц серебра различных размеров на биологические организмы выявили повышенную токсичность более мелких частиц (Kennedy et al., 2010; Gaiser et al., 2011; Angel et al., 2013; Ivask et al., 2014;). Аналогичный эффект продемонстрирован для наночастиц диоксида титана (Gurr et al., 2005; Hund-Rinke, Simon, 2006; Sadiq et al., 2011). Однако изучение зависимости реакции тест-организмов в ответ на действие наночастиц диоксида кремния от размера последних дало противоречивые результаты. Например, на кератиноцитах мыши (Yu et al., 2009), диатомовой водоросли *P. tricornutum* и рачках *D. magna* (Clement, 2013), зеленой водоросли *C. kessler* (Fujiwara, 2008) найдено увеличение токсического эффекта

при уменьшении размера наночастиц. В то время как в других исследованиях с использованием *C. vulgaris* (Clement, 2013) и гепатоцитов человека (Lu et al., 2011) показан противоположный эффект – наночастицы крупного размера были более токсичные, чем наночастицы меньшего размера.

Резюмируя сказанное, можно отметить, что, по-видимому, токсичность наноразмерных частиц зависит в большей степени от их химической природы, чем от размера.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе был проведен анализ ответных реакций представителей разных уровней биологической организации и сред обитания на воздействие наночастиц, среди которых: овес посевной *Avena sativa*, вешенка обыкновенная *Pleurotus ostreatus*, тропический люминесцирующий гриб *Neonothopanus nambi*, водные рачки *Ceriodaphnia affinis*, одноклеточная водоросль *Chlorella vulgaris*, конидии микромицета, вызывающие корневую гниль у зерновых культур, *Bipolaris sorokiniana*, ферментативные биолюминесцентные системы с NADH:FMN-оксидоредуктазой и люциферазой, а также трипсином.

Самыми чувствительными тест-объектами к воздействию наночастиц Ag, TiO₂, SiO₂ оказались водные рачки *C. affinis*. Наиболее сильное негативное влияние оказывали наночастицы серебра. Одноклеточная водоросль *C. vulgaris* подобно водным рачкам проявила высокую чувствительность к исследуемым наночастицам. Проведенные исследования показали, что ростовая и фотосинтетическая функция снижалась в наибольшей степени также под воздействием наночастиц серебра и диоксида кремния размером 100-120 нм. Исследования характера влияния наночастиц диоксида титана выявили существенное снижение прироста, однако изменений фотосинтетической активности зарегистрировано не было. Влияния наночастиц диоксида кремния размером 10-15 нм на прирост и фотосинтетическую функцию культуры водоросли обнаружить не удалось. Для исследуемых тест-организмов наночастицы диоксида титана не были токсичными в диапазоне концентраций до 5 мг/л. В присутствии наночастиц диоксида кремния установлено снижение выживаемости исследуемых рачков, причем негативное воздействие частиц малого размера повышалось с увеличением длительности экспозиции. Таким образом, поскольку в условиях глобального загрязнения окружающей среды техногенными наночастицами происходит преимущественное их накопление в водоемах, именно представители водных экосистем находятся сегодня в опасной зоне риска.

Мицелиальная форма организмов оказалась наиболее устойчивой к действию наночастиц. Негативное влияние наносеребра на прорастание конидий микромицета *B. sorokiniana* и двух макромицетов *P. ostreatus*, *N. nambi* наблюдалось при концентрации, нехарактерной для объектов окружающей среды, влияние наночастиц диоксида титана и диоксида кремния на них отсутствовало вовсе.

Проведенные исследования на *A. sativa* показали, что наиболее сильная негативная ростовая реакция этих растений имела место в присутствии наночастиц серебра. Высокие концентрации диоксида титана способствовали снижению длины корешка и незначительному уменьшению массы побегов и корней. Крупные наночастицы диоксида кремния оказывали слабое влияние на все исследуемые ростовые функции, в то время как мелкие частицы способствовали только снижению массы корня. Было найдено, что самым чувствительным органом растений овса к воздействию наночастиц серебра является корень.

Ферментативные системы, используемые в работе, проявили примерно такую же чувствительность как и высшее растение *A. sativa*, несмотря на простоту их биологической организации и отсутствие компенсаторных механизмов. Наиболее чувствительной среди ферментативных систем, оказалась система с трипсином к действию наночастиц серебра. На биферментную систему оказывали влияние все исследуемые в работе наночастицы, однако чувствительность к наночастицам серебра была у нее в 9 раз ниже по сравнению с активностью трипсина. К воздействию наночастиц диоксида титана обе ферментативные системы проявили самую высокую чувствительность, среди исследуемых тест-объектов. Таким образом, реакция различных тест-объектов в ответ на воздействие наночастиц не зависела от уровня биологической организации.

Среди использованных в экспериментах трех видов наночастиц наносеребро оказалось наиболее токсичным для всех исследуемых биологических объектов. Так, снижение длины корешка наблюдалось при концентрации

наночастицы серебра в 7 раз меньше, чем при концентрации наночастиц диоксида титана, в то время как наночастицы диоксида кремния оказывали лишь слабое влияние. Наночастицы серебра вызывали снижение прироста микроводоросли и выживаемости водных рачков при концентрации соответственно в 160 и 73 раза меньшей, чем крупные наночастицы диоксида кремния. Более высокая токсичность наночастиц серебра по сравнению с другими наночастицами была показана и в отношении биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза и люцифераза. В то же время на ферментативную систему с трипсином наночастицы серебра и диоксида титана оказали примерно равное влияние.

При сравнении влияния наночастиц диоксида кремния размерами 10-15 нм и 100-120 нм на организмы, представляющие разные уровни биологической организации, была установлена более высокая токсичность последних. Так, на примере многоклеточного организма водного рачка *C. affinis* было продемонстрировано, что крупные наночастицы являются в четыре раза более токсичными, чем мелкие. В случае использования в качестве тест-объекта овса посевного *A. sativa* крупные наночастицы диоксида кремния оказывали эффект на все исследуемые ростовые показатели, в то время как токсическое действие мелких частиц проявилось лишь в снижении массы корней. Воздействие на *C. vulgaris* крупными наночастицами приводило к значительному снижению прироста культуры и активности фотосинтетического аппарата. В то же время мелкие наночастицы воздействия на одноклеточную водоросль не оказали. При исследовании биферментной системы крупные наночастицы диоксида кремния оказались токсичнее мелких частиц более чем в четыре раза. Таким образом, на примере диоксида кремния, используя широкий набор тест-объектов, впервые найдено, что крупные наночастицы обладают более высокой токсичностью, чем мелкие.

Полученные в настоящем исследовании результаты позволяют продвинуться в понимании токсичности окружающей среды, загрязненной наноматериалами, для различных организмов, отличающихся уровнями

биологической организации и имеющих различные места обитания. Данная работа способствует более адекватной оценке экологических рисков в условиях возрастающего неконтролируемого объема использования наносодержащих потребительских продуктов. Высокая чувствительность водных рачков *C. affinis* и микроводоросли *C. vulgaris* делает их весьма перспективными тест-объектами для проведения оперативного мониторинга сред загрязненных наночастицами.

ОБЩИЕ 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.

ЛИТЕРАТУРА

Асанова^а, А.А. Воздействие наночастиц серебра на фотосинтезирующие организмы / **А.А. Асанова, В.И. Полонский** // Достижения науки и техники АПК. – 2017. – №. 8. – С. 12-15.

Асанова^б, А.А. Выживаемость равноресничных инфузорий (*Paramecium caudatum*) в присутствии наночастиц и ионов серебра / **А.А. Асанова, В.И. Полонский** // Проблемы агрохимии и экологии. – 2017. – №. 4. – С. 60-62.

Асанова, А.А. Воздействие техногенных наночастиц на выживаемость ракообразных *Ceriodaphnia affinis* / **А.А. Асанова, В.И. Полонский** // EurasiaScience: Материалы XVIII Международной научно-практической конференции 15 декабря 2018. – Москва: Научно-издательский центр Актуальность. РФ. – 2018. – Т.1. – С. 48-49.

Асанова, А.А. Оценка токсичности техногенных наночастиц с использованием водоросли *Chlorella vulgaris* / **А.А. Асанова, В.И. Полонский, Ю.С. Григорьев** // Toxicological Review. – 2017. – Т. 145. – №. 4. – С. 50-54.

Асанова, А.А. Фунгистатическая активность техногенных наночастиц / **А.А. Асанова, В.И. Полонский, Н.С. Мануковский, С.В. Хижняк** // Российские нанотехнологии. – 2018. – №. 6. – С. 62-66 (**Asanova, A.A.,** Fungistatic Activity of Engineered Nanoparticles / **A.A. Asanova, V.I. Polonskiy, N.S. Manukovsky., S.V. Khizhnyak** // Nanotechnologies in Russia. – 2018. – V. 13. – No. 5–6. – P. 277–280).

Асанова А.А. Некоторые токсикологические характеристики наночастиц диоксида кремния / **А.А. Асанова, В.И. Полонский** // Проблемы агрохимии и экологии. – 2019. – №. 2. – С. 71-78.

Алешина, Е.С. Коррекция результатов биолюминесцентного анализа с учетом оптических свойств исследуемых углеродных наноматериалов/ **Е.С. Алешина** //Вестник Оренбургского государственного университета. - 2010. - № 6. - С. 141-145.

Анциферова, И.В. Источники поступления наночастиц в окружающую среду /**И.В. Анциферова** //Вестник Пермского национального исследовательского

политехнического университета. Машиностроение, материаловедение. – 2012. – Т. 14. – №. 2.

Артамонова, С.Ю. Наночастицы, детектируемые в талой воде снежного покрова г. Новосибирска и прилегающей территории /С.Ю. Артамонова, С.Н. Дубцов, Г.Г. Дульцева //Интерэкспо Гео-Сибирь. – 2016. – Т. 3. – №. 3.

Астафурова, Т.П. Влияние наночастиц диоксида титана и оксида алюминия на морфофизиологические параметры растений /Т.П. Астафурова, Ю.Н. Моргалёв, А.П. Зотикова, Г.С. Верхотурова, С.И. Михайлова, А.А. Буренина, Г. В. Боровикова //Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2011. – №. 1. – С.13.

Барановский, И. Удобрительные смеси с участием осадков сточных вод на дерново-подзолистых почвах /И. Барановский //Молочнохозяйственный вестник. – 2017. – №. 3. – С. 27.

Бутова, С.Н., Перспективы использования нанотехнологии в косметике / С.Н. Бутова, Н.Т. Елошвили // Идентификация фальсифицированных пищевых продуктов. Контроль содержания и безопасности наночастиц в продукции сельского хозяйства и пищевых продуктах: Междунар. науч.-практ. конф. ГОУ ВПО «МГУПП». – М., 2009. – С. 21–27.

Вардуни, Т.В. Влияние наночастиц диоксида титана на рост и развитие томата (*Lycopersicon Esculentum*) в культуре *in vitro* / Т.В. Вардуни, М.М. Серeda, О.А. Капралова, В.А. Чохели, В.М. Вардуни, Е.И. Шиманская // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – №. 6. – С. 268-268.

Волкова, Н.Е. Использование очищенных сточных вод в крыму: опыт прошлого, реалии настоящего / Н.Е. Волкова, Р.Ю. Захаров // Научный журнал Российского НИИ проблем мелиорации. – 2017. – №. 3. – С. 144-159.

Гелашвили, Д. Принципы и методы экологической токсикологии: учебное пособие /Д. Гелашвили, В. Безель, Е. Романова, М. Безруков, А. Силкин, А. Нижегородцев. – Нижний новгород: Изд-во Нижегородского госуниверситета, 2016. – 705 с.

Голохваст^а, К.С. Анализ нано- и микрочастиц в снеге г. Уссурийск / К.С. Голохваст, Е.В. Соболева, П.А. Никифоров, Н.К. Христофорова, А.Н. Гульков // Вода: химия и экология. – 2012. – №. 11. – С. 108-112.

Голохваст^б, К.С. Гранулометрический анализ взвешенных микрочастиц в атмосферных осадках г. Хабаровск / К.С. Голохваст, Е.А. Алейникова, П.А. Никифоров, А.Н. Гульков, Н.К. Христофорова // Вода: химия и экология. – 2012. – №. 6. – С. 117-122.

Голохваст, К.С. Гранулометрический анализ взвешенных частиц в снеге г. Биробиджана и государственного заповедника «Бастак» / К.С. Голохваст, И.Л. Ревуцкая, Е.С. Лонкина, П.А. Никифоров, А.Н. Гульков, Н.К. Христофорова // Вода: Химия и Экология. – 2013. – №. 2. – С. 116-123.

Горбунова, Н.А. Риски и безопасность использования нанотехнологий пищевых продуктов: обзор / Н.А. Горбунова, Е.К. Туниева // Теория и практика переработки мяса. – 2016. – Т. 1. – №. 3. – С. 35-48.

Григорьев, Ю.С. Способ биотестирования токсичности вод и водных растворов / Ю.С. Григорьев, А.А. Андреев, И.С. Кравчук, П.И. Гекк // Патент РФ на изобретение № 2482474, опубл. 20.05.2013. Бюл. № 14.

Дементьев, В.В. Биосорбция ²⁴¹Am из раствора и его биохимическое фракционирование в мицелии макромицетов / В. В. Дементьев, Т.А. Зотина, Н.С. Мануковский, Г.С. Калачева, А.Я. Болсуновский // Радиохимия. – Т. 57. – № 6. 2015. – С. 564-567.

Дубовской, А.Н. Распределение нано- и микромасштабных частиц в атмосферных коричневых облаках / А.Н. Дубовской, Л.М. Перник, С.И. Попель // Антропогенная трансформация природной среды: материалы Международной конференции под ред. проф. С.А. Бузмакова, 18 – 21 октября 2010 г. – Пермь: Пермский государственный университет – Т.1. – № 1. – 2010. – С. 276.

Есимбекова, Е.Н. Биолюминесцентный метод токсикологической оценки наноматериалов / Е.Н. Есимбекова, Е.В. Немцева, М.А. Кириллова, А.А. Асанова, В.А. Кратасюк // Доклады Академии наук. – 2017. – Т. 472. – №. 5. – С. 596-599.

Извекова, Ю.Н. Вихревые процессы с участием мелкодисперсных частиц в атмосфере земли и их экологические проявления / Ю.Н. Извекова, С.И. Попель // Антропогенная трансформация природной среды. – 2010. – Т. 1. – №. 1. – С. 321-328.

Куликова, А.Х. Применение осадков сточных вод в качестве удобрения в сельском хозяйстве Ульяновской области / А.Х. Куликова, Н.Г. Захаров, Т.В. Починова // Агрехимический вестник. – 2010. – №. 5. – С. 32-36.

Макаров, Д.В. Экологическая безопасность нанопорошков / Д.В. Макаров // Вестник КРАУНЦ. Физико-математические науки. – 2013. – Т. 6. – №. 1. – С. 73-80.

Медведев, О.Ю. Нанотехнологии и упаковка продовольственных товаров /О.Ю. Медведев, В.А. Платонов // Актуальные проблемы потребительского рынка товаров и услуг: материалы межрегиональной научно-практической конференции, 25 декабря 2009 года под ред. И.В. Шешунова, С.А. Дворянского, Л.Н. Зоной, И.В. Горевой – Киров: ГОУ ВПО Кировская государственная медицинская академия. – 2009. – С. 113.

Мичукова, М.В. Области использования культуры *Daphnia magna* Str /М.В. Мичукова, А.В. Канарский, З.А. Канарская //Вестник Казанского технологического университета. – 2007. – №. 3-4. – С. 109-126.

Моргалев, Ю.Н. Методика определения индекса токсичности нанопорошков, изделий из наноматериалов, нанопокровов, отходов и осадков сточных вод, содержащих наночастицы, по изменению оптической плотности тест - культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) / Ю.Н. Моргалев, Т.Г. Моргалева, Ю.С. Григорьев // Свидетельство об аттестации МВИ № 4-10 от 27.04.2010. ФР.1.39.2010.09103. – 2010. – 34 с.

МР 1.2.2522-09. Выявление наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека. Методические рекомендации.– М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. М.: – 2009. – 49 с.

МР 1.2.2566-09. Оценка безопасности наноматериалов *in vitro* и в модельных системах *in vivo*: Методические рекомендации. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. М.: – 2009. – 69 с.

МР 2.1.7.2297-07. Обоснование класса опасности отходов производства и потребления по фитотоксичности. М.: – 2007. – 7 с.

МУ 1.2.2520-09. Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. М.: – 2009. – 37 с.

МУ 1.2.2634-10. Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза. Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. М.: – 2010. – 58 с.

Онищенко, Г., Арчаков А., Бессонов В., Бокитько Б., Гинцбург А., Гмошинский И., Покровский В. Методические подходы к оценке безопасности наноматериалов / Г. Онищенко, А. Арчаков, В. Бессонов, Б. Бокитько, А. Гинцбург, И. Гмошинский, В. Покровский // Российская академия медицинских наук министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации. – 2007. – 7 с.

ОЭСР (Организации экономического сотрудничества и развития) – Рабочая группа по промышленным наноматериалам [Электронный ресурс]: офиц. сайт : <http://www.oecd.ru>

Петушков, В.Н. Способ определения активности протеаз /В.Н. Петушков, В.А. Кратасюк, А.М. Фиш, И.И. Гительзон // Авт.свид. N 1027615, 1983. – БИ № 25. – С.159.

ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04 / Т 16.1:2:2.3:3.7-04. Методика измерений оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления. М.: – 2014. – 18 с.

ПНД Ф Т 14.1:2:4.16-09 /Т 16.1:2.3:3.14-09. Методика измерений относительного показателя замедленной флуоресценции культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления. М.: – 2014. – 26 с.

Полонский^а, В.И. Оценка воздействия наночастиц диоксида титана на живые организмы / В.И. Полонский, **А.А. Асанова** // Теоретические проблемы экологии. – 2018. – №. 3. – С. 5-11.

Полонский^б, В.И. Влияние наночастиц серебра на биологические объекты / В.И. Полонский, **А.А. Асанова** // Вестник КрасГАУ. – 2018. – №. 6. – С. 271-276.

Раздорский, В.Ф. Архитектоника растений / В.Ф. Раздорский. – М.: Советская наука. – 1955. – 433 с.

РД.118-02-90. Методическое руководство по биотестированию воды. М.: Гос. комитет СССР по охране природы. М.: – 1990. – 51 с.

Роснано. Годовой отчет акционерного общества за 2015 год [электронный ресурс]: URL: http://www.rusnano.com/upload/images/normativedocs/ROSNANO-AO_Annual_Report_2015_RUS.pdf (дата обращения: 10.04.2018).

Сизова, Е.А. Источники поступления наноматериалов в окружающую среду / Е.А. Сизова, Е.А. Кожевникова, С.А. Леднева // Центр научного сотрудничества «Интерактив плюс». – 2016. – 14 с.

ТК 441 «Нанотехнологии». [Электронный ресурс]: URL: <http://www.vniinmash.ru/activities/folder-tk-441.html> (дата обращения: 10.04.2018).

Тодоренко, Д.А. Изучение токсичности сульфата меди и наночастиц серебра с использованием флуоресценции микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* / Д.А. Тодоренко, Д.Н. Маторин, А.А. Алексеев, Д.И. Тунгатарова, В.С. Орлова // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. – 2014. – №. 1. – С. 25-32.

Федорович, К.П. Анализ нано-и микрочастиц, содержащихся в снеге г. Владивосток / К.П. Федорович, Г.А. Нефедович // Вода: химия и экология. – 2011. – №. 9. – С. 81-85.

ФР.1.39.2007.03221. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодovitости цериодафний. М.: «АКВАРОС». – 2007. – 47 с.

Фрицлер, Я.В. Анализ ингибирующего воздействия наноматериалов на активность ряда ферментов / Я.В. Фрицлер (науч.рук. Е.Н. Есимбекова): бакалаврская выпускная работа – Сибирский федеральный университет. – 2017. – 53 с.

Юрин, В.М. Наноматериалы и растения: взгляд на проблему / В.М. Юрин, О.В. Молчан // Труды БГУ. – 2015. – Т. 10. – №. часть 1. – С. 9-12.

Юркова, И.Н. Влияние наночастиц серебра на ростовые процессы пшеницы / И.Н. Юркова, А.В. Омельченко, И.А. Бугара // Вестник ВСГУТУ. – 2014. – №. 1. – С. 69-73.

Adams, L.K. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions / L.K. Adams, D.Y. Lyon, P. Alvarez // Water research. – 2006. – V. 40. – No. 19. – P. 3527-3532.

Albuquerque, P. Assessment and control of nanoparticles exposure in welding operations by use of a Control Banding Tool / P. Albuquerque, J. Gomes, C. Pereira, R. Miranda // Journal of Cleaner Production. – 2015. – V. 89. – P. 296-300.

Al-Kattan, A. Characterization of materials released into water from paint containing nano-SiO₂ / A. Al-Kattan, A. Wichser, R. Vonbank, S. Brunner, A. Ulrich, S. Zuin, B. Nowack // Chemosphere. – 2015. – V. 119. – P. 1314-1321.

Allen, N.S. Photocatalytic surfaces: environmental benefits of Nanotitania / N.S. Allen, M. Edge, J. Verran, L. Caballero, C. Abrusci, J. Stratton, C. Bygott // The Open Materials Science Journal. – 2009. – V. 3. – No. 7. – P. 6-27.

Alongi, J. A comparative analysis of nanoparticle adsorption as fire-protection approach for fabrics / J. Alongi, J. Tata, F. Carosio, G. Rosace, A. Frache, G. Camino // *Polymers*. – 2014. – V. 7. – No. 1. – P. 47-68.

Amiano, I. Acute toxicity of nanosized TiO₂ to *Daphnia magna* under UVA irradiation / I. Amiano, J. Olabarrieta, J. Vitorica, S. Zorita // *Environmental toxicology and chemistry*. – 2012. – V. 31. – No. 11. – P. 2564-2566.

Angel, B. The impact of size on the fate and toxicity of nanoparticulate silver in aquatic systems / B. Angel, G. Batley, C. Jarolimek, N. Rogers // *Chemosphere*. – 2013. – V. 93. – No. 2. – P. 359-365.

Anjali, D. Effect of silver nanoparticles on growth of eukaryotic green algae / D. Anjali, P. Anand, R. Bansh, K. Sunil, D. Debabrata // *Nano-Micro Letters*. – 2012. – V. 4. – No. 3. – P. 158-165.

Aruoja, V. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* / V. Aruoja, H.-C. Dubourguier, K. Kasemets, A. Kahru // *Science of the total environment*. – 2009. – V. 407. – No. 4. – P. 1461-1468.

Asghari, S. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna* / S. Asghari, S. Johari, J. Lee, Y. Kim, Y. Jeon, H. Choi, M. Moon, I. Yu // *Journal of nanobiotechnology*. – 2012. – V. 10. – No. 1. – P. 14.

Ayatallahzadeh Shirazi, M. Toxicity Effects of SiO₂ Nanoparticles on Green Micro-Algae *Dunaliella Salina* / M. Ayatallahzadeh Shirazi, F. Shariati, Z. Ramezanpour // *International Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. – 2016. – V. 12. – No. 4. – P. 269-275.

Bacchetta, R. Chronic toxicity effects of ZnSO₄ and ZnO nanoparticles in *Daphnia magna* / R. Bacchetta, N. Santo, M. Marelli, G. Nosengo, P. Tremolada // *Environmental research*. – 2017. – V. 152. – P. 128-140.

Baker, S. Nanoagroparticles emerging trends and future prospect in modern agriculture system / S. Baker, T. Volova, S. Prudnikova, S. Satish, N. Prasad // *Environmental toxicology and pharmacology*. – 2017. – V. 53. – P. 10-17.

Banfield, J.F. Nanoparticles in the environment / J.F. Banfield, H. Zhang // *Reviews in mineralogy and geochemistry*. – 2001. – V. 44. – No. 1. – P. 1-58.

Barrena, R. Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles / R. Barrena, E. Casals, J. Colon, X. Font, A. Sanchez, V. Puentes // *Chemosphere*. – 2009. – V. 75. – No. 7. – P. 850-857.

Batley, G. Fate and risks of nanomaterials in aquatic and terrestrial environments / G. Batley, J. Kirby, M. McLaughlin // *Accounts of Chemical Research*. – 2012. – V. 46. – No. 3. – P. 854-862.

Beer, C. Toxicity of silver nanoparticles — nanoparticle or silver ion? / C. Beer, R. Foldbjerg, Y. Hayashi, D. Sutherland, H. Autrup // *Toxicology letters*. – 2012. – V. 208. – No. 3. – P. 286-292.

Benn, T. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics / T. Benn, P. Westerhoff // *Environmental science & technology*. – 2008. – V. 42. – No. 11. – P. 4133-4139.

Bhuvaneshwari, M. Dietary transfer of zinc oxide particles from algae (*Scenedesmus obliquus*) to daphnia (*Ceriodaphnia dubia*) / M. Bhuvaneshwari, V. Iswarya, S. Vishnu, N. Chandrasekaran, A. Mukherjee // *Environmental research*. – 2018. – V. 164. – P. 395-404.

Biswas, P. Nanoparticles and the environment / P. Biswas, C. Y. Wu // *Journal of the Air & Waste Management Association*. – 2005. – V. 55. – No. 6. – P. 708-746.

Blaser, S. Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: contribution of nano-functionalized plastics and textiles / S. Blaser, M. Scheringer, M. MacLeod, K. Hungerbühler // *Science of the total environment*. – 2008. – V. 390. – No. 2-3. – P. 396-409.

Blinova, I. Toxicity of two types of silver nanoparticles to aquatic crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus* / I. Blinova, J. Niskanen, P. Kajankari, L. Kanarbik, A. Kakinen, H. Tenhu, A. Kahru // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2013. – V. 20. – No. 5. – P. 3456-3463.

Bondarenko, O. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review / O. Bondarenko, K. Juganson, A. Ivask, K. Kasemets, M. Mortimer, A. Kahru // Archives of toxicology. – 2013. – V. 87. – No. 7. – P. 1181-1200.

Braydich-Stolle, L. Crystal structure mediates mode of cell death in TiO₂ nanotoxicity / L. Braydich-Stolle, N. Schaeublin, R. Murdock, J. Jiang, P. Biswas, J. John, M. Saber // Journal of Nanoparticle Research. – 2009. – V. 11. – No. 6. – P. 1361-1374.

Bundschuh, M. Do titanium dioxide nanoparticles induce food depletion for filter feeding organisms? A case study with *Daphnia magna* / M. Bundschuh, R. Vogt, F. Seitz, R. Rosenfeldt, R. Schulz // Environmental Pollution. – 2016. – V. 214. – P. 840-846.

Callaghan, N.I. Ecophysiological perspectives on engineered nanomaterial toxicity in fish and crustaceans / N.I. Callaghan, T.J. MacCormack // Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. – 2017. – V. 193. – P. 30-41.

Carbone, M. Silver nanoparticles in polymeric matrices for fresh food packaging / M. Carbone, D. Donia, G. Sabbatella, R. Antiochia // Journal of King Saud University-Science. – 2016. – V. 28. – No. 4. – P. 273-279.

Cardinale, B.J. Effects of TiO₂ nanoparticles on the growth and metabolism of three species of freshwater algae / B.J. Cardinale, R. Bier, C. Kwan // Journal of Nanoparticle Research. – 2012. – V. 14. – No. 8. – P. 913.

Castiglione, M. The effects of nano-TiO₂ on seed germination, development and mitosis of root tip cells of *Vicia narbonensis* L and *Zea mays* L / M. Castiglione, L. Giorgetti, C. Geri, R. Cremonini // Journal of Nanoparticle Research. – 2011. – V. 13. – No. 6. – P. 2443-2449.

Chairuangkitti, P. Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways / P. Chairuangkitti, S. Lawanprasert, S.

Roytrakul, S. Aueviriyavit, D. Phummiratch, K. Kulthong, R. Maniratanachote // *Toxicology in vitro*. – 2013. – V. 27. – No. 1. – P. 330-338.

Chernousova, S. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal / S. Chernousova, M. Epple // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2013. – V. 52. – No. 6. – P. 1636-1653.

Cho, W. Comparative absorption, distribution, and excretion of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles after repeated oral administration / W. Cho, B. Kang, J. Lee, J. Jeong, J. Che, S. Seok // *Particle and fibre toxicology*. – 2013. – V. 10. – No. 1. – P. 9.

Clement, L.A. Toxicity assessment of silica nanoparticles, functionalised silica nanoparticles, and HASE-grafted silica nanoparticles / L.A. Clement // *Science of the total environment*. – 2013. – P. 120-128.

Colman, B. Emerging contaminant or an old toxin in disguise? Silver nanoparticle impacts on ecosystems / B. Colman, B. Espinasse, C. Richardson, C. Matson, G. Lowry, D. Hunt // *Environmental science & technology*. – 2014. – V. 48. – No. 9. – P. 5229-5236.

Connolly, M. Comparative cytotoxicity study of silver nanoparticles (AgNPs) in a variety of rainbow trout cell lines (RTL-W1, RTH-149, RTG-2) and primary hepatocytes / M. Connolly, M. Fernandez-Cruz, A. Quesada-Garcia, L. Alte, H. Segner, J. Navas // *International journal of environmental research and public health*. – 2015. – V. 12. – No. 5. – P. 5386-5405.

Consumer Product Inventory [Электронный ресурс]: офиц. сайт. URL: <http://www.nanotechproject.org/cpi/products/>, дата обращения: 10 апреля 2018 года.

Contado, C. Nanomaterials in consumer products: a challenging analytical problem / C. Contado // *Frontiers in chemistry*. – 2015. – V. 3. – P. 48.

Cvjetko, P. Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots / P. Cvjetko, A. Milosic, A. Domijan, I. Vrcek, S. Tolic, P. Stefanic, B. Balen // *Ecotoxicology and environmental safety*. – 2017. – V. 137. – P. 18-28.

Dalai, S. Acute toxicity of TiO₂ nanoparticles to *Ceriodaphnia dubia* under visible light and dark conditions in a freshwater system / S. Dalai, S. Pakrashi, N. Chandrasekaran, A. Mukherjee // PLoS One. – 2013. – V. 8. – No. 4. – P. e62970

DailyTechInfo. Экология. [Электронный ресурс]. – М.: В Китае начато создание климатической системы, которая увеличит количество осадков на миллиарды кубических метров, 6 апреля 2018. – Режим доступа: <https://www.dailytechinfo.org/eco/10135-v-kitae-nachato-sozdanie-klimaticheskoy-sistemy-kotoraya-uvelichit-kolichestvo-osadkov-na-milliardy-kubicheskih-metrov.html>

Deng, Y. Interactions between engineered nanomaterials and agricultural crops: implications for food safety / Y. Deng, J.C. White, B. Xing // Journal of Zhejiang University SCIENCE A. – 2014. – V. 15. – No. 8. – P. 552-572.

Duhan, J. Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture / J. Duhan, R. Kumar, N. Kumar, P. Kaur, K. Nehra, S. Duhan // Biotechnology Reports. – 2017. – V. 15. – P. 11-23.

Duncan, T.V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors / T.V. Duncan // Journal of colloid and interface science. – 2011. – V. 363. – No. 1. – P. 1-24.

El-Temsah Y. Impact of Fe and Ag nanoparticles on seed germination and differences in bioavailability during exposure in aqueous suspension and soil / Y. El-Temsah, E. Joner // Environmental toxicology. – 2012. – V. 27. – No. 1. – P. 42-49.

Esimbekova, E.N. Inhibition effect of food preservatives on endoproteinases / E.N. Esimbekova, A.A. Asanova, A.A. Deeva, V.A.Kratasyuk // Food chemistry. – 2017. – V. 235. – P. 294-297.

Evanoff, D.D. Synthesis and optical properties of silver nanoparticles and arrays / D.D. Evanoff, G. Chumanov // Chemphyschem. – 2005. – V. 6. – P. 1221–1231.

EPA (Environmental Protection Agency) - Американское агентство по охране окружающей среды [Электронный ресурс]: офиц. сайт: URL: <http://www.EPA.gov>.

Farkas⁶, J. Uptake and effects of manufactured silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill cells / J. Farkas, P. Christian, J. Gallego-Urrea, N.

Roos, M. Hasselov, K. E. Tollefsen, K. Thomas // *Aquatic Toxicology*. – 2011. – V. 101. – No. 1. – P. 117-125.

Farkas, J. Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes / J. Farkas, P. Christian, J. Gallego-Urrea, N. Roos, M. Hasselov, K. E. Tollefsen, K. Thomas // *Aquatic Toxicology*. – 2010. – V. 96. – No. 1. – P. 44-52.

Farkas^a, J. Characterization of the effluent from a nanosilver producing washing machine / J. Farkas, H. Peter, P. Christian, J. Urrea, M. Hasselov, J. Tuoriniemi, K. Thomas // *Environment international*. – 2011. – V. 37. – No. 6. – P. 1057-1062.

Feizi, H. Impact of bulk and nanosized titanium dioxide (TiO₂) on wheat seed germination and seedling growth / H. Feizi, P. Moghaddam, N. Shahtahmassebi, A. Fotovat // *Biological trace element research*. – 2012. – V. 146. – No. 1. – P. 101-106.

Feng, Q. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* / Q. Feng, J. Wu, G. Chen, F. Cui, T. Kim, J. Kim // *Journal of biomedical materials research*. – 2000. – V. 52. – No. 4. – P. 662-668.

Firestone, M. Harvesting materials formed under extreme conditions: Synthesis and isolation of nanocarbons derived from detonation of high explosives / M. Firestone, B. Ringstrand, R. Huber, D. Dattelbaum, R. Gustavson, D. Podlesak // *APS Meeting Abstracts*. – 2016.

Flegler, S.L. Ultrastructural and cytochemical changes in the basidiomycete dolipore septum associated with fruiting / S.L. Flegler, G.R. Hooper, W.G. Fields // *Canadian Journal of Botany*. – 1976. – V. 54. – No. 19. – P. 2243-2253.

Foldbjerg, R. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes / R. Foldbjerg, P. Olesen, M. Hougaard, D. Dang, H.J. Hoffmann, H. Autrup // *Toxicology letters*. – 2009. – V. 190. – No. 2. – P. 156-162.

Forster, H. Separation of nanoparticles: Filtration and scavenging from waste incineration plants / H. Forster, T. Thajudeen, C. Funk, W. Peukert // Waste Management. – 2016. – V. 52. – P. 346-352.

Fujiwara, K.S. H. Size-dependent toxicity of silica nanoparticles to *Chlorella kessleri* / K.S. Fujiwara // Journal of Environmental Science and Health. – 2008. – No. 43. – P. 1167–73.

Funck, J. Behavioural and physiological responses of *Gammarus fossarum* (*Crustacea Amphipoda*) exposed to silver / J. Funck, M. Danger, E. Gismondi, C. Cossu-Leguille, F. Guerold, V. Felten // Aquatic toxicology. – 2013. – V. 142. – P. 73-84.

Gaiser, B. Effects of silver and cerium dioxide micro-and nano-sized particles on *Daphnia magna* / B.Gaiser, A. Biswas, P. Rosenkranz, M. Jepson, J. Lead, V. Stone, T. Fernandes // Journal of Environmental Monitoring. – 2011. – V. 13. – No. 5. – P. 1227-1235.

George, S. Surface defects on plate-shaped silver nanoparticles contribute to its hazard potential in a fish gill cell line and zebrafish embryos / S. George, S. Lin, Z. Ji, C. Thomas, L. Li, M. Mecklenburg, J. Hohman // ACS nano. – 2012. – V. 6. – No. 5. – P. 3745-3759.

Glover, C. Physiological interactions of silver and humic substances in *Daphnia magna*: effects on reproduction and silver accumulation following an acute silver challenge / C. Glover, C. Wood // Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. – 2004. – V. 139. – P. 273–280.

Gopinath, P. Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis / P. Gopinath, S. Gogoi, P. Sanpui, A. Paul, A. Chattopadhyay, S. Ghosh // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2010. – V. 77. – No. 2. – P. 240-245.

Gottschalk, F. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions / F. Gottschalk, T. Sonderer, R. Scholz, B. Nowack // Environmental science & technology. – 2009. – V. 43. – No. 24. – P. 9216-9222.

Greulich, C. The toxic effect of silver ions and silver nanoparticles towards bacteria and human cells occurs in the same concentration range / C. Greulich, D. Braun, A. Peetsch, J. Diendorf, B. Siebers, M. Epple, M. Koller // Rsc Advances. – 2012. – V. 2. – No. 17. – P. 6981-6987.

Griffitt, R. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms / R. Griffitt, J. Luo, J. Gao, J.-C. Bonzongo, D. Barber // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2008. – V. 27. – No. 9. – P. 1972-1978.

Gruere, G.P. Implications of nanotechnology growth in food and agriculture in OECD countries / G.P. Gruere // Food Policy. – 2012. – V.37. – No. 2. – P. 191-198.

Gurr, J.-R. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells / J.-R. Gurr, A. Wang, C.-H. Chen, K.-Y. Jan // Toxicology. – 2005. – V. 213. – No. 1-2. – P. 66-73.

Harris, E.H. The Chlamydomonas sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use / E.H. Harris // Elsevier. – 2013.

Hazani, A.A. Ecotoxicity of Ag-nanoparticles on two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* / A.A. Hazani, M.M. Ibrahim, A.I. Shehata, G.A. El-Gaaly, M. Daoud, D. Fouad, H. Rizwana, N. Moubayed // Arch Biol Sci. – 2013. – V. 65. – P. 1447-1457.

Hedberg, J. Sequential studies of silver released from silver nanoparticles in aqueous media simulating sweat, laundry detergent solutions and surface water / J. Hedberg, S. Skoglund, M. Karlsson, S. Wold, I. Odnevall Wallinder, Y. Hedberg // Environmental science & technology. – 2014. – V. 48. – No. 13. – P. 7314-7322.

Heinlaan, M. Changes in the *Daphnia magna* midgut upon ingestion of copper oxide nanoparticles: a transmission electron microscopy study / M. Heinlaan, A. Kahru, K. Kasemets, B. Arbeille, G. Prensier, H. Dubourguier // Water research. – 2011. – V. 45. – No. 1. – P. 179-190.

Henglein, A. Colloidal silver nanoparticles: photochemical preparation and interaction with O₂, CCl₄, and some metal ions / A. Henglein // *Chemistry of Materials*. – 1998. – V. 10. – No. 1. – P. 444-450.

Hirakawa, K. Photo-irradiated titanium dioxide catalyzes site specific DNA damage via generation of hydrogen peroxide / K. Hirakawa, M. Mori, M. Yoshida, S. Oikawa, S. Kawanishi // *Free radical research*. – 2004. – V. 38. – No. 5. – P. 439-447.

Hodges, C.F. Comparative total and proportional rate of germination of *Bipolaris sorokiniana* and *Curvularia geniculata* conidia is influenced by culture age and temperature / C. F. Hodges // *Mycopathologia*. – 1975. – V. 57. – No. 1. – P. 9–14.

Hossain, Z. Plant responses to nanoparticle stress / Z. Hossain, G. Mustafa, S. Komatsu // *International journal of molecular sciences*. – 2015. – V. 16. – No. 11. – P. 26644-26653.

Hund-Rinke, K. Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO₂) on algae and daphnids (8 pp) / K. Hund-Rinke, M. Simon // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2006. – V. 13. – No. 4. – P. 225-232

Hussain, S.M. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells / S.M. Hussain, K.L. Hess, J.M. Gearhart, K.T. Geiss, J.J. Schlager // *Toxicology in vitro*. – 2005. – V. 19. – No. 7. – P. 975-983.

Hwang, I. Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals / I. Hwang, J. Lee, J. Hwang, K.-J. Kim, D. Lee // *The FEBS journal*. – 2012. – V. 279. – No. 7. – P. 1327-1338.

Iswarya, V. Combined toxicity of two crystalline phases (anatase and rutile) of titania nanoparticles towards freshwater microalgae: *Chlorella sp* / V. Iswarya, M. Bhuvaneshwari, S-A. Alex, S. Iyer, G. Chaudhuri, P-T. Chandrasekaran, G. Bhalerao, S. Chakravarty, A. Raichur. Chandrasekaran N., Mukherjee A. // *Aquatic Toxicology*. – 2015. – V. 161. – C. 154-169.

Iswarya, V. Individual and binary toxicity of anatase and rutile nanoparticles towards *Ceriodaphnia dubia* / V. Iswarya, M. Bhuvaneshwari, N. Chandrasekaran, A. Mukherjee // *Aquatic Toxicology*. – 2016. – V. 178. – P. 209-221.

Ivask, A. Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells *in vitro* / A. Ivask, I. Kurvet, K. Kasemets, I. Blinova, V. Aruoja, S. Suppi, H. Vija, A. Kaminen, T. Titma, M. Heinlaan, M. Visnapuu, D. Koller, V. Kisand, A. Kahru // *PloS one*. – 2014. – V. 9. – No. 7. – P. e102108.

Jain, P. Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter / P. Jain, T. Pradeep // *Biotechnology and bioengineering*. – 2005. – V. 90. – No. 1. – P. 59-63.

Ji, J. Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella sp* / J. Ji, Z. Long, D. Lin // *Chemical Engineering Journal*. – 2011. – V. 170. – No. 2-3. – P. 525-530.

Juganson, K., Ivask A., Blinova I., Mortimer M., Kahru A. NanoE-Tox: New and in-depth database concerning ecotoxicity of nanomaterials / K. Juganson, A. Ivask, I. Blinova, M. Mortimer, A. Kahru // *Beilstein journal of nanotechnology*. – 2015. – V. 6. – P. 1788.

Kaegi, R. Release of silver nanoparticles from outdoor facades / R. Kaegi, B. Sinnet, H. Zuleeg, E. Hagedorfer, R. Mueller, R. Vonbank, M. Boller, M. Burkhardt // *Environmental pollution*. – 2010. – V. 158. – No. 9. – P. 2900-2905.

Kaegi, R. Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment / R. Kaegi, A. Ulrich, B. Sinnet, R. Vonbank, A. Wichser, S. Zuleeg, M. Boller // *Environmental pollution*. – 2008. – V. 156. – No. 2. – P. 233-239.

Kalbassi, M. Particle size and agglomeration affect the toxicity levels of silver nanoparticle types in aquatic environment / M. Kalbassi, S. Johari, M. Soltani, I. Yu // *Ecopersia*. – 2013. – V. 1. – No. 3. – P. 273-290.

Kasproicz, M. The effect of silver nanoparticles on phytopathogenic spores of *Fusarium culmorum* / M. Kasproicz, M. Koziół, A. Gorczyca // *Canadian Journal of Microbiology*. – 2010. – V. 56. – No 3. – P. 247–253.

Katsumiti, A. Mechanisms of toxicity of Ag nanoparticles in comparison to bulk and ionic Ag on mussel hemocytes and gill cells / A. Katsumiti, D. Gilliland, I. Arostegui, M.P. Cajaraville // *PloS one*. – 2015. – V. 10. – No. 6. – P. e0129039.

Keller, A. Predicted releases of engineered nanomaterials: from global to regional to local / A. Keller, A. Lazareva // Environmental Science & Technology Letters. – 2013. – V. 1. – No. 1. – P. 65-70.

Keller, A. Global life cycle releases of engineered nanomaterials / A. Keller, S. McFerran, A. Lazareva, S. Suh // Journal of Nanoparticle Research. – 2013. – V. 15. – No. 6. – P. 1692.

Kennedy, A.J. Fractionating nanosilver: importance for determining toxicity to aquatic test organisms / A.J. Kennedy, M.S. Hull, A.J. Bednar, J.D. Goss, J.C. Gunter, J.L. Bouldin, P.J. Vikesland, J.A. Steevens // Environmental science & technology. – 2010. – V. 44. – No. 24. – P. 9571-9577.

Kessler, R. Engineered nanoparticles in consumer products: understanding a new ingredient / R. Kessler // Environmental health perspectives. – 2011. – V. 119. – No. 3. – P. A120.

Khot, L. Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: a review / L. Khot, S. Sankaran, J. Maja, R. Ehsani, E. Schuster // Crop protection. – 2012. – V. 35. – P. 64-70.

Kim, J. Antimicrobial effects of silver nanoparticles / J. Kim, E. Kuk, K. Yu, S. Park, H. Lee, S. Kim, Y. Park, Y. Park, C. Hwang, Y. Kim, Y. Lee, D. Jeong, M. Cho // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. – 2007. – V. 3. – No. 1. – P. 95-101.

Kim, J. Preparation of biodegradable polymer / silver nanoparticles composite and its antibacterial efficacy / J. Kim, J. Lee, S. Kwon, S. Jeong // Journal of nanoscience and nanotechnology. – 2009. – V. 9. – No. 2. – P. 1098-1102.

Kim, K. Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes / K. Kim, W. Sung, S. Moon, J. Choi, J. Kim, D. Lee // J Microbiol Biotechnol. – 2008. – V. 18. – No. 8. – P. 1482-1484.

Kim, K. Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO₂ nanoparticles according to size fraction / K. Kim, S. Klaine, J. Cho, S. Kim., S. Kim // Science of the Total Environment. – 2010. – V. 408. – No. 10. – P. 2268-2272.

Kittler, S. Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions / S. Kittler, C. Greulich, J. Diendorf, M. Koller, M. Epple // *Chemistry of Materials*. – 2010. – V. 22. – No. 16. – P. 4548-4554.

Klaine, S. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects / S. Klaine, P. Alvarez, G. Batley, T. Fernandes, R. Handy, D. Lyon, J. Lead // *Environmental toxicology and chemistry*. – 2008. – V. 27. – No. 9. – P. 1825-1851.

Koduru, J. Phytochemical-assisted synthetic approaches for silver nanoparticles antimicrobial applications: A review / J. Koduru, S. Kailasa, J. Bhamore, K. Kim, T. Dutta, K. Vellingiri // *Advances in colloid and interface science*. – 2018.

Kratasyuk, V.A. The use of bioluminescent biotests for study of natural and laboratory aquatic ecosystems / V.A. Kratasyuk, E.N. Esimbekova, M.I. Gladyshev, E.B. Khromichuk, A.M. Kuznetsov, E.A. Ivanova // *Chemosphere*. – 2001. – V. 42. – No. 8. – P. 909-915.

Kuamri, M. In Vivo Nanotoxicity Assays in Plant Models / M. Kuamri, V. Ernest, A. Mukherjee, N. Chandrasekaran // *Nanotoxicity*. – 2012. – V. 926. – P. 399-410.

Kunniger, T. Release and environmental impact of silver nanoparticles and conventional organic biocides from coated wooden facades / T. Kunniger, A. Gerecke, A. Ulrich, A. Huch, R. Vonbank, M. Heeb, M. Faller // *Environmental pollution*. – 2014. – V. 184. – P. 464-471.

Kurepa, J. Uptake and distribution of ultrasmall anatase TiO₂ Alizarin red S nanoconjugates in *Arabidopsis thaliana* / J. Kurepa, T. Paunesku, S. Vogt, H. Arora, B.M. Rabatic, J. Lu, M. Wanzer, G. Woloschak, J. Smalle // *Nano letters*. – 2010. – V. 10. – No. 7. – P. 2296-2302.

Kwon, H. Large-Scale Synthesis and Medical Applications of Uniform-Sized Metal Oxide Nanoparticles / H. Kwon, K. Shin, M. Soh, H. Chang, J. Kim, J. Lee, T. Hyeon // *Advanced materials* – 2018. – P. 24.

Larue, C. Investigation of titanium dioxide nanoparticles toxicity and uptake by plants / C. Larue, H. Khodja, N. Herlin-Boime, F. Brisset, A. Flank, B. Fayard, S.

Chaillou, M. Carriere // Journal of Physics: Conference Series. – IOP Publishing. – 2011. – V. 304. – No. 1. – P. 012057.

Lee, C. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana* / C. Lee // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2010. – No 29. – P. 669–675.

Lee, J. A. Biokinetics of food additive silica nanoparticles and their interactions with food components / J.A. Lee, M.K. Kim, J.H. Song, M.R. Jo, J. Yu, K.M. Kim, S.J. Choi // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2017. – V. 150. – P. 384-392.

Lee, W. Evidence of three-level trophic transfer of quantum dots in an aquatic food chain by using bioimaging / W. Lee, Y. An // Nanotoxicology. – 2015. – V. 9. – No. 4. – P. 407-412.

Lee, W. Trophic transfer of gold nanoparticles from *Euglena gracilis* or *Chlamydomonas reinhardtii* to *Daphnia magna* / W. Lee, S. Yoon, Y. Shin, Y. An // Environmental pollution. – 2015. – V. 201. – P. 10-16.

Liau, S. Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups: relationship to the antibacterial action of silver ions / S. Liau, D. Read, W. Pugh, J. Furr, A. Russell // Letters in applied microbiology. – 1997. – V. 25. – No. 4. – P. 279-283.

Lin, B.-S. Effect of TMS (nanostructured silicon dioxide) on growth of Changbai larch seedlings / B.-S. Lin., S.-Q. Diao, C.-H. Li, L.-J. Fank, S.-C. Qiao, M.N Yu // Journal of Forestry Research – 2004. – No.15. – P. 138–140.

Lin, D. The influence of dissolved and surface-bound humic acid on the toxicity of TiO₂ nanoparticles to *Chlorella sp* / D. Lin, J. Ji, Z. Long, K. Yang, F. Wu // Water research. – 2012. – V. 46. – No. 14. – P. 4477-4487.

Lin, S. Uptake, translocation, and transmission of carbon nanomaterials in rice plants / S. Lin, J. Reppert, Q. Hu, J.S. Hudson, M.L. Reid, T.A. Ratnikova, A.M. Rao, H. Luo, P.C. Ke // Small. – 2009. – V. 5. – No. 10. – P. 1128-1132.

Lin, W. In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells / W. Lin, Y. Huang, X. Zhou, Y. Ma // Toxicology and applied pharmacology. – 2006. – V. 217. – No. 3. – P. 252-259.

Liu, J. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids / J. Liu, R. Hurt // *Environmental science & technology*. – 2010. – V. 44. – No. 6. – P. 2169-2175.

Liu, R. Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions / R. Liu, R. Lal // *Science of the total environment*. – 2015. – V. 514. – P. 131-139.

Liu, C. Foliar application of two silica sols reduced cadmium accumulation in rice grains / C. Liu, F. Li, C. Luo, X. Liu, S. Wang, T. Liu, T. Li, X. Li // *J. Hazard. Mater.* – 2009. – No. 161. – P. 1466–1472.

Lok, C.-N. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles / C.-N. Lok, C.-M. Ho, R. Chen, Q.-Y. He, W.-Y. Yu, H. Sun, C.-M. Che // *Journal of Proteome Research*. – 2006. – V. 5. – No. 4. – P. 916–924.

Lombi, E. Silver speciation and release in commercial antimicrobial textiles as influenced by washing / E. Lombi, E. Donner, K.G. Scheckel, R. Sekine, C. Lorenz, N. Von Goetz, B. Nowack // *Chemosphere*. – 2014. – V. 111. – P. 352-358.

Long, T. Veronesi Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity / T. Long, N. Saleh, R. Tilton, G. Lowry // *Environmental science & technology*. – 2006. – V. 40. – No. 14. – P. 4346-4352.

Lorenz, C. Characterization of silver release from commercially available functional (nano) textiles / C. Lorenz, L. Windler, N. Von Goetz, R. P. Lehmann, M. Schuppler, K. Hungerbühler, B. Nowack // *Chemosphere*. – 2012. – V. 89. – No. 7. – P. 817-824.

Lovern, S.B. Electron microscopy of gold nanoparticle intake in the gut of *Daphnia magna* / S.B. Lovern, H.A. Owen, R. Klaper // *Nanotoxicology*. – 2008. – V. 2. – P. 43–48

Lu, P. Analysis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in cosmetics / P. Lu, S. Huang, Y. Chen, L. Chiueh, D. Shih // *Journal of food and drug analysis*. – 2015. – V. 23. – No. 3. – P. 587-594.

Lu, X. In vitro cytotoxicity and induction of apoptosis by silica nanoparticles in human HepG2 hepatoma cells / X. Lu, J. Qian, H. Zhou, Q. Gan, W. Tang, J. Lu // International journal of nanomedicine. – 2011. – V. 6. – P. 1889.

Lubick, N. Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles or both? / N. Lubick // Environmental Science & Technology. – 2008. – P. 8617

Lv, X. Mechanisms underlying the acute toxicity of fullerene to *Daphnia magna*: Energy acquisition restriction and oxidative stress / X. Lv, B. Huang, X. Zhu, Y. Jiang, B. Chen, Y. Tao, J. Zhou, Z. Cai // Water Research. – 2017. – V. 123. – P. 696-703.

Ma, C. Metal-based nanotoxicity and detoxification pathways in higher plants / C. Ma, J. White, O. Dhankher, B. Xing // Environmental science & technology. – 2015. – V. 49. – No. 12. – P. 7109-7122.

Ma, X. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation / X. Ma, J. Geisler-Lee, Y. Deng, A. Kolmakov // Science of the total environment. – 2010. – V. 408. – No. 16. – P. 3053-3061.

Ma, Y. Phytotoxicity and biotransformation of La₂O₃ nanoparticles in a terrestrial plant cucumber (*Cucumis sativus*) / Y. Ma, X. He, P. Zhang, Z. Zhang, Z. Guo, R. Tai, Z. Xu, L. Zhang, Y. Ding, Y. Zhao, Z. Chai // Nanotoxicology. – 2011. – V. 5. – No. 4. – P. 743-753.

Manzo, S. The diverse toxic effect of SiO₂ and TiO₂ nanoparticles toward the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* / S. Manzo, S. Buono, G. Rametta, M. Miglietta, S. Schiavo, G. Di Francia // Environmental Science and Pollution Research. – 2015. – V. 22. – No. 20. – P. 15941-15951.

Marchello, A.E. Effects of titanium dioxide nanoparticles in different metabolic pathways in the freshwater microalga *Chlorella sorokiniana* (Trebouxiophyceae) / A.E. Marchello, D.M. Barreto, A.T. Lombardi // Water, Air, & Soil Pollution. – 2018. – V. 229. – No. 2. – P. 48.

Marcone, G. Ecotoxicity of TiO₂ to *Daphnia similis* under irradiation / G. Marcone, A. Oliveira, G. Almeida, G. Umbuzeiro, W. Jardim // Journal of hazardous materials. – 2012. – V. 211. – P. 436-442.

Massarsky, A. Nanosilver cytotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes and hepatocytes / R. Abraham, K. C. Nguyen, P. Rippstein, A. Tayabali, V. Trudeau, T. Moon // *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. – 2014. – V. 159. – P. 10-21.

McGillicuddy, E. Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology / E. McGillicuddy, I. Murray, S. Kavanagh, L. Morrison, A. Fogarty, M. Cormican, D. Morris // *Science of the Total Environment*. – 2017. – V. 575. – P. 231-246.

McShan, D. Molecular Toxicity Mechanism of Nanosilver / D. McShan, P. Ray C., H. Yu // *Journal of food and drug analysis*. – 2014. – V. 22. – No. 1. – P. 116-127.

Mehrabani, M. Preparation of biocompatible and biodegradable silk fibroin/chitin/silver nanoparticles 3D scaffolds as a bandage for antimicrobial wound dressing / M. Mehrabani, R. Karimian, B. Mehramouz, M. Rahimi, H. Kafil // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2018.

Mendonca, E. Effects of diamond nanoparticle exposure on the internal structure and reproduction of *Daphnia magna* / E. Mendonca, M. Diniz, L. Silva, I. Peres, L. Castro, J.B. Correia, A. Picado // *Journal of hazardous materials*. – 2011. – V. 186. – No. 1. – P. 265-271.

Mihindukulasuriya, S. Nanotechnology development in food packaging: A review / S. Mihindukulasuriya, L. Lim // *Trends in Food Science & Technology*. – 2014. – V. 40. – No. 2. – P. 149-167.

Miller, R.J. TiO₂ nanoparticles are phototoxic to marine phytoplankton / R.J. Miller, S. Bennett, A.A. Keller, S. Pease, H.S. Lenihan // *PloS one*. – 2012. – V. 7. – No. 1. – P. e30321.

Mingfeng, Q. Nano-TiO₂ improve the photosynthesis of tomato leaves under mild heat stress / Q. Mingfeng, L. Yufeng, K. Tianlai // *Biological trace element research*. – 2013. – V. 156. – No. 1-3. – P. 323-328.

Miralles, P. Toxicity, uptake, and translocation of engineered nanomaterials in vascular plants / P. Miralles, T. Church, A. Harris // *Environmental science & technology*. – 2012. – V. 46. – No. 17. – P. 9224-9239.

Mirzajani, F. Effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa L* and its rhizosphere bacteria / F. Mirzajani, H. Askari, S. Hamzelou, M. Farzaneh, A. Ghassempour // *Ecotoxicology and environmental safety*. – 2013. – V. 88. – P. 48-54.

Mishra, S. Silver nanoparticles mediated altered gene expression of melanin biosynthesis genes in *Bipolaris sorokiniana* /S. Mishra, H. Singh // *Microbiological research*. – 2015. – V. 172. – P. 16-18.

Moll, J. Effects of titanium dioxide nanoparticles on soil microbial communities and wheat biomass / J. Moll, F. Klingenfuss, F. Widmer, A. Gogos, T.D. Bucheli, M. Hartmann, M. Van Der Heijden // *Soil Biology and Biochemistry*. – 2017. – V. 111. – P. 85-93.

Monteiro, D.R. Silver colloidal nanoparticles: antifungal effect against adhered cells and biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata* / D.R. Monteiro, L.F. Gorup, S. Silva, M. Negri, E.R. de Camargo, R. Oliveira, D.B. Barbosa, M. Henriques // *Biofouling*. – 2011. – V. 27. – No. 7. – P. 711-719.

Nair, R.P. Uptake of FITC-labeled silica nanoparticles and quantum dots by rice seedlings: Effects on seed germination and their potential as biolabels for plants / R.P. Nair, A.C. Poulouse, Y. Nagaoka, Y. Yoshida, T. Maekawa, D.S. Kumar // *Journal of Fluorescence* – 2011. – T 21. – P. 2057–2068.

Nasrollahi, A. Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi / A. Nasrollahi, K. Pourshamsian, P. Mansourkiaee // *International Journal of Nano Dimension*. – 2011. – V. 1. – No 3. – P. 233–239

Navarro, E. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi / E. Navarro, A. Baun, R. Behra N., Hartmann, J. Filser, A. Miao, L. Sigg // *Ecotoxicology*. – 2008. – V. 17. – No. 5. – P. 372-386.

Nechet, K. *Bipolaris euphorbiae* as a biological control agent for Wild Poinsettia (*Euphorbia heterophylla*): host-specificity and variability in pathogen and host

populations / K. Nechet, R. Barret, E. Mizubuti // *BioControl*. – 2006. – V. 51. – No. 2. – P. 259-275

NNI (The National Nanotechnology Initiative) – Национальная нанотехнологическая инициатива США [Электронный ресурс]: офиц. сайт. URL: <http://www.nano.gov/>.

Novak, S. The significance of nanomaterial post-exposure responses in *Daphnia magna* standard acute immobilisation assay: Example with testing TiO₂ nanoparticles / S. Novak, A. Kokalj, M. Hocevar, M. Godec, D. Drobne // *Ecotoxicology and environmental safety*. – 2018. – V. 152. – P. 61-66.

Ogar, A. Antifungal properties of silver nanoparticles against indoor mould growth / A. Ogar, G. Tylko, K. Turnau // *Science of the Total Environment*. – 2015. – V. 521. – P. 305-314.

Oukarroum, A. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* / A. Oukarroum, S. Bras, F. Perreault, R. Popovic // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2012. – V. 78. – P. 80-85.

Ovais, M. Wound healing applications of biogenic colloidal silver and gold nanoparticles: recent trends and future prospects / M. Ovais, I. Ahmad, A. Khalil, S. Mukherjee, R. Javed, M. Ayaz, Z. Shinwari // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2018. – P. 1-14.

Owen, R. Formulating the problems for environmental risk assessment of nanomaterials / R. Owen, R. Handy // *Environ. Sci. Technol.* – 2007. – No. 41. – P. 5582–5588.

Pakrashi, S. In vivo genotoxicity assessment of titanium dioxide nanoparticles by *Allium cepa* root tip assay at high exposure concentrations / S. Pakrashi, N. Jain, S. Dalai, J. Jayakumar, P. Chandrasekaran, A. Raichur, A. Mukherjee // *PloS one*. – 2014. – V. 9. – No. 2. – P. e87789.

Panacek, A. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp / A. Panacek, M. Kolar, R. Vecerova, R. Pucek, J. Soukupova, V. Krystof, L. Kvitek // *Biomaterials*. – 2009. – V. 30. – No. 31. – P. 6333-6340.

Pappa, A. Sulfur-containing compounds in protecting against oxidant-mediated lung diseases / A. Pappa, R. Franco, O. Schoneveld, A. Galanis, R. Sandaltzopoulos, M. Panayiotidis // *Current medicinal chemistry*. – 2007. – V. 14. – No. 24. – P. 2590-2596.

Park, E. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism / E. Park, J. Yi, Y. Kim, K. Choi, K. Park // *Toxicology in vitro*. – 2010. – V. 24. – No. 3. – P. 872-878.

Park, H. Trophic transfer of citrate, PVP coated silver nanomaterials, and silver ions in a paddy microcosm / H. Park, J. Kim, K. Chang, B. Lee, I. Eom, P. Kim, M. Yeo // *Environmental Pollution*. – 2018. – V. 235. – P. 435-445.

Park, S. Geno-and ecotoxicity evaluation of silver nanoparticles in freshwater crustacean *Daphnia magna* / S. Park, J.H. Choi // *Environmental Engineering Research*. – 2010. – V. 15. – No. 1. – P. 23-27.

Patlolla, A. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Vicia faba*: a pilot study on the environmental monitoring of nanoparticles / A. Patlolla, A. Berry, L. May, P. Tchounwou // *International journal of environmental research and public health*. – 2012. – V. 9. – No. 5. – P. 1649-1662.

Patra, P. Biochemical-, biophysical-, and microarray-based antifungal evaluation of the buffer-mediated synthesized nano zinc oxide: an in vivo and in vitro toxicity study / P. Patra, S. Mitra, N. Debnath, A. Goswami // *Langmuir*. – 2012. – V. 28. – No. 49. – P. 16966-16978.

Peters, K. Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function in vitro: studies on viability, proliferation and inflammation / K. Peters, R. Unger, C. Kirkpatrick, A. Gatti, E. Monari // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2004. – V. 15. – No. 4. – P. 321-325.

Peters, R. Characterization of titanium dioxide nanoparticles in food products: analytical methods to define nanoparticles / R. Peters, G. van Bommel, Z. Herrera-Rivera, H.P. Helsper, H.J. Marvin, S. Weigel, H. Bouwmeester // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2014. – V. 62. – No. 27. – P. 6285-6293.

Piccinno, F. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world / F. Piccinno, F. Gottschalk, S. Seeger, B. Nowack // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2012. – V. 14. – No. 9. – P. 1109.

Pratt, R.G. Comparative survival of conidia of eight species of *Bipolaris*, *Curvularia*, and *Exserohilum* in soil and influences of swine waste amendments on survival / R.G. Pratt // *Applied Soil Ecology*. – 2006. – N. 31. – P. 159-168.

Praveena, S. Potential of cellulose paper coated with silver nanoparticles: a benign option for emergency drinking water filter / S. Praveena, K. Karupiah, L. Than // *Cellulose*. – 2018– P. 1-12.

Qi, M. Nano-TiO₂ improve the photosynthesis of tomato leaves under mild heat stress / M. Qi, Y. Liu, T. Li // *Biological trace element research*. – 2013. – V. 156. – No. 1-3. – P. 323-328.

Qian, H. Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana* / H. Qian, X. Peng, X. Han, J. Ren, L. Sun, Z. Fu // *Journal of Environmental Sciences*. – 2013. – V. 25. – No. 9. – P. 1947-1956.

Rafique, R. Dose-dependent physiological responses of *Triticum aestivum* L to soil applied TiO₂ nanoparticles: Alterations in chlorophyll content, H₂O₂ production, and genotoxicity / R. Rafique, Z. Zahra, N. Virk, M. Shahid, E. Pinelli, T. Park, M. Arshad // *Agriculture, Ecosystems & Environment*. – 2018. – V. 255. – P. 95-101.

Raliya, R. Mechanistic evaluation of translocation and physiological impact of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles on the tomato (*Solanum lycopersicum* L) plant / R. Raliya, R. Nair, S. Chavalmane, W. Wang, P. Biswas // *Metallomics*. – 2015. – V. 7. – No. 12. – P. 1584-1594.

Ramires, P.A. The influence of titania/hydroxyapatite composite coatings on *in vitro* osteoblasts behavior / P.A. Ramires, A. Romito, F. Cosentino, E. Milella // *Biomaterials*. – 2001. – V. 22. – No. 12. – P. 1467-1474.

Regulation (EC) No 1907/ 2006 of the European Parliament and of the Council concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) // Official Journal of the European Union. – L. 396. – 2006. – P. 1–849.

Renwick, L. Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles / L.C. Renwick, K. Donaldson, A. Clouter // Toxicology and applied pharmacology. – 2001. – V. 172. – No. 2. – P. 119-127.

Ribeiro, F. Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio* / F. Ribeiro, J.A. Gallego-Urrea, K. Jurkschat, A. Crossley, M. Hassellöv, C. Taylor, A. Soares, S. Loureiro // Science of the Total Environment. – 2014. – V. 466. – P. 232-241.

Robichaud, C. Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO₂ production as a basis for exposure assessment / C. Robichaud, A.E. Uyar, M. Darby, L. Zucker, M. Wiesner // Environmental Science & Technology. – 2009. – V. 43. – No. 12 – P. 4227-4233.

Ruiz-Palomero, C. Sulfonated nanocellulose for the efficient dispersive micro solid-phase extraction and determination of silver nanoparticles in food products / C. Ruiz-Palomero, M.L. Soriano, M. Valcárcel // Journal of Chromatography A. – 2016. – V. 1428. – P. 352-358.

Sadiq, I.M. Ecotoxicity study of titania (TiO₂) NPs on two microalgae species: *Scenedesmus sp* and *Chlorella sp* / I.M. Sadiq, S. Dalai, N. Chandrasekaran, A. Mukherjee // Ecotoxicology and environmental safety. – 2011. – V. 74. – No. 5. – P. 1180-1187.

Sakamoto, M. Free silver ion as the main cause of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles to cladocerans / M. Sakamoto, J. Ha, S. Yoneshima, C. Kataoka, H. Tatsuta, S. Kashiwada // Archives of environmental contamination and toxicology. – 2015. – V. 68. – No. 3. – P. 500-509.

Salama, H. Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.) / H. Salama // International Research Journal of Biotechnology. – 2012. – V. 3. – No. 10. – P. 190-197.

Schrimer, K. Ecotoxicological aspects of nanomaterials in the aquatic environment, in Safety Aspects of Engineered Nanomaterials / K. Schrimer, R. Behra, L. Sigg, M.J.-F. Suter // Pan Stanford Publishing Pte. Ltd.: Singapore, 2013. – No. Epfl-Chapter-197935. – P. 137-158.

Shah, V. B. Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds / V.B. Shah // Water, Air, & Soil Pollution. – 2009. – V. 197. – P. 143–148.

Sharma, P. Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea* / P. Sharma, D. Bhatt, M. Zaidi, P. Saradhi, P. Khanna, S. Arora // Applied biochemistry and biotechnology. – 2012. – V. 167. – No. 8. – P. 2225-2233.

Siddiqui, M. Role of nano-SiO₂ in germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* seeds Mill.) / M. Siddiqui, M. Al-Whaibi // Saudi journal of biological sciences. – 2014. – V. 21. – No. 1. – P. 13-17.

Silva, S. Pure anatase and rutile+ anatase nanoparticles differently affect wheat seedlings / S. Silva, H. Oliveira, S. Craveiro, A. Calado, C. Santos // Chemosphere. – 2016. – V. 151. – P. 68-75.

Silvestre, C. Food packaging based on polymer nanomaterials / C. Silvestre, D. Duraccio, S. Cimmino // Progress in Polymer Science. – 2011. – V. 36. – No. 12. – P. 1766-1782.

Simeonidis, K. Inorganic engineered nanoparticles in drinking water treatment: a critical review / K. Simeonidis, S. Mourdikoudis, E. Kaprara, M. Mitrakas, L. Polavarapu // Environmental Science: Water Research & Technology. – 2016. – V. 2. – No. 1. – P. 43-70.

Sohn, E. Aquatic toxicity comparison of silver nanoparticles and silver nanowires / E. Sohn, S. Johar, T. Kim, J. Kim, E. Kim, J. Lee, I. Yu // BioMed research international. – 2015. – V. 2015.

Sokolov, I. Methods for polishing a tooth surface utilizing abrasive nanoparticles / I. Sokolov // пат. 9700498 США. – 2017.

Song, U. Functional analyses of nanoparticle toxicity: a comparative study of the effects of TiO₂ and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) / U. Song, H. Jun, B. Waldman, J. Roh, Y. Kim, J. Yi, E.J. Lee // *Ecotoxicology and environmental safety*. – 2013. – V. 93. – P. 60-67.

Souza, V. G. L. Nanoparticles in food packaging: Biodegradability and potential migration to food — a review / V.G. L. Souza, A.L. Fernando // *Food Packaging and Shelf Life*. – 2016. – V. 8. – P. 63-70.

Stampoulis, D. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants / D. Stampoulis, S.K. Sinha, J.C. White // *Environmental Science & Technology*. – 2009. – V. 43. – P. 9473-9479.

Stensberg, M. Toxicological studies on silver nanoparticles: challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging / M. Stensberg, Q. Wei, E. McLamore, D. Porterfield, A. Wei, M. Sepulveda // *Nanomedicine*. – 2011. – V. 6. – No. 5. – P. 879-898.

Suriyaprabha, R. Silica nanoparticles for increased silica availability in maize (*Zea mays* L) seeds under hydroponic conditions / R. Suriyaprabha, G. Karunakaran, R. Yuvakkumar, V. Rajendran, N. Kannan // *Current nanoscience*. – 2012. – V. 8. – No. 6. – P. 902-908.

Talreja, N. Engineered Nanoparticles' Toxicity: Environmental Aspects / N. Talreja, D. Kumar // *Nanotechnology in Environmental Science*. – 2018. – P. 737-758.

Termtanun, M. Photocatalytic degradation of pesticides using TiO₂ nanoparticles // M. Termtanun: дис. – University of Nottingham. – 2013.

Thakur, S. Bio-Nanotechnology and its Role in Agriculture and Food Industry / S. Thakur, S. Thakur, R. Kumar // *Journal of Molecular and Genetic Medicine*. – 2018. – V. 12. – No. 324. – P. 1747-0862.

Thuesombat, P. Effect of silver nanoparticles on rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) seed germination and seedling growth / P. Thuesombat, S. Hannongbua, S. Akasit, S. Chadchawan // *Ecotoxicology and environmental safety*. – 2014. – V. 104. – P. 302-309.

Van Hoecke, K. Ecotoxicity of silica nanoparticles to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: importance of surface area / K. Van Hoecke, K. De Schamphelaere, P. Van der Meeren, S. Lucas, C. Janssen // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2008. – V. 27. – No. 9. – P. 1948-1957.

Vannini, C. Morphological and proteomic responses of *Eruca sativa* exposed to silver nanoparticles or silver nitrate / C. Vannini, G. Domingo, E. Onelli, B. Prinsi, M. Marsoni, L. Espen, M. Bracale // *PLoS One*. – 2013. – V. 8. – No. 7. – P. e68752.

Vazquez-Munoz, R. Toxicity of silver nanoparticles in biological systems: Does the complexity of biological systems matter? / R. Vazquez-Munoz, B. Borrego, K. Juarez-Moreno, M. Garcia-García, J. Morales, N. Bogdanchikova, A. Huerta-Saquero // *Toxicology letters*. – 2017. – V. 276. – P. 11-20.

Vetrova, E. A bioluminescent signal system: detection of chemical toxicants in water / E. Vetrova, E. Esimbekova, N. Rimmel, S. Kotova, N. Beloskov, V. Kratasyuk, I. Gitelson // *Luminescence*. – 2007. – V. 22. – P. 206-214.

Volker, C. Comparative toxicity assessment of nanosilver on three *Daphnia* species in acute, chronic and multi-generation experiments / C. Volker, C. Boedicker, Daubenthaler, M. Oetken, J. Oehlmann // *PLoS One*. – 2013. – V. 8. – No. 10. – P. e75026.

Wang^B, D. Where does the toxicity of metal oxide nanoparticles come from: The nanoparticles, the ions, or a combination of both? / D. Wang, Z. Lin, T. Wang, Z. Yao, M. Qin, S. Zheng, W. Lu // *Journal of hazardous materials*. – 2016. – V. 308. – P. 328-334.

Wang^a, S. Ultra-small TiO₂ nanoparticles disrupt microtubular networks in *Arabidopsis thaliana* / S. Wang, J. Kurepa, J. A. Smalle // *Plant, cell & environment*. – 2011. – V. 34. – No. 5. – P. 811-820.

Wang^a, Y. TiO₂ nanoparticles in the marine environment: Physical effects responsible for the toxicity on algae *Phaeodactylum tricornerutum* / Y. Wang, X. Zhu, Y. Lao, X. Lv, Y. Tao, B. Huang, Z. Cai // *Science of the Total Environment*. – 2016. – V. 565. – P. 818-826.

Wang⁶, Z. Toxicity and internalization of CuO nanoparticles to prokaryotic alga *Microcystis aeruginosa* as affected by dissolved organic matter / Z. Wang, J. Li, J. Zhao, B. Xing // *Environmental science & technology*. – 2011. – V. 45. – No. 14. – P. 6032-6040

Wang⁶, Z. Trophic transfer and accumulation of TiO₂ nanoparticles from clamworm (*Perinereis aibuhitensis*) to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) along a marine benthic food chain / Z. Wang, L. Yin, J. Zhao, B. Xing // *Water research*. – 2016. – V. 95. – P. 250-259.

Wang, Z. Aquatic toxicity of nanosilver colloids to different trophic organisms: contributions of particles and free silver ion / Z. Wang, J. Chen, X. Li, J. Shao, W. Peijnenburg // *Environmental toxicology and chemistry*. – 2012. – V. 31. – No. 10. – P. 2408-2413.

Wang, T.Y. Potential application of functional porous TiO₂ nanoparticles in light-controlled drug release and targeted drug delivery / T.Y.Wang, H.T. Jiang, L. Wan, Q.F. Zhao, T.Y. Jiang, B.Wang, S. Wang // *Acta biomaterialia*. – 2015. – V. 13. – P. 354-363.

Weir, A. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products / A. Weir, P. Westerhoff, L. Fabricius, K. Hristovski, N. Von Goetz // *Environmental science & technology*. – 2012. – V. 46. – No. 4. – P. 2242-2250.

Wild, E. Novel method for the direct visualization of in vivo nanomaterials and chemical interactions in plants / E. Wild, K.C. Jones // *Environmental science & technology*. – 2009. – V. 43. – No. 14. – P. 5290-5294.

Windler, L. Release of titanium dioxide from textiles during washing / L. Windler, C. Lorenz, N. Von Goetz, K. Hungerbuhler, M. Amberg, M. Heuberger, B. Nowack // *Environmental science & technology*. – 2012. – V. 46. – No. 15. – P. 8181-8188.

Wright, M. Titanium dioxide nanoparticle exposure reduces algal biomass and alters algal assemblage composition in wastewater effluent-dominated stream

mesocosms / M. Wright, C. Matson, L. Baker, B. Castellon, P. Watkins, R. King // *The Science of the total environment*. – 2018. – V. 626. – P. 357-365.

Xia, Z. The antifungal effect of silver nanoparticles on *Trichosporon asahii* / Z. Xia, Q. Ma, S. Li, D. Zhang, L. Cong, Y. Tian, R. Yang // *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. – 2016. – V. 49. – No. 2. – P. 182-188.

Yadav, T. Fabricated nanoparticles: current status and potential phytotoxic threats / T. Yadav, A.A. Mungray, A.K. Mungray // *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology volume*. – Springer, Cham. – 2014. – P. 83-110.

Yadollahpour, A. Magnetic nanoparticles: a review of chemical and physical characteristics important in medical applications / A. Yadollahpour, S. Rashidi // *Oriental Journal of Chemistry*. – 2015. – V. 31. – No. Special Issue 1. – P. 25-30.

Yan, L. Influence of nano-silica on the flame retardancy and smoke suppression properties of transparent intumescent fire-retardant coatings / L. Yan, Z. Xu, X. Wang // *Progress in Organic Coatings*. – 2017. – V. 112. – P. 319-329.

Yan, Z. Co₃O₄/ Co nanoparticles enclosed graphitic carbon as anode material for high performance Li-ion batteries / Z. Yan, Q. Hu, G. Yan, H. Li, K. Shih, Z. Yang, J. Wang // *Chemical Engineering Journal*. – 2017. – V. 321. – P. 495-501.

Yang, Z. Assessment of the phytotoxicity of metal oxide nanoparticles on two crop plants, maize (*Zea mays L.*) and rice (*Oryza sativa L.*) / Z. Yang, J. Chen, R. Dou, X. Gao, C. Mao, L. Wang // *International journal of environmental research and public health*. – 2015. – V. 12. – No. 12. – P. 15100-15109.

Yasur, J. Environmental effects of nanosilver: impact on castor seed germination, seedling growth, and plant physiology / J. Yasur, P. U. Rani // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2013. – V. 20. – No. 12. – P. 8636-8648.

Yin, L. Effects of silver nanoparticle exposure on germination and early growth of eleven wetland plants / L. Yin, B. Colman, B. McGill, J. Wright, E. Bernhardt // *PLoS One*. – 2012. – V. 7. – No. 10. – P. e47674.

You, D. ROS generating TiO₂ nanoparticles for non-invasive sonodynamic therapy of cancer / D. You, V. Deepagan, W. Um, S. Jeon, S. Son, H. Chang, J.H. Park // Scientific reports. – 2016. – V. 6. – P. 23200.

Yu, K. Toxicity of amorphous silica nanoparticles in mouse keratinocytes / K. Yu, C. Grabinski, A. Schrand, R. Murdock, W. Wang, B. Gu // Journal of Nanoparticle Research. – 2009. – V. 11. – No. 1. – P. 15-24

Zhang, A.P. Photocatalytic killing effect of TiO₂ nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells / A.P. Zhang, Y. Sun // World Journal of Gastroenterology: WJG. – 2004. – V. 10. – No. 21. – P. 3191.

Zhang, C. Silver nanoparticles in aquatic environments: Physiochemical behavior and antimicrobial mechanisms / C. Zhang, Z. Hu, B. Deng // Water research. – 2016. – V. 88. – P. 403-427.

Zhao, G. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of Escherichia coli to the silver ion / G. Zhao, S. Stevens // Biometals. – 1998. – V. 11. – No. 1. – P. 27-32.

Zheng, L. Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally aged seeds and growth of spinach / L. Zheng, F. Hong, S. Lu, C. Liu // Biological trace element research. – 2005. – V. 104. – No. 1. – P. 83-91.

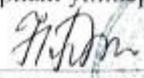
Zhu, H. Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants / H. Zhu, J. Han J., Xiao, Y. Jin // Journal of Environmental monitoring. – 2008. – V. 10. – No. 6. – P. 713-717.

Zhu, X.S. Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to *Daphnia magna* / X.S. Zhu, L. Zhu, Y.S. Chen, S.Y. Tian // The Journal of Nanoparticle Research. – 2009. – V. 11. – P. 67–75.

Zouzelka, R. Combined biocidal action of silver nanoparticles and ions against Chlorococcales (*Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella vulgaris*) and filamentous algae (*Klebsormidium* sp.) / R. Zouzelka, P. Cihakova, J. Ambrozova, J. Rathousky // Environmental Science and Pollution Research. – 2016. – V. 23. – No. 9. – P. 8317-8326.

Приложение. Акт внедрения результатов научного исследования в учебный процесс ВУЗа.

Ректор ФГБОУ ВО
«Красноярский государственный
аграрный университет»


Н. И. Пыжикова

« ____ » _____ 2018 г.

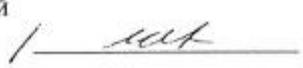
АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Результаты научных исследований Асановой Анастасии Андреевны на тему «Эколого-биохимическая оценка токсичности окружающей среды, загрязненной наноматериалами», представляемые на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.08 – Экология, использованы в лекционных материалах дисциплины «Основы экотоксикологии» для студентов 2 курса, направления агрохимии и агропочвоведение, профиля агроэкология с 2017 года.

Заведующая кафедрой
ландшафтной архитектуры,
ботаники, агроэкологии
ИАЭТ ФГБОУ ВО
«Красноярский государственный
аграрный университет»
д.б.н., профессор

 Г.А. Демиденко

Директор ИАЭТ ФГБОУ ВО
«Красноярский государственный
аграрный университет»
к.с.-х.наук, доцент

 В.В. Келер