

УДК 595.3:574.64

В. А. Гремячих, И. И. Томилина

**ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ
ХРОНИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ КЛАСТЕРНОГО
СЕРЕБРА НА ПЛАНКТОННЫХ РАКООБРАЗНЫХ
*CERIODAPHNIA AFFINIS***

Исследовано влияние сублетальных концентраций высокодисперсного (кластерного) серебра на морфометрические показатели и показатели воспроизводства представителей планктонных ракообразных *Ceriodaphnia affinis*. В пресноводных экосистемах изменение количества и качества популяции ракообразных, составляющих кормовую базу других гидробионтов, может иметь негативные последствия.

Ключевые слова: наноматериалы, токсичность, гидробионты.

Исследования в области нанотехнологий и оценки их риска для здоровья человека и окружающей среды признаны приоритетными во всем мире [11]. В различных отраслях промышленности используется более 5000 веществ и композиций в нанофазе, однако их потенциальный экологический риск на уровне производства, применения и утилизации изучен недостаточно [17]. В развитии современных нанотехнологий значительную роль играют исследования наночастиц металлов. Это обусловлено, прежде всего, широким спектром возможностей практического применения специфических свойств как самих наночастиц, так и модифицированных ими материалов. В частности, наночастицы серебра могут использоваться для получения различных материалов с бактерицидными свойствами [14].

В воде наноматериалы легко агрегируются, однако влияние живых организмов на их распространение в окружающей среде практически не исследовано [2]. Не исключено, что роль гидробионтов (особенно беспозвоночных) в перемещении наноматериалов в пределах и за пределами водоёма может оказаться существенной. Наночастицы, мигрируя по пищевой цепи, концентрируются в консументах высшего порядка [4]. В свою очередь, это может сказываться на выраженности токсических эффектов у организмов, находящихся на разных трофических уровнях.

Цель работы — оценить изменения биологических параметров (выживаемости, плодовитости и интенсивности размножения) *Ceriodaphnia affinis*

© В. А. Гремячих, И. И. Томилина, 2014

Lilljeborg под влиянием сублетальных концентраций высокодисперсного (кластерного) серебра.

Материал и методика исследований. Источником наночастиц серебра служил ветеринарный препарат Арговит, представляющий собой высокодисперсное (кластерное) серебро, стабилизированное полимером медицинского назначения — низкомолекулярным поли-N-винилпирролидоном-2 (ПВП). Арговит выпускается в виде концентрированного раствора, из которого можно легко приготовить рабочие растворы путём простого разведения водой.

Содержание серебра в маточном растворе, определяемое гравиметрическим методом [1], составляло 12,06, содержание стабилизатора — 186 мг/дм³. Растворы для эксперимента получали путём последовательного разведения маточных растворов отстоянной водопроводной водой с последующим диспергированием на ультразвуковом диспергаторе УЗДН-2Т в режиме 0,5 А и 44 кГц непосредственно перед опытом.

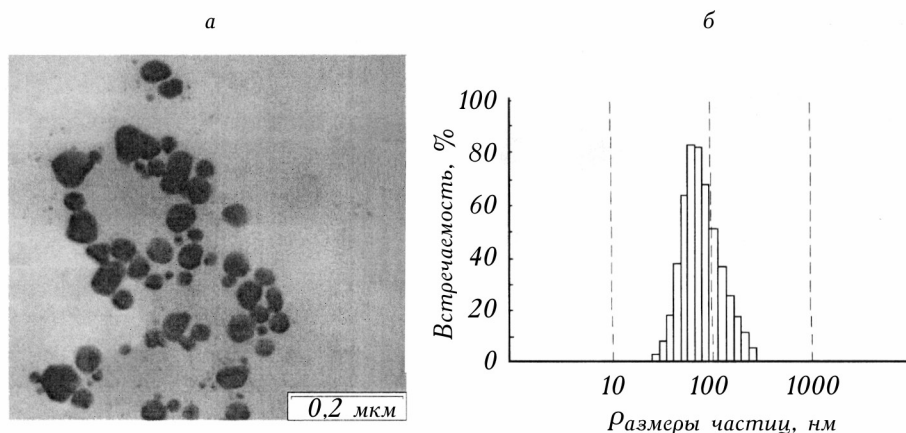
Проведены две серии экспериментов с использованием Арговита и ПВП, концентрации которого в растворах с коллоидным серебром и без него были идентичными. В первой серии концентрации серебра составили 0,1, 0,01 и 0,001 мг/дм³, поливинилпирролидона — 1,5, 0,15 и 0,015 мг/дм³, во второй — соответственно $5 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-5}$ и $2 \cdot 10^{-6}$ и $77 \cdot 10^{-5}$, $15 \cdot 10^{-5}$ и $3 \cdot 10^{-5}$ мг/дм³.

Форму и размеры наночастиц серебра определяли на электронном трансмиссионном микроскопе JEM 100B [6]¹. Распределение по размерам устанавливали на лазерном анализаторе частиц Nanotrac Ultra 251. В качестве тест-объекта использовали ветвистоусого рачка *Ceriodaphnia affinis* (Cladocera, Crustacea).

Токсичность кластерного серебра и поливинилпирролидона исследовали по стандартной методике [3]. В первые сутки после рождения рачков 10 экз. помещали по одному в стаканчики с 15 мл тестируемого раствора и наблюдали в 1-й серии экспериментов в течение 7 сут, во 2-й — на протяжении всего жизненного цикла. Ежедневно регистрировали количество выживших организмов, количество помётов и молоди у каждой самки. Растворы меняли каждые 3-и и 5-е сутки еженедельно. Животных кормили раз в два дня зелёными водорослями *Chlorella vulgaris* в концентрации 250—300 тыс. кл/мл [3]. Определяли выживаемость, линейные размеры тела, продолжительность жизненного цикла и индивидуальную плодовитость животных. Рассчитывали суммарную плодовитость (общее количество молоди, полученное от одной самки в течение всей жизни), интенсивность размножения (суммарная плодовитость самки, отнесённая к её продолжительности жизни в сутках).

Все эксперименты выполняли в двух повторностях. Поддерживали оптимальные условия среды: температуру воды — в пределах $21 \pm 3^\circ\text{C}$, pH

¹ Электронные фотографии наночастиц серебра любезно предоставлены А. П. Мыльниковым (ИБВВ РАН).



1. Наночастицы серебра: *a* — электронная фотография наночастиц серебра; *б* — распределение частиц по размерам.

7,5—8,0, содержание растворенного кислорода — на уровне насыщения. Контрольную группу тест-животных содержали в отстоянной водопроводной воде.

Данные представляли в виде средних значений и их ошибок ($x \pm SE$). Результаты обрабатывали статистически, используя метод однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и процедуру LSD-теста при уровне значимости $p = 0,05$ [20]. Статистический анализ результатов проводили с помощью пакета программ STATGRAPHICS Plus 2.1.

Результаты исследований

Определение формы и размеров наночастиц серебра методами микроскопии показало, что большая их часть имела сферическую или эллипсоидальную форму, отдельные частицы наиболее крупных размеров — неправильную. Длина или диаметр частиц варьировали от 4,2 до 103,3 нм. Крупных агрегатов в составе образца не выявлено (рис. 1, *a*). При попадании в водную среду образовывались конгломераты металл-полимерной композиции, о чём свидетельствует гистограмма распределения частиц по размерам (рис. 1, *б*). Минимальный размер частиц — 30 нм, максимальный — 290, более 50% были размером 60—100 нм.

В первой серии экспериментов в растворах серебра с концентрацией 0,1 и 0,01 мг/дм³ отмечена 100%-ная гибель цериодафний в течение 48 ч (табл. 1). Во всех исследованных растворах ПВП и металла в концентрации 0,001 мг/дм³ выживаемость животных была сопоставима с контрольной. Индивидуальная плодовитость цериодафний за 7 сут экспонирования в растворах серебра 0,001 и стабилизатора 0,15 и 0,015 мг/дм³ достоверно не отличалась от контрольных значений (см. табл. 1).

1. Показатели выживаемости и плодовитости цериодафний (1-я серия экспериментов) под воздействием кластерного серебра и ПВП

Вещества	Концентрация, мг/дм ³	Выживаемость, %		Плодовитость за 7 сут, экз.
		48 ч	7 сут	
Наночастицы серебра	0,1	0	—	—
	0,01	0	—	—
	0,001	100	70,0 ± 20,0	9,2 ± 0,7
Поливинилпирролидон	1,5	100	70,0 ± 20,0	3,3 ± 0,7*
	0,15	100	90,0 ± 10,0	10,0 ± 1,2
	0,015	100	90,0 ± 10,0	9,4 ± 0,2
Контроль		100	100	11,7 ± 1,3

Примечание. Здесь и в табл. 2: * достоверное отличие от контроля при уровне значимости $p = 0,05$.

Поскольку во второй серии экспериментов были использованы сублетальные концентрации металла, выживаемость и продолжительность жизни животных в опыте и контроле достоверно не различались (табл. 2). Суммарная плодовитость за весь жизненный цикл была достоверно ниже контрольной во всех исследованных растворах как коллоидного серебра, так и поливинилпирролидона (см. табл. 2). В первые пять недель эксперимента эта тенденция сохранялась у рачков опытных групп, и только к концу шестой среднее количество молоди, отрожденное животными за 7 сут, было сравнимо с контрольными значениями. Однако последнее не изменило соотношения суммарной плодовитости цериодафний за весь жизненный цикл в растворах металл-полимерной композиции, только стабилизатора и в контроле (рис. 2).

Интенсивность размножения животных была достоверно ниже контрольной во всех растворах серебра и в растворе стабилизатора с концентрацией 0,0003 мг/дм³ (см. табл. 2). В конце первой недели экспериментов отмечено угнетение роста рачков в растворах металла всех исследованных концентраций (рис. 3).

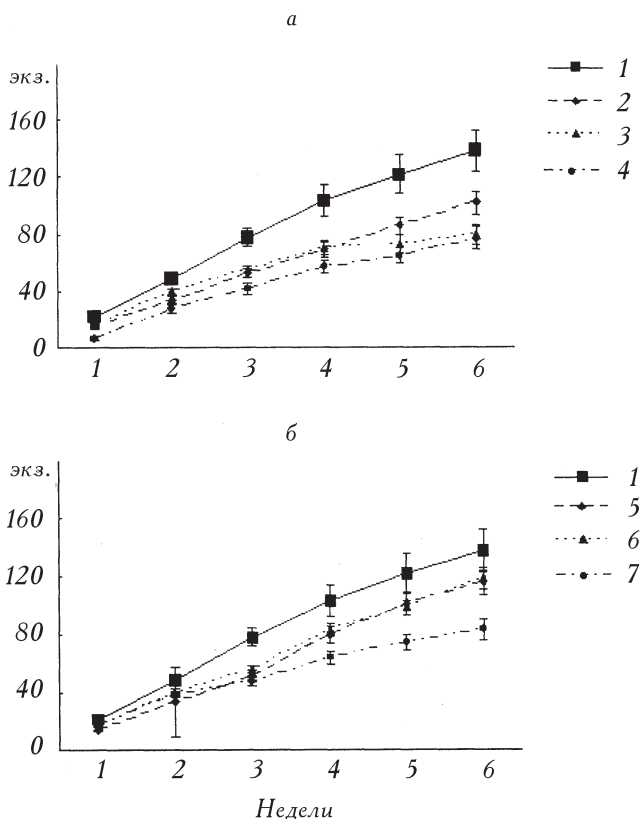
Зависимость биологических показателей цериодафний от концентрации соответствующего вещества в большинстве случаев была достоверной и более выраженной в растворах серебра: для суммарной плодовитости: $r = -0,40$, $p = 0,005$, для интенсивности размножения: $r = -0,55$, $p = 0,001$, для продолжительности жизни рачков: $r = -0,28$, $p = 0,002$, размеров: $r = -0,25$, $p = 0,08$, в растворах стабилизатора — только для суммарной плодовитости: $r = -0,27$, $p = 0,03$ и размеров 7-суточных особей: $r = 0,25$, $p = 0,02$.

Обсуждение результатов исследований

Очевидная неполнота и противоречивость сведений о токсичности наночастиц металлов для гидробионтов в сочетании с реальными перспективами

увеличения их содержания в среде обитания выдвигают на первый план проблемы безопасности наноматериалов [16, 18]. Одним из условий получения адекватной оценки безопасности техногенных наночастиц является использование традиционных тест-организмов, включенных в стандартные программы биотестирования, например *C. affinis*.

Токсические эффекты наноматериалов связаны не только с их физико-химическими свойствами, но и с размерами. Практически все наночастицы при попадании в водную среду склонны к образованию агломератов. На гистограмме распределения частиц серебра по размерам видно, что их минимальный размер — 30 нм, максимальный — 290, в то время как на электронной фотографии — соответственно 4,2 и 103,3 нм. В большинстве случаев процессы агломерации негативно влияют на свойства наночастиц. С одной стороны, чем больше агломераты, тем меньше вероятность их проникновения в клетки, с другой — это может препятствовать процессу вывода частиц из организма в случае их попадания внутрь [8]. По данным физико-химических методов исследования (электронная микроскопия, электронная спектроскопия в различных вариантах), средний размер первичных кластерных частиц серебра в препарате Арговит составляет 1,5—4,0 нм [5], в то время как в классических препаратах коллоидного серебра (колларгол, протаргол) он варьирует от 10 до 300 нм и больше. В препаратах кластерного серебра распределение частиц по размерам более узкое и сдвинуто в область наночастиц, коллоидного серебра — более широкое и смещено в область коллоидных частиц. То есть, и классические коллоидные препараты содержат кластеры и наночастицы серебра. Меньший средний размер частиц в растворах Арговита обуславливает агрегационную устойчи-



2. Динамика суммарной (накопленной) плодовитости цериодафний в растворах серебра (а) и стабилизатора (б): 1 — контроль; 2 — 0,00005 мг/л; 3 — 0,00001; 4 — 0,000002; 5 — 0,00077; 6 — 0,00015; 7 — 0,00003 мг/л.

вость его растворов и повышает эффективность [5].

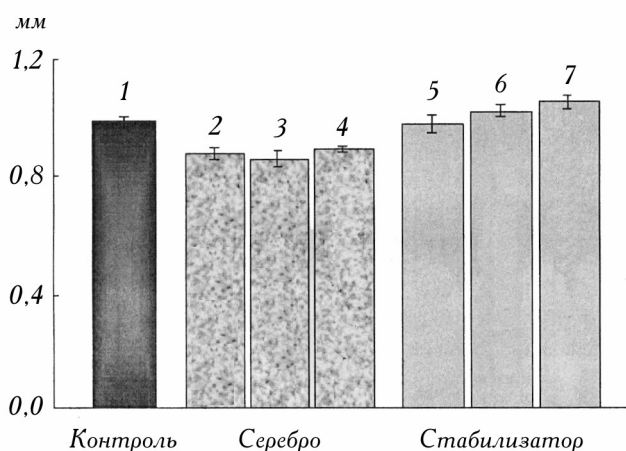
Наличие в среде наночастиц металлов приводит к снижению плодovitости, физиологическим изменениям, нарушениям поведения и повышенной смертности водных беспозвоночных [10]. Отмечено, что серебро, давно используемое человеком благодаря антимикробным свойствам, в наноразмерном состоянии усиливает свои цитотоксические свойства [13]. Коллоидный раствор наночастиц серебра (SilverMax) в концентрации 0,0005 и 0,00005 мг/дм³ не оказывал достоверного влияния на выживаемость и размеры *Daphnia magna* Straus в течение 24 сут [7]. В наших экспериментах 100%-ная гибель цериодафний в течение 48 ч отмечена в растворах серебра с концентрацией 0,1 и 0,01 мг/дм³. Во второй серии экспериментов во всех исследованных сублетальных концентрациях коллоидного серебра и ПВП морфометрические и репродуктивные показатели животных были достоверно ниже контрольных значений.

Механизм токсичности наноматериалов может быть связан с вызываемым ими клеточным окислительным стрессом, нарушением функций митохондрий и увеличением проницаемости мембраны [10, 18]. Сравнение влияния наночастиц Ag и ионов Ag⁺ показывает, что в большинстве случаев токсический эффект наночастиц был выше, чем ионов в эквивалентных концентрациях. Возможно, воздействие наночастиц серебра осуществляется по иному механизму, нежели его ионов [9].

Применение стабилизатора может влиять на токсичность исследуемых наноматериалов. Известно, что

2. Биологические показатели цериодафний под воздействием кластерного серебра и ПВП (2-я серия экспериментов)

Вещества	Концентрация, мг/дм ³	Выживаемость, %			Средняя продолжительность жизненного цикла, сут	Суммарная плодovitость за жизненный цикл, экз.	Интенсивность размножения, экз/сут
		48 ч	7 сут	30 сут			
Наночастицы серебра	0,00005	100	60,0 ± 10,0	55,0 ± 15,0	31,0 ± 5,0	87,9 ± 12,5*	1,9 ± 0,2*
	0,00001	100	90,0 ± 10,0	70,0 ± 0	42,6 ± 3,7	77,4 ± 8,5*	1,8 ± 0,1*
	0,000002	100	95,0 ± 5,0	65,0 ± 25,0	43,4 ± 4,6	47,8 ± 10,4*	1,0 ± 0,2*
Поливинилпирролидон	0,00077	100	80,0 ± 10,0	65,0 ± 15,0	38,7 ± 4,1	86,5 ± 14,5*	1,8 ± 0,2*
	0,00015	100	95,0 ± 5,0	70,0 ± 10,0	36,4 ± 4,1	99,9 ± 12,1*	2,7 ± 0,4
Контроль	0,00003	100	90,0 ± 10,0	80,0 ± 0	41,4 ± 5,4	78,0 ± 8,3*	2,3 ± 0,7
		100	100	100	45,6 ± 6,5	143,4 ± 22,9	3,2 ± 0,3



3. Размеры 7-суточных цериодафний, мм: 1 — контроль; 2 — 0,000002 мг/л; 3 — 0,00001; 4 — 0,00005; 5 — 0,00003; 6 — 0,00015; 7 — 0,00077 мг/л.

тетрогидрофуран (один из стабилизаторов фуллерена) увеличивает его среднелетальную дозу для *D. magna* в 40 раз [21]. Подобные данные для поливинилпирролидона отсутствуют. В наших экспериментах стабилизатор снижал репродуктивные показатели цериодафний во всех исследованных концентрациях, но и влиял на выживаемость и среднюю продолжительность жизненного цикла.

Ракообразные представляют начало пищевой цепи в пресноводных экосистемах, и изменение количества и качества их популяций может повлиять на популяции других водных организмов и привести к последующему накоплению наночастиц в экосистеме. Это обусловлено тем, что рачки способны удерживать большое количество наночастиц серебра на фильтрационном аппарате или поглощать их из раствора [9, 15]. При этом агломераты задерживаются во внутренних органах беспозвоночных более эффективно, чем одиночные наночастицы [10].

Заключение

Зарегистрировано токсическое действие растворов высокодисперсного (кластерного) серебра в сублетальных концентрациях на *C. affinis*. Растворы металла всех исследованных концентраций достоверно угнетали темпы роста животных и снижали репродуктивные показатели, не оказывая при этом влияния на продолжительность жизненного цикла. Изменение суммарной плодовитости и интенсивности размножения носило концентрационно-зависимый характер. Используемый в качестве стабилизатора растворов кластерного серебра поливинилпирролидон оказывал на рачков негативное влияние.

**

Досліджено вплив сублетальних концентрацій високодисперсного (кластерного) срібла на морфометричні показники і показники відтворення представників планктонних ракоподібних *Ceriodaphnia affinis*. У прісноводних екосистемах зміни чисельності і репродуктивної здатності популяцій ракоподібних, які складають кормову базу інших гідробіонтів, можуть мати негативні наслідки.

**

The effect of sublethal concentrations of fine-dispersed (cluster) silver on morphometric characteristics and reproduction in planktonic crustacean Ceriodaphnia affinis was studied. In freshwater ecosystems changes of the population number and fertility of crustaceans that make up the food supply for other aquatic organisms, may negatively impact the whole ecosystem.

**

1. Концентраты цинковые. Методы определения серебра и золота. ГОСТ 14048. 13-80. — М.: Изд-во стандартов, 1999. — 7 с.
2. Крысанов Е.Ю., Павлов Д.С., Демидова Т.Б., Дгебуагзе Ю.Ю. Наночастицы в живой природе: что нам об этом известно? // Рос. нанотехнологии. — 2009. — № 7—8. — С. 24—25.
3. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости цериодафний. Федеральный реестр (ФР). ФР.1.39.2007.03221. — М.: АКВАРОС, 2007. — 56 с.
4. Моргалёв Ю.Н., Хоч Н.С., Моргалёва Т.Г. и др. Биотестирование наноматериалов: о возможности транслокации наночастиц в пищевые сети // Рос. нанотехнологии. — 2010. — Т. 5. — № 11—12. — С. 98—102.
5. Огегова Г.В., Бурмистров В.А., Родионов П.П. Исследование состояния серебра в серебросодержащих антибактериальных препаратах арговит и аргогель // Применение препаратов серебра в медицине: Сб. тр. науч.-практ. конф. «Новые химические системы и процессы в медицине». — Новосибирск, 2004. — С. 58—63.
6. Томилина И.И., Гремячих В.А., Мильников А.П., Комов В.Т. Изменение биологических параметров пресноводных гетеротрофных жгутиконосцев и ветвистоусых ракообразных при действии нано- и микрочастиц оксидов металлов // Биология внутр. вод. — 2011. — № 4. — С. 79—89.
7. Тригуб А.Г., Гершкович Д.М., Спиркина Н.Е. Воздействие коллоидного серебра на *Daphnia magna* Straus и *Scenedesmus quadricauda* Turp. // Материалы Междунар. молодеж. науч. форума «ЛОМОНОСОВ-2012» — М.: МАКСПресс, 2012. — С. 103.
8. Ahamed M., Alsalhi M.S., Siddiqui M.K.J. Silver nanoparticle applications and human health // Clinica Chimica Acta. — 2010. — Vol. 411. — P. 1841—1848.
9. Asghari S., Johari S.A., Lee J.H. et al. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna* // J. Nanobiotechnology. — 2012. — (<http://www.jnanobiotechnology.com/content/10/1/14>, doi: 10.1186/1477-3155-1014).
10. Baun A., Hartmann N.B., Grieger K., Kusk K.O. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing // Ecotoxicology. — 2008. — Vol. 17. — P. 387—395.
11. Bianchini A., Wood C. M. Mechanism of acute silver toxicity in *Daphnia magna* // Environ. Toxicol. Chem. — 2003. — Vol. 22, N 6. — P. 1361—1367.
12. Biswas P., Wu Ch. Nanoparticles and the environment // J. of the Air & Waste Manag. Assoc. — 2005. — Vol. 55. — P. 708—746.

13. *Cho K.H., Park J.E., Osaka T., Park S.G.* The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient // *Electrochemical Acta*. — 2005. — Vol. 51. — P. 956—960.
14. *Fabrega J., Luoma S. N., Tyler Ch. R. et al.* Silver nanoparticles: Behavior and effects in the aquatic environment // *Environ. Intern.* — 2011. — Vol. 37. — P. 517—531.
15. *Geller W., Mueller H.* The filtration apparatus of cladocera — filter mesh-sizes and their implications on food selectivity // *Oecologia*. — 1981. — Vol. 49. — P. 316—321.
16. *Griffitt R.J., Luo J., Gao J. et al.* Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms // *Environ. Toxicol. Chem.* — 2008. — Vol. 27, N 9. — P. 1972—1978.
17. *Handy R.D., Kammer F., Lead J.R. et al.* The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles // *Ecotoxicology*. — 2008. — Vol. 17. — P. 287—314.
18. *Holsapple M. P., Farland W.H.* Toxicological and safety evaluation of nanomaterials // *Toxicol. Sci.* — 2005. — Vol. 88, N 1. — P. 12— 17.
19. *Shahverdi A., Fakhimi A., Shahverdi H.R., Minaian S.* Synthesis and effect of silver nanoparticles on antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Echerichia coli* // *Nanomedicine, Nanotechnology, Biology and Medicine*. — 2007. — Vol. 3. — P. 168—171.
20. *Sokal R.R., Rohlf F.J.* Biometry. The principals and practice of statistics in biological research. — New York.:W.H. Freeman and Co, 1995. — 887 p.
21. *Zhu S., Oberdorster E., Haasch M.L.* Toxicity of an engineered nanoparticles (fullerene, C₆₀) in two aquatic species, *Daphnia* and fathead minnow // *Mar. Environ. Res.* — 2006. — Vol. 62. — P. S5— S9.

Институт биологии внутренних вод РАН,
Борок, РФ

Поступила 05.12.13