

## БИОЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МОДЕЛЬНОГО ВОДОЁМА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЗАГРЯЗНЕНИИ МЕТАЛЛАМИ В НАНОФОРМЕ

В ходе производства наночастицы неизбежно попадают в окружающую среду, в том числе и в водную, что приводит к изменению качества воды и представляет опасность для водных организмов. В этой связи целесообразными являются исследования по оценке действия наночастиц металлов на водных гидробионтов по показателям выживаемости, с определением потенциальных рисков, возникающих при поступлении наночастиц этих металлов в водные биоценозы.

Получены результаты выживаемости тест-объектов *Lemna minor* L., *Limnea stagnalis*, *Danio rerio* при экспериментальном загрязнении наночастицами металлов Fe, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Ni, NiO. Показано, что выживаемость тест-организмов снижалась вне зависимости от концентрации и к концу эксперимента была равна 0 %, во всех изучаемых группах, кроме групп с наночастицами Ni. Так, для *Limnea stagnalis* выживаемость составила 69%, а для *Danio rerio* 67%. Выявлены пределы толерантности *Limnea stagnalis* (1 – 56 сутки) и *Danio rerio* (1 – 43 сутки) к присутствию в среде обитания изучаемых наночастиц. Установлено, что токсичность наночастиц увеличивается в ряду Ni→NiO→Fe→Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> вне зависимости от концентрации и периода воздействия.

Показано, что наночастицы железа и его оксида во всех исследуемых концентрациях, представляют большую опасность для гидробионтов в условиях искусственно созданного аквабиоценоза с отсутствием признаков адаптации, в сравнении с наночастицами Ni и NiO, вследствие их наибольшей токсичности.

**Ключевые слова:** наночастицы Fe, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Ni, NiO, биотоксичность, выживаемость, пресноводные гидробионты (*Limnea stagnalis*, *Danio rerio*)

В связи с бурным внедрением наноиндустрии в промышленность, проблема влияния наночастиц (НЧ) металлов на живые организмы и окружающую среду стала актуальной. Большое количество исследований свойств нанообъектов выявило ряд вопросов, которые касаются безопасности их применения. Как известно, нанообъектам присущи особые физико-химические свойства, отличающие их от свойств этих же веществ в макромолекулярном состоянии. НЧ, как правило, легче вступают в химические реакции, способны образовывать комплексы с новыми, неизвестными ранее свойствами [1], [2].

В ходе производства, НЧ неизбежно попадают в окружающую среду, в том числе и в водную, что приводит к изменению качества воды и представляет опасность для водных организмов [3].

Специфические свойства металлических НЧ непосредственно связаны с их размерностью, химическим составом, формой и поверхностным зарядом, и позволяют широко применять их в наноиндустрии [4], [5]. Последнее время, уделяется внимание безопасности их использования, т. к. некоторые исследования

продемонстрировали потенциальную цитотоксичность для многих водных организмов, вызванную оксидативным стрессовым эффектом (окислительным стрессом) [6]–[8].

Присутствие в водной среде ионов увеличивает скорость оседания НЧ, что уменьшает их воздействие на пелагические организмы, но, в свою очередь, увеличивает воздействие на бентосные организмы [9].

Дискуссионным остается вопрос воздействия НЧ на водные растения, т. к. они являются продовольственной базой, т. е. источником пищи для многих водных организмов высшего трофического уровня [10]. Некоторые металлы в форме НЧ влияют на фотосинтез водных растений, приводят к нарушениям в цитоплазматической мембране и тилакоидах [11].

В силу высокой реакционной способности и отличительных биологических и химических свойств, предсказать, при каких условиях НЧ создают риски для живых организмов, является сложной задачей.

Несмотря на широкий спектр исследований по данной проблематике, наука располагает противоречивыми сведениями по влиянию металлов в виде НЧ на живые организмы.

В этой связи, целью данного исследования явилась оценка действия НЧ Ni, Fe и их оксидов на водных гидробионтов по показателям выживаемости, с определением потенциальных рисков, возникающих при поступлении НЧ этих металлов в водные биоценозы.

**Материалы и методы**

В качестве модельных организмов использовали: ряску малую (*Lemna minor L.*) вследствие быстрого роста, малого размера, плавающих листьев и высокой способности к поглощению поллютантов, прудовика обыкновенного (*Limnea stagnalis*) как представителя эпибентоса, играющего важную роль в круговороте органического вещества в водных экосистемах, и рыб (*Danio rerio*), находящихся наряду с водными млекопитающими находятся в области конечного звена трофической цепи водных экосистем. Выбранные тест-объекты не имели каких-либо признаков повреждений или заболеваний.

Выращивались и содержались объекты исследования в соответствии с правилами OECD (1992).

В исследовании были использованы НЧ Ni, NiO, Fe, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, характеристика которых представлена в таблице 1.

Наночастицы металлов были взяты с установленными дозировками (табл. 2).

Для содержания тест-организмов использовали 13 аквариумов, объемом 10 литров. Было сформировано 13 опытных групп с определенным количеством особей: ряска малая (*Lemna minor L.*) 100 экз., прудовик обыкновенный (*Limnea stagnalis*) 10 особей, данио-рерио (*Danio rerio*) 15 особей. В каждом аквариуме присутствовала система фильтрации и система насыщения воды кислородом воздуха (содержание растворенного в воде кислорода должно быть не менее 4 мг/дм<sup>3</sup>). На протяжении всего эксперимента в аквариуме поддерживалась температура 25±1 °С, рН=7,3, освещение аквариумов осуществлялось не менее 8 часов в сутки.

Таблица 1 – Характеристики используемых НЧ металлов

Наименование наночастиц	Размер, нм	Химический и фазовый состав	Метод получения	Удельная поверхность (S <sub>уд</sub> , м <sup>2</sup> /г)
Ni	70	Ni = 99,758%, Mg=0,041%, Al=0,058%, Si=0,049%, S=0,005%, Ti=0,01%, Fe=0,047%, Co=0,032%	электрический взрыв проводника в атмосфере воздуха	4,5 – 6,0
NiO	94	Оксид двухвалентного никеля, NiO: 99,6 масс.	Плазмохимический синтез	12
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	65	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> не менее 99% масс., около 1% масс. – адсорбированные газы: CH <sub>4</sub> , CO <sub>2</sub> , O <sub>2</sub> , N <sub>2</sub>	электрический взрыв проводника в атмосфере воздуха	10
Fe	90	металлическое железо (не менее 99,8% масс.) и сорбированные газы: CH <sub>4</sub> , CO <sub>2</sub> , Ar, N <sub>2</sub> .	электрический взрыв проводника в атмосфере аргона	7,7

Таблица 2 – Дозировка НЧ металлов

НЧ	Дозировка, мг/дм <sup>3</sup>		
	0,013	0,13	1,3
NiO	0,013	0,13	1,3
Ni	0,01	0,1	1,0
Fe	0,1	1,0	10,0
Fe <sup>3</sup> O <sup>4</sup>	0,414	4,14	41,4

Для содержания тест-объектов использовали питьевую воду по ГОСТ Р 51232-98, которую отстаивали на протяжении 7 суток.

НЧ вводили с кормом для рыб (замороженные личинки комаров семейства *Chironomidae*) один раз в 7 суток во все аквариумы, кроме контроля.

Подготовка наночастиц осуществлялась на ультразвуковом диспергаторе.

В ходе эксперимента были учтены следующие показатели: внешний вид, поведенческие реакции и выживаемость гидробионтов.

### Результаты исследований

При анализе данных были выявлены различные эффекты воздействия НЧ металлов на тест-объекты. В ходе проведенных исследований, первыми на воздействие наночастиц отреагировали наиболее чувствительные из выбранных объектов – *Danio rerio*. Было выявлено, что в первые 40 суток НЧ металлов еще не повлияли на выживаемость тест-объектов, но к концу эксперимента, выживаемость во всех изучаемых концентрациях НЧ металлов была равна 0%.

Выживаемость в контроле оставалась 100%-й на протяжении всего эксперимента.

Наиболее токсичными оказались НЧ  $Fe_3O_4$ , так как при их максимальной дозировке (41,4 мг/дм<sup>3</sup>) гибель *Danio rerio* достигла своего максимума уже на 55 сутки (рис. 1).

Эквивалентные концентрации НЧ Fe не вызвали такого резкого токсического эффекта. Токсичность впервые проявилась на 43 сутки при максимальной концентрации НЧ Fe (10,0 мг/дм<sup>3</sup>). Выживаемость рыб снижалась плавно и достигла своего максимума на 76-й день в концентрациях 10,0 мг/дм<sup>3</sup> и 1,0 мг/дм<sup>3</sup>, на 81-й день при концентрации 0,1 мг/дм<sup>3</sup> (рис. 2).

Для проявления токсического эффекта в группе НЧ NiO потребовался более длительный контакт.

Так, выживаемость *Danio rerio* начала снижаться только на 58-й день. К концу эксперимента смертность во всех опытных группах достигла своего максимума (рис. 3).

В ходе исследования наночастицы никеля в концентрациях 0,01 мг/дм<sup>3</sup> и 0,1 мг/дм<sup>3</sup> не проявили токсического эффекта. Первые признаки токсичности проявились при концентрации 1,0 мг/дм<sup>3</sup> на 48-е сутки, выживаемость рыб составила 93%. На 55-е сутки выживаемость упала до 67% и оставалась стабильной до конца эксперимента (рис. 4).

При сравнении между собой максимальных дозировок исследуемых металлов очевидно, что наиболее токсичными являются НЧ  $Fe_3O_4$ , затем НЧ Fe и НЧ NiO соответственно (рис. 5).

В период исследования подопытные рыбы положительно реагировали на раздражители. В качестве раздражителей использовали стук по стенкам аквариума, всплеск воды и искус-

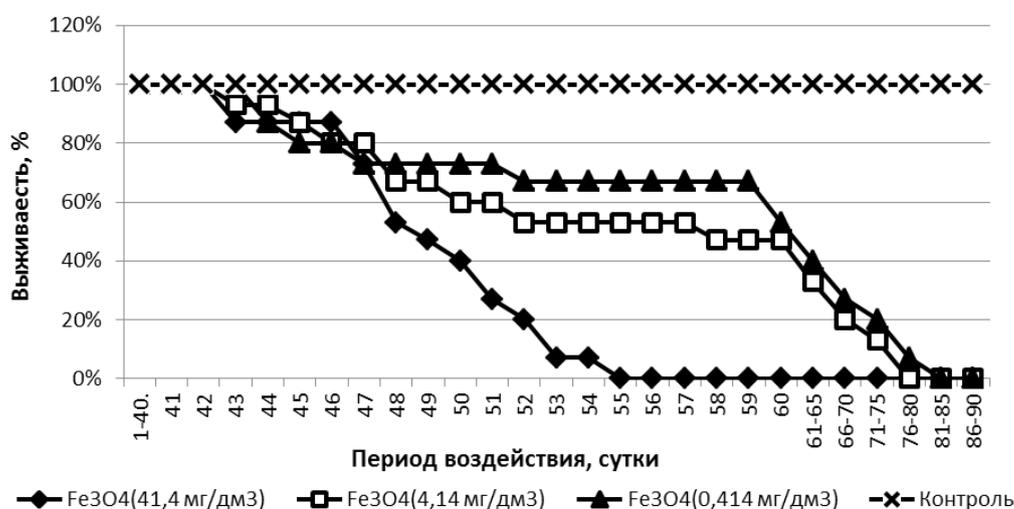


Рисунок 1 – Выживаемость *Danio rerio* при введении в среду обитания НЧ  $Fe_3O_4$  в различных концентрациях

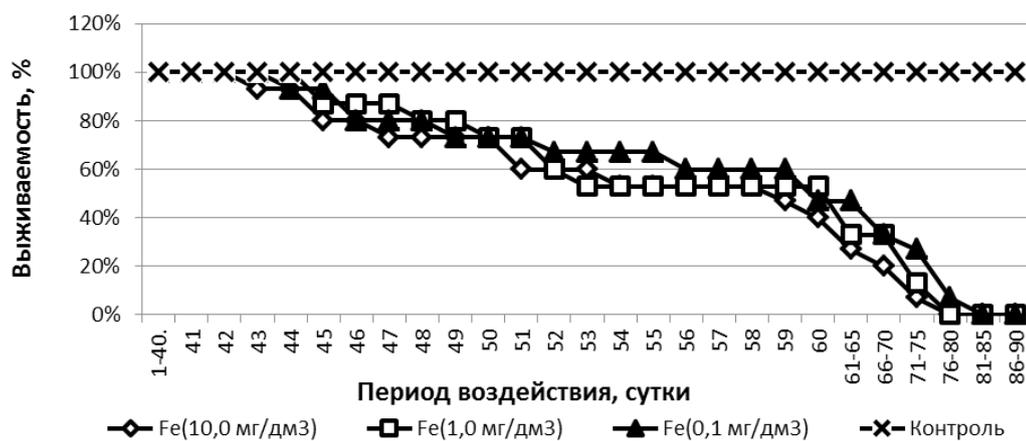


Рисунок 2 – Выживаемость *Danio rerio* при введении в среду обитания НЧ Fe различных концентрациях

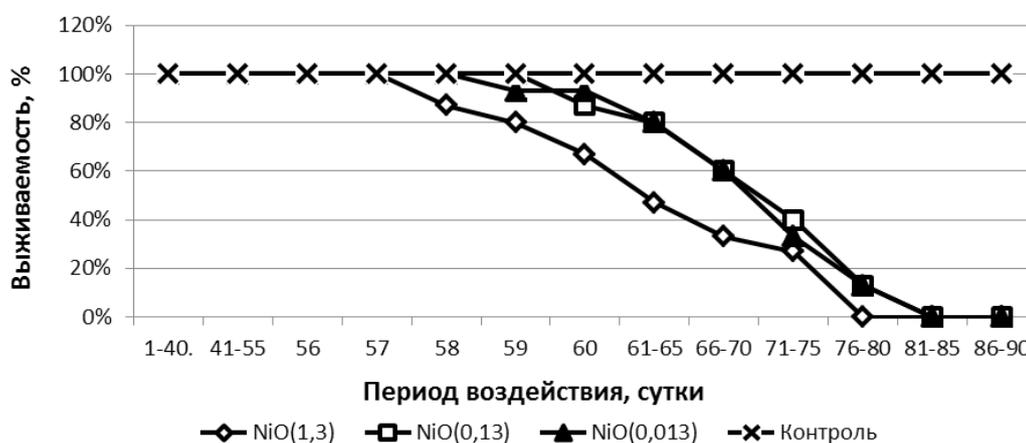


Рисунок 3 – Выживаемость *Danio rerio* при введении в среду обитания НЧ NiO в различных концентрациях

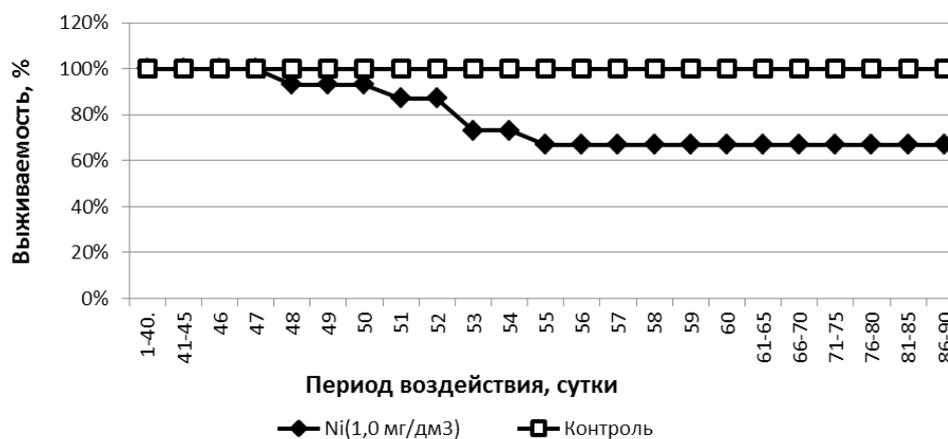


Рисунок 4 – Выживаемость *Danio rerio* при введении в среду обитания НЧ Ni в различных концентрациях

ственно создаваемый ток жидкости путем слабого вращения воды.

*Limnea stagnalis* оказались более токсикорезистентными к действию большинства наночастиц. Первые признаки токсического эффекта проявились у НЧ Fe и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> на 56 сутки эксперимента. При концентрации 0,1 мг/дм<sup>3</sup> для НЧ Fe и 0,414 мг/дм<sup>3</sup> для НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> обе группы относились к категории LOEC, т. е. концентрации, вызывающей 31 – 60% смертности тест-объекта. При дозировке в 1,0 мг/дм<sup>3</sup> для НЧ Fe была характерна категория LOEC, а вот для НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> категория сменилась на LC50, концентрация, которая вызывает 50% смертности. НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

дозировкой 41,4 мг/дм<sup>3</sup> на 56-е сутки проявил наивысшую токсичность, выживаемость составила 0%, а к концу эксперимента выживаемость была равна 0% и при добавлении НЧ NiO и Fe (рис. 6).

*Lemna minor* отреагировала на воздействие НЧ изменением цвета листецов. В группах при добавлении НЧ Fe и Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> в максимальных концентрациях наблюдали хлороз (пожелтение) и разьединение листецов.

В остальных опытных группах общее состояние растений (окраска листецов, размер лопастей, состояние корней) было в пределах нормы.

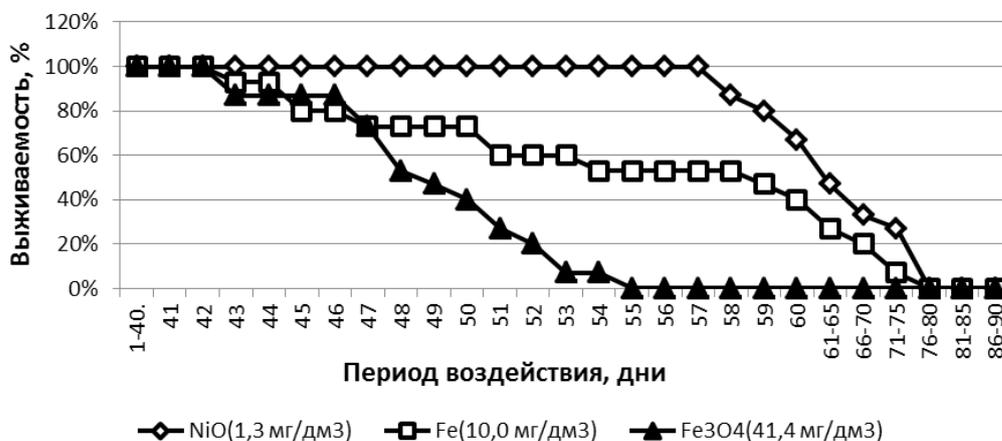


Рисунок 5 – Сравнение действия максимальных концентраций НЧ Fe, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и NiO на *Danio rerio*

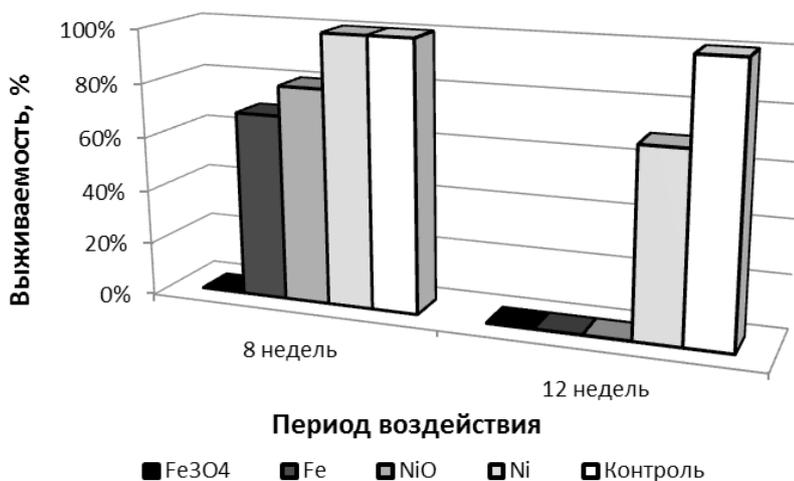


Рисунок 6 – Выживаемость *Limnea stagnalis* при максимальных концентрациях НЧ Fe, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> и NiO в конце эксперимента

**Обсуждение результатов**

Изучив сравнительную характеристику токсичности НЧ Fe, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, NiO, Ni были выявлены особенности адаптаций организмов различного уровня организации к присутствию в среде обитания указанных наночастиц с оценкой пределов их толерантности. При проведении теста на выживаемость организмов в условиях модельного аквабиоценоза был установлен ряд увеличения степени токсичности от НЧ Ni до НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> вне зависимости от концентрации и периода воздействия: Ni→NiO→Fe→Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

В отличие от *Limnea stagnalis* для *Danio rerio* влияние НЧ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> оказалось более токсичным, так уже на 43-е сутки смертность рыб достигла 13%, в то время как у *Limnea stagnalis* первый токсический эффект проявился только на 56-е сутки. Из литературы известно, что добавление НЧ приводит к увеличению активных форм кислорода, а это является доказательством окислительного стресса, который может привести к гибели клеток [12]–[14].

Механизм токсичности НЧ связан с выходом их ионов в водную среду и непосредственным взаимодействием их с мембранами клеток тестируемых объектов, что вызывает ингибирующее действие на клеточные функции [15]–[18].

Для НЧ Ni и NiO острая токсичность не свойственна [19]–[23]. Так гибель тест-организмов была зафиксирована только на 58–59-е сутки эксперимента и составляла 13%.

Однако длительный контакт (90 дней) привел к накоплению НЧ в тканях и повышению токсичности.

*Limnea stagnalis* в отличие от рыб характеризовались более высокой токсикорезистентностью к НЧ металлов Fe, NiO, что может быть обусловлено развитым механизмом детоксификации и регуляции ионного обмена [24]: 100% смертность зафиксирована у моллюсков лишь на 81-е сутки, когда у рыб уже на 76-е.

У *Lemna minor* под влиянием НЧ железа и его оксида было зафиксировано лишь изменение цвета листочков. Предполагается, что наночастицы повлияли как ингибиторы на квантовый выход фотосистемы II, что указывает на нарушение электронного транспорта. Внешне это проявилось как потеря листьями своего естественного зеленого цвета и искажение формы [25], [26].

**Выводы**

Таким образом, наночастицы железа и его оксида во всех исследуемых концентрациях, представляют большую опасность для гидробионтов в условиях искусственно созданных аквабиоценозов, в сравнении с наночастицами Ni и NiO, вследствие их высокой токсичности. В тоже время, проведенные эксперименты свидетельствуют о том, что высокая чувствительность представленных организмов позволяет их использовать в качестве биологических тестов с целью оценки токсичности водной среды.

24.04.2017

**Список литературы:**

1. Годымчук, А.Ю. Экология наноматериалов: учебное пособие / А.Ю. Годымчук, Г.Г.Савельев, А.П. Зыкова; под ред. Л.Н. Патрикеева и А.А. Ревинной. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. – 272 с.
2. Bhatt, I. Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment / I. Bhatt, B.N. Tripathi // Chemosphere. – 2011. – 82(3). – P. 308–317.
3. Ecotoxicological impacts of nanomaterials / D.Y. Lyon et al. // Weisner M.R., Bottero J-Y. Environmental nanotechnology: applications and implications of nanomaterials. – McGraw-Hill, New York, 2007. – P. 445–479.
4. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects / S.J. Klaine et al. // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2008. – 27(9). – P. 1825–1851.
5. Nanomaterials and the environment: a review for the biennium 2008–2010 / J.R. Peralta-Videa et al. // Journal of Hazardous Materials. – 2011. – 186(1). – P. 1–15.
6. Moore, M.N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? / M.N. Moore // Environmental International. – 2006. – №32. – P. 967–976.
7. Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish – a mechanistic analysis / R.D. Handy et al. // Ecotoxicology. – 2008. – №17. – P. 396–409.
8. Comparative evaluation of the toxicity of iron and its oxides nanoparticles using *Stylonchia mytilus* / D.B. Kosyan et al. // International Journal of the Bioflux Society. – №7. – 2015. – P. 453–460.
9. Stability and Aggregation of Metal Oxide Nanoparticles in Natural Aqueous Matrices / A.A. Keller et al. // Environmental Science & Technology. 2010. – 44. – P. 1962–1967
10. Studies on toxicity of aluminum oxide (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles to microalgae species: *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. / M. Sadiq et al. // J NanopartRes. – 2011. – 13(8). – P. 3287–3299.
11. Biototoxicity of nickel oxide nanoparticles and bio-remediation by microalgae *Chlorella vulgaris* / N. Gong et al. // Chemosphere. – 2011. – 83. – P. 510–516.

12. Toxic Effects of Nickel Oxide Bulk and Nanoparticles on the Aquatic Plant Lemnagibba L. / A. Oukarroum et al. // Biomed Res Int. – 2015. – 2015: 501326.
13. Toxicity of Nano-Zero Valent Iron to Freshwater and Marine Organisms / A.A. Keller et al. // PLoSOne. – 2012. – 7(8): e43983.
14. Zhu, X. Toxicity Assessment of Iron Oxide Nanoparticles in Zebrafish (Danio rerio) Early Life Stages / Zhu X., Tian Sh., Cai Zh. – September 27, 2012
15. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms / R.J. Griffitt et al. // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2008. – 27(9). – P. 1972–1978.
16. Ju-Nam, Y. Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications / Y. Ju-Nam, J.R. Lead // Science of the Total Environment. – 200. – 400(1–3). – P. 396–414.
17. Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests / A. Garcia et al. // Desalination. – 2011. – 269. – P. 136–141.
18. Acute effects of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZnO and CuO nanomaterials on Xenopus laevis / S. Nations et al. // Chemosphere. – 83. – P. 1053–1061.
19. Acute toxicity of 31 different nanoparticles to zebrafish (Danio rerio) tested in adulthood and in early life stages – comparative study / J.A. Kovrižnych et al. // InterdiscipToxicol. – 2013. – 6. – P. 67–73.
20. Long-term (30 days) toxicity of NiO nanoparticles for adult zebrafish Danio rerio / J.A. Kovrižnych et al. // InterdiscipToxicol. – 2014 March. – 7(1). – P. 23–26.
21. Унёва, И.А. Влияние оксидов тяжелых металлов на показатели роста и выживаемости аквариумных рыб гуппи / И.А. Унёва // Биологические науки. – Кубанский ГУ, 2012. – 48 с.
22. Influence of Ni NP on the induction of oxidative damage in eriticum vulgare / A.M. Korotkova, E.A. Sizova, S.V. Lebedev, N.N. Zyazin // Oriental journal of chemistry. – 2015. – Vol. 31, Number Special Issue. – P. 137–145.
23. Оценка влияния наночастиц никеля на искусственные аквабиоценозы / А.Е. Аринжанов и др. // Вестник ОГУ. – №6. – С. 113–116.
24. A comparative study on the internal defence system of juvenile and adult Lymnea stagnalis / R. Dikkeboom, W. P. Van der Knaap, E. A. Meuleman, T. A. Sminia // Immunology. – 1985. – Vol. 55. – No 3. – P. 547–553.
25. Yausheva, E. Evaluation of biogenic characteristics of iron nanoparticles and its alloys in vitro / E. Yausheva, E. Sizova, S. Miroshnikov // Modern Applied Science, 2015. – Vol. 9, Iss. 9. – P. 65–71.
26. Influence of alpha and gamma-iron oxide nanoparticles on marine microalgae species / V. Demir et al. // Bull Environ Contam Toxicol. – 2015 December. – 95(6). – P. 752–757.

#### Сведения об авторах:

**Кожевникова Елена Александровна**, студентка химико-биологического факультета  
Оренбургского государственного университета  
460018, г. Оренбург, пр-т Победы, 13, e-mail: kozhevnicova-a@mail.ru

**Леднева Светлана Александровна**, студентка химико-биологического факультета  
Оренбургского государственного университета  
460018, г. Оренбург, пр-т Победы, 13, e-mail: Ledneva\_SA@mail.ru

**Сизова Елена Анатольевна**, доцент кафедры биологии и почвоведения  
Оренбургского государственного университета, руководитель лаборатории  
«Агроэкология техногенных наноматериалов» Всероссийского научно-исследовательского института  
мясного скотоводства, кандидат биологических наук  
460018, г. Оренбург, пр-т Победы, 13, e-mail: Sizova.L78@yandex.ru

**Аринжанов Азамат Ерсанович**, старший преподаватель кафедры биотехнологии животного сырья  
и аквакультуры Оренбургского государственного университета, кандидат сельскохозяйственных наук  
460018, г. Оренбург, пр-т Победы, 13, e-mail: arin.azamat@mail.ru