

**НАРУШЕНИЕ РАВНОВЕСИЯ В МИКРОБИОЦЕНОЗЕ КИШЕЧНИКА
Danio rerio (Hamilton, 1882) И УГНЕТЕНИЕ ЗАЩИТНЫХ МЕХАНИЗМОВ
ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ НИКЕЛЬСОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦ**

© 2019 г. В. А. Багиров¹, Е. А. Сизова^{2,3,*}, Е. П. Мирошникова³, И. А. Гавриш², А. В. Коновалов⁴

¹Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста,
Россия 142132 Московская область, пос. Дубровицы, д. 60

²Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук,
Россия 460000 Оренбург, ул. 9-го Января, д. 29

³Оренбургский государственный университет, Россия 460013 Оренбург, пр. Победы, д. 13

⁴Ярославский научно-исследовательский институт животноводства и кормопроизводства Федерального научного
центра кормопроизводства и агроэкологии им. В.Р. Вильямса,
Россия 150517 Ярославская обл., Ярославский район, пос. Михайловский, ул. Ленина, д. 1

*e-mail: Sizova.L78@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.11.2016 г.

После доработки 08.04.2017 г.

Принята к публикации 12.05.2017 г.

Изучено состояние антиоксидантной системы и микробиоценоза кишечника *Danio rerio* (Hamilton, 1882) при внесении в среду обитания наночастиц никеля и его оксида. Установлено, что токсический эффект наночастиц развивается по пути индукции окислительного стресса и сопровождается качественной реорганизацией микробиоценоза кишечника и угнетением защитных механизмов. Низкая дозовая нагрузка и кратковременный контакт тест-объекта с наночастицами никеля приводят к активизации системы антиоксидантной защиты организма в ответ на образование свободных радикалов. Хронические условия и высокие дозы истощают антиоксидантную систему организма на фоне гиперпродукции свободных радикалов при окислительном стрессе. Установлено изменение видового разнообразия микроорганизмов, в частности замена *Citrobacter* и *Enterobacter* на *Rhodobacter* и *Methylobacterium* (при внесении наночастиц оксида никеля) и *Bacillus*, *Acinetobacter* и *Rhodobacter* (наночастиц никеля), т.е. замещение нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта транзитной. Повышение в среде обитания количества никеля в форме наночастиц неизбежно приводит к их кумуляции в теле гидробионтов с выраженностью эффекта при хронических условиях.

Ключевые слова: *Danio rerio*, выживаемость, микробиоценоз кишечника, каталаза, супероксиддисмутаза, наночастицы никеля, оксида никеля

DOI: 10.1134/S0320965219010030

ВВЕДЕНИЕ

Проблема влияния наночастиц металлов на живые системы стала актуальной в последние десятилетия в связи с их широким применением в промышленности [33]. Особый комплекс физико-химических свойств и характеристик биологического действия наночастиц и наноматериалов, радикально отличающихся от свойств этого же вещества или материала в форме сплошных фаз или макроскопических дисперсий, характеризует их как новый вид материалов и продукции с обязательной оценкой потенциального риска для окружающей среды и здоровья человека [6]. Размер таких частиц обеспечивает многократное возрастание их суммарной поверхности и проникающей способности и дает значительные воз-

можности для коррекции различных патологических процессов, в то же время представляя опасность для сохранности структуры и функции нормальных клеток и тканей. Поскольку многие металлы оказывают влияние на функциональное состояние организма, в том числе антиоксидантной системы, вызывает беспокойство тот факт, что наночастицы в технологическом цикле производства неизбежно попадают в почву и, вымываясь, могут переноситься в водоемы [27]. Поэтому изучение влияния наночастиц на жизнедеятельность водных организмов, показателей их физиологического статуса и возможности использования для биоиндикации и биоремедиации антропогенно загрязненных водоемов имеет научную и практическую значимость. Широкий спектр живых организмов позволяет с учетом

всех токсикологических особенностей соединений исследовать их биологическую активность [1]. Имеются данные об исследовании ряда наночастиц *in vitro* [32]. Однако для никеля их недостаточно [40], несмотря на признание его приоритетным загрязнителем биосферы [10].

Цель работы – определение эколого-токсических эффектов наночастиц никеля и оксида никеля в водной среде с использованием рыб *Danio rerio* в качестве тест-объекта.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы наночастицы никеля (Ni-НЧ) и оксида никеля (NiO-НЧ), полученные методом электрического взрыва проводника в атмосфере (“Передовые порошковые технологии”, Россия): Ni-НЧ размером 70 нм, с удельной поверхностью ($S_{уд}$) 4.6–6.0 м²/г, Z-потенциалом 25 ± 0.5 мВ, дозой 1.0 мг/дм³; NiO-НЧ – 94 нм, ($S_{уд}$) 12 м²/г, 29 ± 0.5 мВ, 1.3 мг/дм³.

Для выполнения эксперимента из 330 особей использовали 105 особей *Danio rerio* (вид пресноводных лучеперых рыб семейства карповых) возрастом 1 мес. В течение 21 сут (предварительный этап эксперимента) их содержали в условиях аквариума объемом 300 л. Затем методом пар-аналогов формировали семь групп по 15 экз., помещая каждую в отдельный аквариум объемом 10 л, в воду которого 1 раз в 7 сут добавляли исследуемые наночастицы в форме лиозолей с кормом для рыб (личинки комаров сем. Chironomidae) [30]: для I группы дозировкой – 0.01 мг/дм³ (n) Ni-НЧ, для II – 0.1 мг/дм³ (10 n) Ni-НЧ, III – 1 мг/дм³ (100 n) Ni-НЧ, IV – 0.013 мг/дм³ (n) NiO-НЧ, V – 0.13 мг/дм³ (10 n) NiO-НЧ, VI – 1.3 мг/дм³ (100 n) NiO-НЧ; VII группа – контроль (без добавления наночастиц). Для подготовки лиозолей наночастицы подвергали диспергированию (УЗДН-2Т, “НПП Академприбор”, Россия) при $f = 35$ кГц, 300 Вт, $A = 10$ мкА, 30 мин. Основной учетный период эксперимента длился 84 сут.

Во время эксперимента средние значения тестируемых свойств воды были следующие: температура – 22 ± 2°C, pH 7.3 ± 0.07, растворенный кислород 5 ± 0.2 мг/л. Режим содержания обеспечивал 12 ч света/12 ч темноты. Рыб кормили 1 раз в 2 сут. Условия выращивания и содержания объектов исследования соответствовали правилам OECD [29].

Использование животных и экспериментальные исследования выполняли в соответствии с Российским регламентом, 1987 (Приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977) и The Guide for Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press, Washington, D.C., 1996).

Определение активности ферментов антиоксидантной системы и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) проводили через 7, 14 и 84 сут после гомогенизирования *Danio rerio* (“TissueLyser LT”, “Qiagen N.V.”, Германия) и приготовления вытяжки. Для этого к 1 объему гомогената добавляли 9 объемов трис-буферного раствора, ммоль/л: (трис-HCl – 50, дитиотреитол DTT – 1.0, EDTA – 1.0, сахароза – 250, pH 7.5). После центрифугирования (10 мин при 15000 об./мин) отбирали супернатант, в котором измеряли содержание малонового диальдегида (МДА, ммоль/мл) [12], и активность ключевых ферментов антиоксидантной системы – каталазы (КТ, КФ 1.11.1.6, мкМ H₂O₂/мин) и супероксид-дисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1, % ингибирования адреналина), используя автоматический биохимический анализатор CS-T240 (“Dirui Industrial Co., Ltd.”, Китай) и коммерческие биохимические наборы для ветеринарии (“Randox Laboratories, Ltd.”, Великобритания).

Исследования проводили в лаборатории “Агроэкология техногенных наноматериалов” и Испытательном центре Всероссийского научно-исследовательского института мясного скотоводства (аттестат аккредитации RA. RU.21ПФ59 от 02.12.2015).

Метагеномный анализ содержимого кишечника рыб проводили в Центре коллективного пользования “Персистенция микроорганизмов” Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН. Оценка микробного биоразнообразия включала: отбор проб, выделение, очистку и измерение концентраций ДНК, проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР), валидацию и нормализацию библиотек с последующим секвенированием на платформе высокопроизводительного секвенатора второго поколения “MiSeq Illumina”, США.

После вскрытия рыб, кишечника помещали в стерильные микропробирки типа “эппендорф” (Nuova Artasa S.R.L., Италия), замораживали и хранили при –70°C, затем использовали для выделения очищенных препаратов ДНК [2].

После выделения и очистки измеряли концентрацию ДНК в растворе двумя методами – на приборах Nanodrop (“Thermo Scientific”, USA) для построения кривых оптической плотности ДНК и оценки показателя ОП (260)/ОП (280) и Qubit 2.0 (“Invitrogen/Life Technologies”, USA) для определения концентрации в нг/мкл. Концентрацию ДНК измеряли три раза: первый – после выделения ДНК, второй – после проведения первой ПЦР со специфичными 16S прокариотическими праймерами и третий раз – после второй ПЦР с адаптерами и индексами протоколов Nextera XT. Дальнейший анализ микрофлоры осуществляли методом метагеномного секвенирования.

Объединение ридов (R1 и R2) проводили с использованием программы PEAR (Pair-End AssembleR, PEAR v0.9.8, April 9, 2015) при следующих параметрах: минимальное перекрытие – 40 пн (Minimum overlap – 40 bp), p -value – 0.001, качество $Q = 30$ (<http://www.exelixis-lab.org/web/software/pear>) [41]. Фильтрацию, дерепликацию, удаление химерных последовательностей, кластеризацию, сортировку (отсечки singletons), удаление контаминации проводили с использованием программы USEARCH v8.0. Для фильтрации применяли алгоритм fastq_filter, с минимальной длиной сиквенса 415 пн; минимальное качество прочтения $Q = 15$), для репликации – алгоритм derep_prefix, для кластеризации и удаления химерных последовательностей – алгоритм cluster_otus (<http://drive5.com/usearch>) [18]. Для визуализации использовали ресурс VAMPS (Visualization and Analysis of Microbial Population Structures <https://vamps.mbl.edu/>) [23].

Концентрацию никеля в тканях тела *Danio rerio* определяли в лаборатории АНО “Центр биотической медицины”, Москва (аттестат аккредитации ГСЭН.RU.ЦАО.311, регистрационный номер в Государственном реестре РОСС RU.0001.513118) методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (МС-ИСП) на квадрупольном масс-спектрометре Elan 9000 (Perkin Elmer, США).

Статистический анализ проводили путем сравнения опытных групп с контрольной, используя SPSS 19.0 программного обеспечения (IBM Corporation) и Statistica 10. Статистически значимыми считали значения с $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выживаемость и показатели антиоксидантного статуса *Danio rerio*. В ходе эксперимента (84 сут) Ni-НЧ и NiO-НЧ оказали влияние на выживаемость тест-объекта (табл. 1). Увеличение концентраций NiO-НЧ сопровождалось снижением выживаемости *Danio rerio* на 56-е сут эксперимента при максимальной дозировке (100 n), с последующим прогрессивным снижением численности (рис. 1). Эквивалентные концентрации Ni-НЧ не вызвали подобного токсического эффекта. В контроле выживаемость была 100%.

Анализ активности МДА в организме *Danio rerio* не показал его критического увеличения, лишь к концу эксперимента с Ni-НЧ (табл. 2) значение МДА превышало контрольное.

Семисуточная экспозиция *Danio rerio* в среде с возрастающими концентрациями наночастиц привела к подавлению выработки ферментов антиоксидантной защиты. Так, активность СОД в опыте была ниже контрольной для NiO-НЧ на 49%, Ni-НЧ – на 67% (табл. 3).

Таблица 1. Влияние Ni-НЧ и NiO-НЧ на выживаемость *Danio rerio*

Время эксперимента, сут	Дозировка, мг/дм ³		
	n	10 n	100 n
7	<u>NOEC</u>	<u>NOEC</u>	<u>NOEC</u>
	NOEC	NOEC	NOEC
28	<u>NOEC</u>	<u>NOEC</u>	<u>NOEC</u>
	NOEC	NOEC	NOEC
56	<u>NOEC</u>	<u>NOEC</u>	<u>NOEC</u>
	NOEC	NOEC	LOEC
84	<u>NOEC</u>	<u>NOEC</u>	<u>NOEC</u>
	Tox	Tox	Tox

Примечание. Над чертой – Ni-НЧ, 0.01 мг/дм³, под чертой – NiO-НЧ, 0.013 мг/дм³; Tox – концентрации, вызывающие 0–39% выживаемости объекта; LOEC – 40–69% выживаемости объекта, NOEC – 70–100% выживаемости объекта.

Увеличение экспозиции до 14 сут вызвало возрастание активности СОД при минимальной (n) и средней (10 n) дозовых нагрузках, причем максимальная разница (103%, $p < 0.05$) отмечена для NiO-НЧ при дозировке n . Высокие концентрации NiO-НЧ (100 n) привели к ингибированию активности СОД, следовательно, отсутствию антиоксидантной защиты организма.

Активность КТ в вытяжках *Danio rerio* в эксперименте значительно превышала показатели в контроле. Низкий (n) и средний (10 n) уровень дозировки индуцировал активность КТ на первом этапе эксперимента (7 сут), стимулируя работу антиоксидантной системы. Увеличение экспозиции до 84 сут угнетало работу систем, приводя к снижению активности КТ. Высокий дозовый

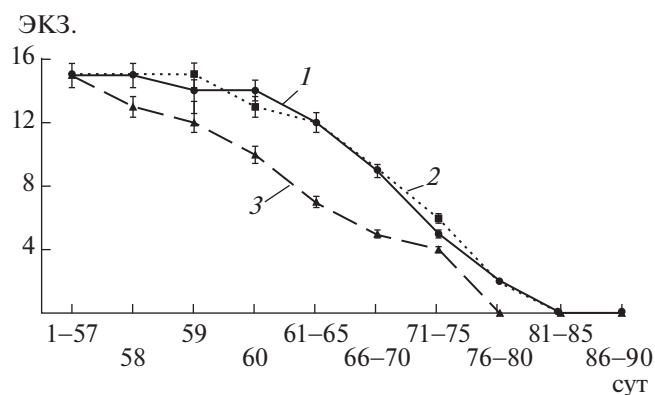


Рис. 1. Динамика численности *Danio rerio* при внесении в среду NiO-НЧ в дозах: 1 – 0.013 мг/дм³, 2 – 0.13 мг/дм³, 3 – 1.3 мг/дм³. Выживаемость в контроле 100%. По оси ординат – численность, по оси абсцисс – время экспозиции.

Таблица 2. Показатели МДА в теле *Danio rerio*

Дозы, мг/дм ³	МДА (нмоль/мл)		
	7 сут	14 сут	84 сут
<i>n</i>	0.569 ± 0.036 0.596 ± 0.007	0.346 ± 0.006 0.481 ± 0.015^a	0.541 ± 0.005^a –
10 <i>n</i>	0.615 ± 0.004 0.481 ± 0.009	0.423 ± 0.001 0.135 ± 0.007^a	0.963 ± 0.007^a –
100 <i>n</i>	0.423 ± 0.006 0.557 ± 0.015	0.347 ± 0.005 0.365 ± 0.008	0.953 ± 0.001^b –
Контроль	0.691 ± 0.005	0.461 ± 0.008	0.311 ± 0.111

Примечание. Над чертой – Ni-НЧ, под чертой – NiO-НЧ. “–” – гибель организма. Здесь и в табл. 3 при сравнении экспериментальных образцов с контрольными: ^a $p < 0.05$; ^b $p < 0.01$.

Таблица 3. Активность супероксиддисмутазы и каталазы в вытяжках *Danio rerio*

Дозы	СОД, %			КТ, мкМ H ₂ O ₂ /мин		
	7 сут	14 сут	84 сут	7 сут	14 сут	84 сут
Ni-НЧ						
<i>n</i>	48.7 ± 0.9^b	51.3 ± 2.2	95.6 ± 1.2^b	122.3 ± 1.2^b	72.7 ± 2.4^b	33.7 ± 1.5^a
10 <i>n</i>	24.7 ± 4.6^b	67.9 ± 1.1^b	25.9 ± 8.0^a	100.6 ± 0.9^b	100.2 ± 3.3^b	33.7 ± 1.6^a
100 <i>n</i>	23.3 ± 2.3^b	40.0 ± 3.4	20.1 ± 1.5^b	85.1 ± 0.8^b	93.9 ± 2.7^b	33.8 ± 1.0^a
Контроль	70.6 ± 0.5	47.6 ± 0.6	59.3 ± 1.8	14.6 ± 1.4	16.2 ± 0.3	23.1 ± 0.8
NiO-НЧ						
<i>n</i>	60 ± 5.9	96.9 ± 2.0^b	–	164.0 ± 1.5^b	65.6 ± 2.6^b	–
10 <i>n</i>	10.2 ± 1.5^b	81.6 ± 2.1^b	–	105.1 ± 0.7^b	109.0 ± 3.1^b	–
100 <i>n</i>	36.2 ± 4.6^b	26.8 ± 2.3^b	–	30.1 ± 1.1^b	94.8 ± 2.5^b	–
Контроль	70.6 ± 0.5	47.6 ± 0.6	59.3 ± 1.8	14.6 ± 1.4	16.2 ± 0.3	23.1 ± 0.8

уровень (100 *n*) вызывал ингибирование активности фермента уже на первом этапе эксперимента (7 сут), усугубляя процесс, по мере приближения эксперимента к завершению, с разовым повышением на этапе 14 сут.

Таким образом, низкая дозовая нагрузка и кратковременный контакт тест-объекта с наночастицами никеля приводят к активизации системы антиоксидантной защиты организма в ответ на образование свободных радикалов. Хронические условия и высокие дозы истощают антиоксидантную систему организма на фоне гиперпродукции свободных радикалов при ОС.

Анализ концентрации никеля в теле *Danio rerio* показал достоверно значимое ее отличие от аналогичного показателя у контрольных особей (рис. 2). Так, уровень естественной концентрации Ni в течение эксперимента имел незначительные колебания (0.696–1.17 мкг/г). Резкое увеличение уровня Ni (разница с контролем 849%, $p < 0.05$) в теле рыб на седьмые сутки эксперимента зафиксировано в ответ на присутствие в среде только NiO-НЧ, с

последующим уменьшением показателей ниже уровня контроля к 14-м сут. Система гомеостатического регулирования микроэлементов обеспечила постоянство уровня металла в организме и снизила его количество до уровня контроля к 14-м сут.

Дальнейшее увеличение экспозиции эксперимента (21, 28-м сут) не привело к пиковым отличиям концентрации никеля в опытных и контрольных образцах, величина которой на 21-е сут превысила контроль на 95.1% ($p < 0.05$), к 28 – снизилась на 44.3% ($p < 0.05$). Контакт тест-объекта с Ni-НЧ характеризовался волнообразным изменением значений концентрации никеля. За первые 3 нед эксперимента отмечено накопление никеля в теле *Danio rerio* при разнице с контролем на 7-е сут 95.7% ($p < 0.05$), на 14-е – 52.9%, на 21-е сут – 92.2% ($p < 0.05$). Хронические условия эксперимента увеличили разницу с контролем до 160.7% ($p < 0.01$), что привело к отложению в *Danio rerio* 17.25% никеля, поступившего в форме Ni-НЧ. Таким образом, по скорости и реакционности развития эффектов доминируют NiO-НЧ, по-

этому их можно характеризовать как остротоксичные. Ni-НЧ обладают способностью к кумуляции, проявляя хронический токсический эффект.

Микробиоценоз кишечника *Danio rerio*. Таксономический анализ показал, что у контрольных рыб микробиоценоз кишечника *Danio rerio* в основном состоял из представителей филума Proteobacteria при относительно небольшой численности Firmicutes и Actinobacteria. Использование в питании рыб наночастиц значительно изменило состав микробиоценоза (табл. 4). В кишечнике рыб, получавших NiO-НЧ, на фоне снижения численности представителей Proteobacteria до 21% численность Firmicutes, Actinobacteria (грамположительные бактерии) повысилась в 2.18 и 6.79 раза, соответственно. Отмечено появление Fusobacteria (менее 2%), не обнаруженного в контроле. В кишечнике рыб, получавших Ni-НЧ, численность представителей Proteobacteria снизилась в 1.5 раза.

В кишечниках контрольных рыб основная численность бактерий приходилась на классы Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria (филум Proteobacteria), доля других классов была 5.8% общей численности (по убыванию – Clostridia, Actinobacteria, Planctomycetia и Bacilli). В опытной группе с NiO-НЧ уменьшалось число представителей класса Alphaproteobacteria (в 1.27 раза меньше, чем в контроле), численность бактерий класса Gammaproteobacteria заметно снизилась (в 6.16 раза) по сравнению с контрольной группой, на фоне повышения численности представителей классов Actinobacteria и Bacilli (в 6.66 и 6.37 раза соответственно). Отмечено появление бактерий классов Fusobacteria и Verrucomicrobia.

По сравнению с контролем, в группе с Ni-НЧ в десятикратно снизилась численность доминирующего класса Gammaproteobacteria. Далее по убыванию численности расположились классы Alphaproteobacteria и Actinobacteria и незафиксированные в контроле классы Verrucomicrobia и Fusobacteria. Следует отметить возрастание количества актинобактерий и бацилл, а также бактерий класса Fusobacteria (грамотрицательной анаэробной палочки) в обеих опытных группах по сравнению с контролем (не отмечены в таблице ввиду $\leq 2\%$ численности).

Среди выявленных семейств доминирующее положение в кишечниках контрольных рыб занимало сем. Enterobacteriaceae, в меньшем количестве были представлены Aeromonadaceae, Pseudomonadaceae, причем аэромонады и псевдомонады традиционно считаются условно-патогенными микроорганизмами, а энтеробактерии составляют большую часть кишечной микрофлоры в норме [14]. Другие семейства были малочисленными (21.6% общего числа бактерий), по убыванию – Sotamonadaceae (3.32%), Rhodobacteraceae (2.23%) и

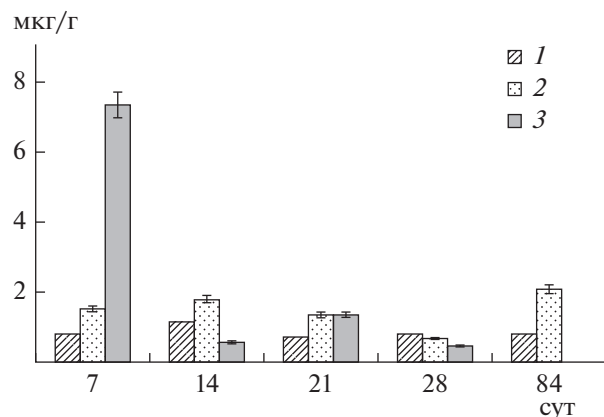


Рис. 2. Динамика концентрации никеля в теле *Danio rerio* (мкг/г) при внесении в среду НЧ: 1 – контроль; 2 – Ni-НЧ 100 н (1.0 мг/дм³); 3 – NiO-НЧ 100 н (1.3 мг/дм³).

Rhizobiaceae. Наличие в рационе рыб NiO-НЧ сопровождалось 18-кратным, по сравнению с контролем, ростом численности сем. Rhodobacteraceae класса Alphaproteobacteria. Зафиксированы новые сем. Moraxellaceae и Bacillaceae, не обнаруженные в контроле.

В группе с Ni-НЧ численность сем. Rhodobacteraceae возросла в 5.7 раза. Зафиксировано также появление семейств, не обнаруженных в контрольном образце (Bacillaceae, Staphylococcaceae, Ectothiorhodospiraceae) и описанных в литературе как патогенные микроорганизмы для рыб [37].

В контроле состав кишечной микробиоты был представлен преимущественно родами *Citrobacter* (*C. freundii*, *C. werkmanii*) и *Enterobacter* (*E. coli*). В опыте с NiO-НЧ (см. табл. 4) доминировали роды *Acinetobacter* (*A. baumannii* и *A. gernerii*) и *Bacillus* на фоне скудного качественного состава микроорганизмов.

В опыте с Ni-НЧ преобладали роды *Rhodobacter* (*R. gluconicum* и *R. ovatus*), *Methylobacterium* (*M. marchantiae*) и *Mycobacterium* (см. табл. 4).

Следует отметить, что в хроническом эксперименте (84 сут) изменения качественного состава микробиоценоза кишечника рыб, возможно, играют существенную роль в выживаемости тест-объектов, т. к. их контакт с NiO-НЧ привел к гибели всех животных, а с Ni-НЧ – 50 ± 9%.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Развитие окислительных процессов под воздействием наночастиц может демонстрировать уровень ПОЛ, оцениваемый по накоплению МДА [7]. В эксперименте не установлено критическое его увеличение в организме *Danio rerio* и лишь хроническое действие Ni-НЧ привело к повышению уровня МДА. Подобная картина отме-

Таблица 4. Таксономический состав микрофлоры (% общего числа бактерий) кишечника рыб *Danio rerio* после воздействия никельсодержащих наночастиц

Филум	Класс	Семейство	Род	Вид
Контроль				
Proteobacteria (93%)	Gammaproteobacteria (82%)	Аеромонадацевые (8.76%)	<i>Plesiomonas</i> (10.6%) <i>Tolomonas</i> (8.75%)	— <i>T. auensis</i> (8.75%)
		Псевдомонадацевые (4.88%)	<i>Pseudomonas</i> (4.88%)	<i>P. panipatensis</i> (2.33%)
	Alphaproteobacteria (6.33%)	Рhodobактерацевые (2.23%)	—	—
	Betaproteobacteria (3.87%)	Коммонадацевые (3.32%)	—	—
Firmicutes (2.49%)	Clostridia (2%)	—	—	—
		Энтеробактериальные (59.2%)	<i>Enterobacter</i> (16.3%) <i>Citrobacter</i> (25.6%)	<i>E. coli</i> (14.2%) <i>C. werkmanii</i> (8.34%) <i>C. freundii</i> (11.7%)
Другие (4.5%)	Другие (5.8%)	Другие (21.6%)	Другие (42.6%)	Другие (63%)
Через 28 сут контакта с NiO-НЧ				
Proteobacteria (20.6%)	Alphaproteobacteria (4.97%)	—	—	—
	Gammaproteobacteria (14.9%)	Моракселлацевые (10.8%)	<i>Acinetobacter</i> (10.8%)	<i>A. baumannii</i> (5.33%) <i>A. gerneri</i> (3.73%)
Actinobacteria (5.62%)	Actinobacteria (5.43%)	—	—	—
Firmicutes (8.76%)	Bacilli (7.54%)	Бациллаевые (2.99%)	<i>Bacillus</i> (2.92%)	—
Другие (5.59%)	Другие (8.53%)	Другие (38.7%)	Другие (47%)	Другие (90.9%)
Через 28 сут контакта с Ni-НЧ				
Proteobacteria (56.1%)	Alphaproteobacteria (46.1%)	Рhodobактерацевые (21.1%)	<i>Rhodobacter</i> (13.6%)	—
		Хантобактерацевые (10.4%)	<i>Labrys</i> (9.2%)	—
		Метхилобактериальные (3.95%)	<i>Methylobacterium</i> (3.95%)	<i>M. marchantiae</i> (2.4%)
		Родоспириллацевые (3.62%)	<i>Roseospira</i> (3.41%)	—
	Gammaproteobacteria (8.28%)	—	—	—
Actinobacteria (25.2%)	Actinobacteria (24.3%)	Микобактериальные (10.2%)	<i>Mycobacterium</i> (10.2%)	—
Planctomycetes (4.62%)	Planctomycetia (4.62%)	Планктомикетаевые (2.63%)	—	—
Chlamydiae (4.16%)	Chlamydiai (4.16%)	Паракламидиальные (3.65%)	—	—
Firmicutes (3.05%)	—	—	—	—
Другие (5.59%)	Другие (8.53%)	Другие (38.7%)	Другие (47%)	Другие (97.6%)

Примечание: “Другие” – таксоны, численность которых ≤2% общего числа бактерий.

чена при изучении наночастиц Ag [17]. По-видимому, только хроническая экспозиция *Danio rerio* с Ni-НЧ приводит к развитию окислительных повреждений.

Причиной накопления МДА в тканях рыб может служить как усиление образования перекисей, так и снижение активности ферментов антиоксидантной защиты в ответ на хроническое воздействие наночастиц металлов [13]. Однако не только накопление МДА служит маркером развития ОС (оксидативный стресс), определенная роль в этом процессе отводится диеновым конъюгатам и другим активным продуктам, реагирующим с тиобарбитуровой кислотой [9]. Возможно, накопление именно этих продуктов стало причиной развития ОС и гибели тест-организмов при внесении в среду NiO-НЧ, как одного из металлов переменной валентности и индукторов ОС [39].

Одну из первых линий защиты клеток от агрессивного действия свободных радикалов, в том числе и перекисных, обеспечивают ферменты СОД, КТ и др. [4]. Динамика активности ферментов антиоксидантной защиты имела дозозависимый характер. Высокие концентрации NiO-НЧ (100 н) привели к ингибированию активности СОД, и, следовательно, к нарушению антиоксидантной защиты организма. При введении наночастиц оксида алюминия в культуру клеток CHSE-214 эмбрионов чавычи отмечено снижение активности СОД, КТ с последующей деформацией клеток, их распадом и гибелью [36]. Усиление активности КТ при низком и среднем дозовом уровне на фоне острого воздействия может рассматриваться как адаптационно-приспособительная реакция организма на развитие ОС, что подтверждает токсический эффект наночастиц. Одна из возможных причин снижения активности КТ – гиперпродукция свободных радикалов при ОС и истощение антиоксидантной системы организма [20].

Причинно-следственная связь в развитии подобного эффекта в организме гидробионтов выявлена для наночастиц Cu, Mo, MoO₃, Ni, Ag и SiO₂ и обусловлена механизмом непрямого генотоксического воздействия через образование эндогенных мутагенов, активных форм кислорода и продуктов перекисного окисления липидов. Генотоксическая активность этих продуктов хорошо известна, как и причины, вызывающие их гиперпродукцию: индукция “прооксидантных” ферментов ксантиноксидазы, НАДФ-Н-оксидазы, альдегидоксидазы, дигидрооротатдегидрогеназы, микросомальных монооксигеназ, повреждение электрон-транспортной цепи митохондрий, ингибирование и истощение ферментативных и неферментативных звеньев антиоксидантной защиты, избыток металлов переменной валентности или

недостаток хелаторов металлов, воспаление и некоторые другие [21, 22].

Мнение об опосредованности генотоксичности наночастиц через окислительный стресс имеет прямые подтверждения. Так, в наноформе вещества, особенно металлы, истощают антиоксидантную защиту организма, вызывают увеличение выхода маркеров ОС, в том числе окислительных повреждений ДНК [34, 38].

В эксперименте зафиксировано резкое повышение уровня Ni в теле *Danio rerio* на седьмые сутки экспозиции при наличии в среде только NiO-НЧ. Данное обстоятельство, возможно, обусловлено хорошей растворимостью NiO, быстрым переходом ионов никеля с поверхности наночастиц в водную среду и поступлением их в организм рыб. Последующее снижение показателей – результат работы системы гомеостатического регулирования микроэлементов, обеспечивающего постоянство уровня металла в организме. Кроме того, существуют данные, что *D. rerio* способен адаптироваться к действию наночастиц [29, 42].

Кишечная микрофлора рыб играет важную защитную роль в организме [24], участвуя в пищеварении и в метаболическом регулировании процессов в целом [14]. Качественный анализ микробиоценоза рыб имеет большое значение, поскольку доминирование условно-патогенной и патогенной микрофлоры на фоне ослабления защитных сил макроорганизма может привести к началу эпизоотии [37].

Проведенные метагеномные исследования позволили уточнить полученные классическими методами микробиологии данные по составу микробиоценоза желудочно-кишечного тракта рыб. По различным оценкам классические подходы позволяют культивировать от 3% [31] до 4.8% [19] общей бактериальной популяции кишечника рыб, что не позволяет традиционными методами достаточно полно исследовать разнообразие реально существующей в кишечнике микрофлоры [35].

Нормальная микрофлора кишечника рыб представлена преимущественно грамотрицательными бактериями, в то время как преобладание грамположительной микрофлоры в опыте с наночастицами может указывать на замещение автохтонной микрофлоры аллохтонной, чаще всего обнаруживаемой в воде [3]. Данное наблюдение может свидетельствовать о нарушении равновесия в микробиоценозе кишечника рыб и угнетении защитных механизмов, в норме препятствующих колонизации чужеродной микрофлорой.

В эксперименте выявлено появление класса *Fusobacteria* – грамотрицательной анаэробной палочки, вызывающей тканевый некроз [11]. Требуется более детальное изучение роли этих микрорганов, так как, по данным работы [15],

она может быть представителем кишечной микрофлоры рыб в норме. В таком же подходе нуждаются представители бактериопланктона класса Verrucomicrobia [25].

В пищеварительном тракте рыб в норме преобладают роды *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Alcaligines*, *Eikenella*, *Bacteroides*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei* и др. [16]. В то же время в эпилимнионе ≤50% видового разнообразия составляют актинобактерии [28], а в гипolimнионе зарегистрирована Verrucomicrobia [26].

Установлено, что внесение наночастиц никеля и оксида никеля влияет на микрофлору кишечника рыб и приводит к замещению собственной микрофлоры транзиторной, в том числе условно-патогенной и патогенной. По-видимому, в стрессовых условиях бактерии слабее закрепляются в кишечнике рыб, что может сопровождаться их элиминацией. Возможно, это происходит из-за сползания слизи, вместе с которой удаляется существующая микрофлора и оставшиеся в кишечном содержимом бактерии (в том числе и патогенные) колонизируют поверхность энтероцитов. Комплексное взаимодействие между хозяином и кишечной микрофлорой позволяет одним штаммам бактерий колонизировать кишечник, в то время как другие перевариваются или вызывают инфекцию. Наночастицы металлов обладают олигодинамическим действием, т.е. даже в малых концентрациях способны оказывать бактерицидное и бактериостатическое действие. Например, наночастицы никеля в концентрации 1 мг/мл за 30 и 60 мин воздействия вызывали почти полную гибель бактерий [8].

Исследование кишечной микрофлоры рыб актуально, т.к. изменения в микробиоценозе кишечника под воздействием наночастиц носят негативный характер, приводя к ослаблению роста, высокой подверженности рыб заболеваниям и повышенной смертности. Стрессы различного происхождения, неизбежные при интенсивном культивировании, еще более усугубляют ситуацию [5].

Выводы. Токсический эффект наночастиц у *Danio rerio* развивается по пути индукции окислительного стресса и качественной реорганизации микробиоценоза кишечника. Низкая дозовая нагрузка и кратковременный контакт тест-объекта с наночастицами никеля приводят к активизации системы антиоксидантной защиты организма в ответ на образование свободных радикалов. Хронические условия и высокие дозы истощают антиоксидантную систему организма на фоне гиперпродукции свободных радикалов при ОС. Установлено изменение качественного состава микроорганизмов, в частности замена *Citrobacter* и *Enterobacter* на *Bacillus* и *Acinetobacter* (при внесении NiO-НЧ) и на *Rhodobacter*, *Mycobacterium* и

Methylobacterium (при внесении Ni-НЧ), т.е. замещение нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта транзиторной. Повышение в среде обитания количества никеля в форме наночастиц неизбежно приводит к его кумуляции в теле гидробионтов с выраженностью эффекта при хронических условиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 14-36-00023.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Амосова А.А., Амосов Е.А., Козулина А.С. Экспериментальная оценка тест-системы для исследования острой токсичности различных загрязнителей окружающей среды в лабораторных условиях // Изв. Самар. науч. центра РАН. 2014. № 5(2). С. 1042–1044.
2. Андронов Е.Е., Пинаев А.Г., Першина Е.В., Чижевская Е.П. Выделение ДНК из образцов почвы (методические указания). СПб.: ГНУ ВНИИСХМ РАСХН, 2011. 27 с.
3. Бузалева Л.С., Калитина Е.Г., Безвербная И.П., Кривошеева А.М. Микробные сообщества поверхностных прибрежных вод бухты Золотой Рог в условиях высокого антропогенного загрязнения // Океанология. 2008. Т. 48. № 6. С. 882–888.
4. Буракова Е.Б., Храпова Н.Г. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты // Успехи химии. 1998. Т. 52. № 9. С. 540–558.
5. Бураченко И.В. Актуальные вопросы безопасности комбикормов в аквакультуре. М.: Всерос. НИИ озер. и реч. рыб. хоз-ва, 2008. С. 126–155.
6. Двоскин Я.Г. Химическая безопасность и основы профилактической токсикологии: Метод. пособие. М., 2003. 51 с.
7. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Свободнорадикальные процессы в норме и при заболеваниях сердечно-сосудистой системы // Кардиология. 2000. Т. 40. № 7. С. 48–61.
8. Мамонова И.А., Бабушкина И.В. Экспериментальное исследование антибактериального действия наночастиц никеля на клинические штаммы *Pseudomonas aeruginosa* // Биол. науки. 2012. № 2. С. 174–178.
9. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Шергин С.М. Биохимия окислительного стресса. Оксиданты и антиоксиданты. Новосибирск: СО РАМН, 1994. 203 с.
10. Обущенко С.В., Гнеденко В.В. Мониторинг содержания микроэлементов и тяжелых металлов в почвах Самарской области // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2014. № 7. С. 30–34.
11. Паршуков А.Н. Микробиоценоз радужной форели в садковых хозяйствах Карелии: Дис. ... канд. биол. наук. Петрозаводск, 2011. 182 с.
12. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Методы определения малонового диальдегида с помощью тиобар-

- битуровой кислоты. Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1977. 392 с.
13. *Ates M., Arslan Z., Demir V. et al.* Accumulation and toxicity of CuO and ZnO nanoparticles through waterborne and dietary exposure of goldfish (*Carassius auratus*) // *Environ. Toxicol.* 2015. V. 30. № 1. P. 119–128.
 14. *Austin B.* The bacterial microflora of fish // *The Sci. World J.* 2002. V. 2. P. 558–572.
 15. *Bennett K.W., Eley A.* Fusobacteria: new taxonomy and related diseases // *J. Med. Microbiol.* 1993. V. 39. № 4. P. 246–254.
 16. *Cahill M.M.* Bacterial flora of fishes: A review // *Microb. Ecol.* 1990. V. 19. № 1. P. 21–41.
 17. *Choi J.E., Kim S., Ahn J.H. et al.* Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish // *Aquat. Toxicol.* 2010. V. 100. № 2. P. 151–159.
 18. *Edgar R.C.* Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // *Bioinformatics.* 2010. V. 26. № 9. P. 2460–2461.
 19. *Fidopiastis P.M.* Microbial activity in the gut of an herbivorous marine fish // *Masters Abstracts International.* 1996. V. 34. № 3. 1102 p.
 20. *Ganesan S., Anaimalai Thirumurthi N., Raghunath A. et al.* Acute and sub-lethal exposure to copper oxide nanoparticles causes oxidative stress and teratogenicity in zebrafish embryos // *J. Appl. Toxicol.* 2016. V. 36. № 4. P. 554–567.
 21. *Govindasamy R., Rahuman A.A.* Histopathological studies and oxidative stress of synthesized silver nanoparticles in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) // *J. Environ. Sci.* 2012. V. 24. № 6. P. 1091–1098.
 22. *Hao L., Wang Z., Xing B.* Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) // *J. Environ. Sci.* 2009. V. 21. № 10. P. 1459–1466.
 23. *Huse S.M., Mark Welch D.B., Voorhis A. et al.* VAMPS: a website for visualization and analysis of microbial population structures // *BMC Bioinformatics.* 2014. V. 15. 41 p. doi 10.1186/1471-2105-15-41
 24. *Jankauskiene R.* Defence mechanisms in fish: Lactobacillus genus bacteria of intestinal wall in feeding and hibernating carps // *Ekologija.* 2000. V. 1. P. 3–6.
 25. *Larsen A.M., Mohammed H.H., Arias C.R.* Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warm water fish species // *J. Appl. Microbiol.* 2014. V. 116. № 6. P. 1396–1404.
 26. *Lindström E.S., Vrede K., Leskinen E.* Response of a member of the Verrucomicrobia, among the dominating bacteria in a hypolimnion, to increased phosphorus availability // *J. Plankton Res.* 2004. V. 26. № 2. P. 241–246.
 27. *Moore M.N.* Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? // *Environ. Int.* 2006. V. 32. P. 967–976.
 28. *Newton R.J., Jones S. E., Eiler A. et al.* A guide to the natural history of freshwater lake bacteria // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2011. V. 75. P. 14–49.
 29. OECD, Guideline for Testing of Chemicals, Guideline 203 // *Fish, Acute Toxicity Test.*, Paris: Organization of Economic Cooperation, Development, 1992. 9 p.
 30. *Piccinetti C.C., Montis C., Bonini M. et al.* Transfer of silica-coated magnetic (Fe₃O₄) nanoparticles through food: a molecular and morphological study in zebrafish // *Zebrafish.* 2014. V. 11. № 6. P. 567–579.
 31. *Ringo E., Lodemel J.B., Myklebust R. et al.* Epithelium-associated bacteria in the gastrointestinal tract of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). An electron microscopical study // *J. Appl. Microbiol.* 2001. V. 90. P. 294–300.
 32. *Shah V., Taratula O., Garbuzenko O.B. et al.* Genotoxicity of Different Nanocarriers: Possible Modifications for the Delivery of Nucleic Acids. *Current Drug Discovery Technologies.* 2013. V. 10. № 1. P. 8–15.
 33. *Shahravan A., Desai T., Matsoukas T.* Passivation of Aluminum Nanoparticles by Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition for Energetic Nanomaterials // *ACS applied materials & interfaces.* 2014. V. 10. № 6. P. 7942–7947.
 34. *Shvedova A.A., Pietroiusti A., Fadeel B., Kagan V.E.* Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on oxidative stress // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012. V. 261. № 2. P. 121–133.
 35. *Spanggaard B., Jørgensen F., Gram L., Huss H.H.* Antibiotic resistance in bacteria isolated from three freshwater fish farms and an unpolluted stream in Denmark // *Aquaculture.* 1993. V. 115. № 3–4. P. 195–207.
 36. *Srikanth K., Mahajan A., Pereira E. et al.* Aluminium oxide nanoparticles induced morphological changes, cytotoxicity and oxidative stress in Chinook salmon (CHSE-214) cells // *J. Appl. Toxicol.* 2015. V. 35. № 10. P. 1133–1140.
 37. *Sugita H., Miyajima C., Deguchi Y.* The vitamin B12 producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish // *Aquaculture.* 1992. V. 10. P. 267–276.
 38. *Trpkovic A., Todorovic-Markovic B., Trajkovic V.* Toxicity of pristine versus functionalized fullerenes: mechanisms of cell damage and the role of oxidative stress // *Arch. Toxicol.* 2012. V. 86. № 12. P. 1809–1827.
 39. *Wan R., Mo Y., Feng L., Chien S. et al.* DNA damage caused by metal nanoparticles: involvement of oxidative stress and activation of ATM // *Chem. Res. in Toxicol.* 2012. V. 25. P. 1402–1411.
 40. *Yausheva E., Sizova E., Lebedev S. et al.* Influence of zinc nanoparticles on survival of worms *Eisenia fetida* and taxonomic diversity of the gut microflora // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2016. V. 23. P. 13245–13254. doi 10.1007/s11356-016-6474-y
 41. *Zhang J., Kobert K., Flouri T., Stamatakis A.* PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR // *Bioinformatics.* 2014. V. 30. № 5. P. 614–620.
 42. *Zhang W., Sun X., Chen L. et al.* Toxicological effect of joint cadmium selenium quantum dots and copper ion exposure on zebrafish // *Environ. Toxicol. Chem.* 2012. V. 31. № 9. P. 2117–2123.

Intestinal Microbiocenosis Disorders in *Danio rerio* (Hamilton, 1882) and Inhibition of Protective Mechanisms under Nickel-Containing Nanoparticle-Induced Effects

V. A. Bagirov^a, E. A. Sizova^{b, c, *}, E. P. Miroshnikova^c, I. A. Gavrish^b, and A. V. Konovalov^d

^aErnst All-Russian Research Institute for Animal Husbandry, 142132 Dubrovitsy, 60, Moscow oblast, Russia

^bFederal Research Centre of Biological Systems and Agro-technologies of the Russian Academy of Sciences, Russia 460000 Orenburg, ul. 9 Yanvarya, 29

^cOrenburg State University, Russia 460013 Orenburg, Pr. Pobedy, 13

^dYaroslavl Research Institute of Livestock Husbandry and Forage Production, Russia 150517 Mikhailovskiy, Yaroslavl oblast, ul. Lenina, 1

*e-mail: Sizova.L78@yandex.ru

The state of the antioxidant system and the intestinal microbiocenosis in *Danio rerio* (Hamilton, 1822) have been studied with the use of nickel and its oxide nanoparticles released into environments. It is revealed that the nanoparticle-induced toxic effect causes oxidative stress, followed by restructuring of the intestinal microbiocenosis and inhibiting the protective mechanism. A low loading dose and a short period of exposure of the test object to the nickel nanoforms activate the antioxidant defense system of the body in response to the free radical evolution. Chronic conditions and high doses exhaust the antioxidant system under the effect of free-radical hyperproduction during oxidative stress. A change in the microorganism species diversity is ascertained; for instance, *Rhodobacter* and *Methylobacterium* replace *Citrobacter* and *Enterobacter*, respectively, with the introduction of the nickel oxide nanoparticles, while *Bacillus*, *Acinetobacter*, and *Rhodobacter* replacement occurs with the introduction of nickel nanoparticles. Therefore, the transient microorganisms tend to replace the normal intestinal flora. An increase in the environmental total amount of nickel in the nanoparticle form results in its accumulation in the body of hydrobionts under the effect of the induction of chronic conditions.

Keywords: *Danio rerio*, survival, intestinal microbiocenosis, catalase, superoxide dismutase, nickel and nickel oxide nanoparticles