

ВЫЖИВАЕМОСТЬ ИНФУЗОРИЙ *Paramecium caudatum* В ПРИСУТСТВИИ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА АЛЮМИНИЯ

© 2021 г. М. А. Крючкова^{1,*}, Ф. С. Ахатова¹, Р. Ф. Фахруллин¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

*E-mail: maricshka80@gmail.com

Поступила в редакцию 04.09.2020 г.

После доработки 09.10.2020 г.

Принята к публикации 10.10.2020 г.

Острая токсичность наночастиц оксида алюминия (Al_2O_3) размером 13–16 нм исследована методом биотестирования с использованием инфузорий *Paramecium caudatum* в диапазоне концентраций 10–100 мкг/мл. Оксид алюминия оказывает острое токсичное действие на парамеций в концентрациях 20–100 мкг/мл. В качестве критерия токсичности использовали значение средняя летальная доза (LD_{50}), равное концентрации наночастиц, при которой смертность инфузорий по отношению к контролю достигала 50%. Значение LD_{50} для наночастиц Al_2O_3 составляет 23 мкг/мл при 24-часовой экспозиции. Согласно опубликованным данным токсическое действие наночастиц Al_2O_3 является специфическим и зависит от размера и поверхностного заряда частиц, от межфазного взаимодействия наночастиц с клеточной поверхностью, а также от концентрации и времени экспозиции.

DOI: 10.1134/S199272232104004X

ВВЕДЕНИЕ

Исключительные свойства наноматериалов обуславливают перспективы их широкого применения в промышленности [1]. Наночастицы (НЧ) оксидов металлов широко используются в производствах конструкционных материалов, катализаторов, накопителей энергии, красок, люминофоров, косметических и медицинских препаратов [2, 3]. Одним из важных направлений развития нанотехнологий является получение нанопорошков, 80% которых составляют порошки оксидов металлов, причем наиболее популярными и востребованными для производств являются НЧ оксида алюминия (Al_2O_3) [4]. Оксид алюминия используется для изготовления оптически прозрачной и конструкционной керамики, теплозащитных покрытий и лакокрасочных материалов, выступает в роли катализатора в ряде процессов органического синтеза [5, 6]. Вследствие больших объемов производства Al_2O_3 и незамкнутого характера многих технологических циклов, в которых он используется, данный наноматериал может быть значимым загрязнителем и представлять серьезную угрозу для окружающей среды [7]. Отметим, что токсический эффект от частиц нанодиапазона значительно больше, чем от аналогичных по составу частиц микронных размеров [8, 9].

Несмотря на распространенность, алюминий и его соединения относятся к токсичным элемен-

там [10]. НЧ Al_2O_3 легко поглощаются различными клеточными культурами [11, 12], оказывая при этом цитотоксическое действие [12, 13] и обладая способностью к каталитической генерации свободных радикалов [14]. Пыль глинозема (~33 г/м³ за пять часов в день) вызывает сильное повреждение эпителия дыхательных путей крыс [15].

В природные воды алюминий и его соединения попадают естественным путем при частичном растворении глин и алюмосиликатов, а также в результате вредных выбросов промышленных предприятий и со сточными водами [15]. С каждым годом таких выбросов в окружающую среду становится все больше, а контроль за степенью загрязнения ими все ниже. Поскольку НЧ Al_2O_3 нерастворимы в воде и практически не способны к биологической деградации, они могут накапливаться в составе компонентов природных экосистем и оказывать губительное влияние на большинство живых организмов, обитающих в природных водоемах [16]. Установлено вредное действие водных дисперсий Al_2O_3 на дафний [17], пресноводных улиток [18], рыб [19], почвенных нематод [20] и насекомых [21].

Основными методами контроля экологического состояния водоемов продолжают оставаться физико-химические методы. Однако наряду с аналитическими методами все чаще применяются методы биологического тестирования, позволяющие оценить всю совокупность свойств ис-

следуемой среды по ответным реакциям живых организмов. Такими организмами являются пресноводные инфузории, они широко распространены в водоемах и играют заметную роль в самоочистке воды. Являясь одноклеточными организмами, инфузории одновременно демонстрируют реакции на организменном и клеточном уровне, тем самым расширяя диапазон критериев оценки токсичности. К сожалению, вопросы реакции инфузориЙ на частицы Al_2O_3 изучены недостаточно.

Основная цель данного исследования — определение токсического эффекта наночастиц оксида алюминия в эксперименте на инфузориЯх *Paramecium caudatum* (*P. caudatum*).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для оценки токсичности НЧ Al_2O_3 использовали коммерческий препарат фирмы Sigma-Aldrich, представляющий собой нанодисперсный порошок белого цвета с диаметром частиц $16.4 \pm \pm 10.0$ нм и ζ -потенциалом 44.3 ± 1.8 . Измерение ζ -потенциала и гидродинамического диаметра частиц проводили с использованием прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern).

НЧ Al_2O_3 были охарактеризованы с помощью темнопольной электронной микроскопии (ТЭМ) и атомно-силовой микроскопии (АСМ). АСМ-изображения получены с помощью микроскопа Dimension Icon (Bruker), работающего в режиме PeakForce Tapping, с использованием зонда ScanAsyst-Air (Bruker) (номинальная длина 115 мкм, наконечник радиусом 2 нм, жесткость пружины 0.4 Н м^{-1}). Полученные данные обработаны с использованием программного обеспечения Nanoscope Analysis v.1.7. (Bruker). НЧ Al_2O_3 визуализировали при помощи высококонтрастной ТЭМ CytoViva®. ТЭМ-изображения получены с помощью конденсора CytoViva®, присоединенного к микроскопу Olympus BX51, оснащенный флюоритным объективом ($\times 100$) и CCD-камерой.

Для биотестирования водную суспензию НЧ Al_2O_3 готовили непосредственно перед исследованием. Для устранения агрегации суспензию обрабатывали ультразвуком (в течение 2 мин при 44 кГц и 40 Вт). Острую токсичность НЧ Al_2O_3 исследовали в концентрациях 100, 50, 40, 30, 25, 20, 15 и 10 мкг/мл при различных экспозициях (0.16, 0.5, 1, 3, 5 и 24 ч).

В качестве модельных организмов использовали равноресничных инфузориЙ *P. caudatum*. Оценку устойчивости инфузориЙ к воздействию НЧ Al_2O_3 проводили по методике [22], основанной на определении выживаемости инфузориЙ. *P. caudatum* культивировали в десятикратном разведении среды Лозина-Лозинского, пригото-

вленной растворением следующих навесок солей в 1 л дистиллированной воды: NaCl (1.0 г), KCl (0.1 г), $NaHCO_3$ (0.2 г), $MgSO_4$ (0.1 г), $CaCl_2$ (0.1 г) с добавлением водной суспензии дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (3 мл) при температуре 22–24°C. Для проведения экспериментов инфузориЙ отбирали вручную, используя микропипетку. Для наблюдения за парамециями использовали стереоскопический микроскоп Carl Zeiss Stemi 2000C. Для проведения биотестирования применяли культуральный планшет с лунками. Микропипеткой отбирали по 10–12 особей в минимальном количестве среды и переносили в лунки планшета. После помещения инфузориЙ в планшеты в контрольные лунки приливали по 0.2 мл культуральной среды, а в опытные — по 0.2 мл тестируемой пробы. Отмечали время начала биотестирования. В процессе экспозиции ни в контрольных, ни в опытных лунках кормление инфузориЙ не осуществлялось. Критерием токсичности служила гибель инфузориЙ. Неподвижные и изменившие форму клетки считали погибшими. Кроме того, оценивали изменение характера движения инфузориЙ.

Выживаемость инфузориЙ (N , %) определяли по формуле

$$N = N_2/N_1 \times 100,$$

где N_2 , N_1 — среднеарифметическое значение количества инфузориЙ в конце и начале опыта, шт.

В качестве критерия токсичности использовали показатель средняя летальная доза (LD_{50}), определяемый графически как концентрация исследуемого раствора, при которой токсичность составляет 50%.

Все эксперименты проводили в трех повторностях. При этом каждая серия опытов была выполнена не менее трех раз. При статистической обработке полученных результатов использовали t -критерий Стьюдента. Достоверными считали различия при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данное исследование направлено на изучение потенциально токсических эффектов, вызванных НЧ Al_2O_3 , которые в настоящее время широко используются в промышленности. Типичные АСМ-изображения демонстрируют геометрию и размер частиц Al_2O_3 , имеющих форму эллипсоидов и диаметр, равный 13–16 нм. Данные изображения максимально характеризуют топографию поверхности. Для визуализации частиц Al_2O_3 использовали ТЭМ (рис. 1).

Для оценки токсичности Al_2O_3 в качестве модели *in vivo* использовали *P. caudatum* — подвижные одноклеточные микроскопические организмы, питающиеся дрожжами и захватывающие

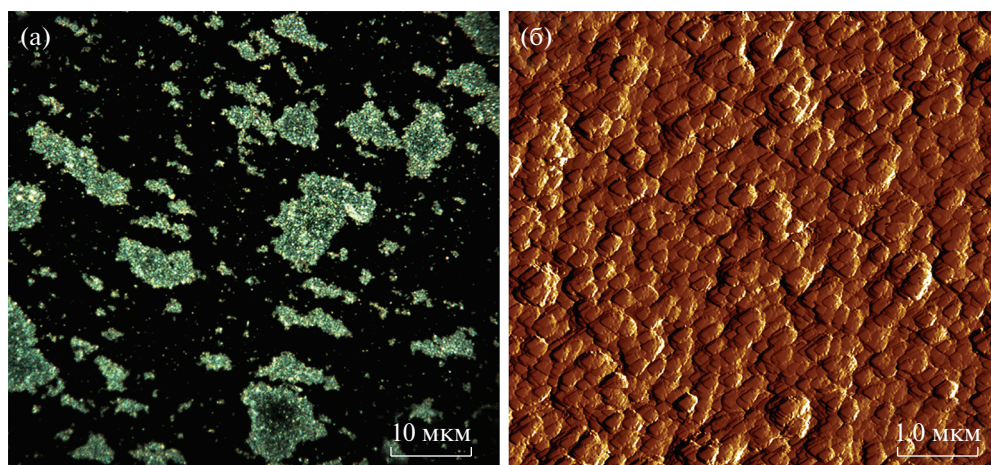


Рис. 1. Наночастицы оксида алюминия: а – темнопольная микроскопия, б – атомно-силовая микроскопия.

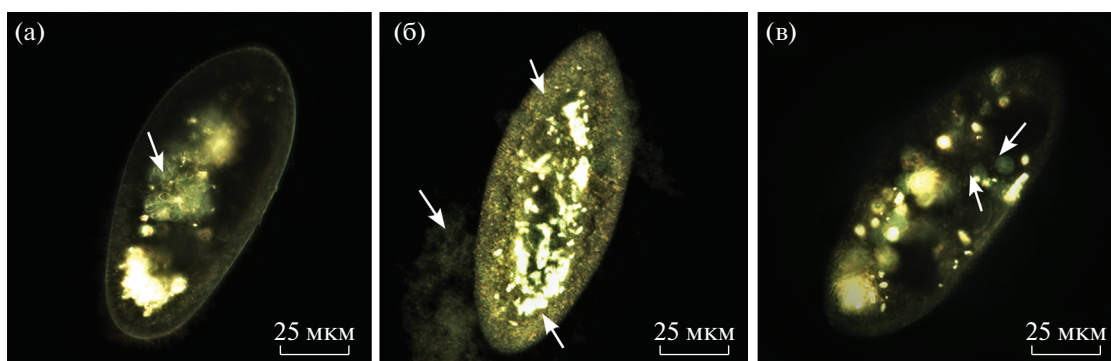


Рис. 2. ТЭМ-изображения инфузорий *P. caudatum*: а – контроль (стрелкой указаны пищеварительные вакуоли, заполненные дрожжевыми клетками), б – поглощение наночастиц оксида алюминия *P. caudatum* (обозначено стрелкой); визуализация распределения НЧ Al_2O_3 в цитоплазме *P. caudatum* (обозначено стрелками), в – визуализация заполненных частицами оксида кремния пищеварительных вакуолей (обозначено стрелками).

другие частицы, суспендированные в водной среде. Парамеции имеют типичную форму эллипсоида, сами клетки прозрачные, что позволяет визуализировать органеллы, например пищеварительные вакуоли, заполненные дрожжевыми клетками (рис. 2а). С помощью усиленной ТЭМ можно наблюдать поглощение частиц Al_2O_3 . Из рис. 2б видно, как частицы Al_2O_3 попадают в клетку *P. caudatum* из водной среды. Оксид алюминия ингибирует фагоцитарную активность у *P. caudatum*, при этом нарушается процесс образования пищеварительных вакуолей во всем диапазоне изученных концентраций. При более низких концентрациях НЧ Al_2O_3 были диффузно распределены в цитоплазме (рис. 2б). Например, оксид кремния в концентрации 5 мг/мл оказывает слаботоксичное действие [23], но при этом не препятствует образованию пищеварительных вакуолей даже при больших концентрациях. После попадания внутрь НЧ оксида кремния переносятся

в пищеварительные вакуоли, визуализированные с помощью ТЭМ (рис. 2в).

Высококонтрастные ТЭМ-изображения позволяют быстро, просто и эффективно наблюдать НЧ Al_2O_3 внутри прозрачных тел парамеций, так же как и в предыдущих исследованиях с микроскопическими червями *Caenorhabditis elegans* [24] и инфузориями *P. caudatum* [23].

В типичном эксперименте оценивали острую токсичность НЧ Al_2O_3 в диапазоне концентраций от 10 до 100 мкг/мл. При этом исследовали выживаемость инфузорий при различных экспозициях (табл. 1).

Для оценки выживаемости учитывали число мертвых особей. Показателями гибели инфузорий служат деформация тела, разрыв оболочки, лизис клетки, а также сохранение неподвижности. Через 0.16 ч эксперимента при концентрациях 100 и 50 мкг/мл отмечали отсутствие двигательной активности у 50% клеток. Через 0.5 ч при

Таблица 1. Выживаемость инфузорий *P. caudatum* (%) в зависимости от концентрации оксида алюминия

C, мкг/мл	0.16 ч	0.5 ч	1 ч	3 ч	5 ч	24 ч
100	34.2 ± 3.2	0	0	0	0	0
50	52.2 ± 3.6	29.2 ± 4.4	29.2 ± 4.2	21.9 ± 4.9	14.6 ± 4.9	14.6 ± 4.8
40	64.3 ± 3.4	42.9 ± 4.6	35.7 ± 4.3	28.6 ± 4.3	28.6 ± 4.2	21.4 ± 3.5
30	81.8 ± 4.4	63.6 ± 4.5	45.7 ± 4.5	45.4 ± 4.8	45.4 ± 4.3	42.4 ± 4.5
25	81.4 ± 3.8	70.8 ± 3.6	61.9 ± 3.6	53.0 ± 4.2	52.3 ± 4.7	44.2 ± 4.7
20	81.8 ± 3.7	81.8 ± 4.1	72.7 ± 3.9	64.5 ± 2.8	63.0 ± 2.9	60.5 ± 3.2
15	90.4 ± 2.3	86.7 ± 2.6	86.2 ± 2.8	78.3 ± 2.5	76.9 ± 2.9	75.9 ± 2.9
10	95.2 ± 2.0	92.6 ± 2.2	90.4 ± 2.3	88.3 ± 2.7	87.2 ± 2.7	85.6 ± 2.5

концентрации 100 мкг/мл наблюдали разрыв клеточной оболочки и лизис клеток, а при концентрации 50 мкг/мл около 30% клеток сохраняли двигательную активность. В остальных концентрациях большая часть клеток сохраняла нормальную двигательную активность. Показатели выживаемости инфузорий после 24 ч инкубации с Al_2O_3 представлены на рис. 3а. Наибольшее снижение выживаемости наблюдалось при концентрациях 20–100 мкг/мл, при которых Al_2O_3 оказывает острое токсичное действие на инфузории. Концентрации 10 и 15 мкг/мл оказывают слаботоксичное действие на парамеций.

В качестве критерия токсичности использовали LD_{50} – летальная доза Al_2O_3 , вызывающая гибель половины (50%) организмов за определенный промежуток времени (24 ч). В результате проведенных исследований параметры токсичности Al_2O_3 в остром опыте составили: $LD_{50} = 23$ мкг/мл (рис. 3б).

В других исследованиях НЧ Al_2O_3 оказались менее токсичными. В [25] установлено, что концентрация Al_2O_3 (размер частиц 83 нм), при которой происходит гибель 50% инфузорий *Paramecium*

multimicronucleatum в 48-часовой экспозиции, составляет 9269 мг/л. Токсичность НЧ Al_2O_3 (с размером частиц Δ_{50} 7 и 70 нм) изучали по хемотоксическому ответу инфузорий *P. caudatum* [26]. Согласно проведенным исследованиям НЧ Al_2O_3 ($\Delta_{50} = 70$ нм) оказались наиболее токсичными ($LD_{50} = 1.22$ мг/л), чем НЧ ($\Delta_{50} = 7$ нм), которые не оказывали токсичного действия.

Несоответствие данных о зависимости токсичности НЧ Al_2O_3 от размера частиц может быть вызвано использованием авторами различных методов оценки токсичности.

Токсичность Al_2O_3 зависит от межфазного взаимодействия НЧ с клеточной поверхностью, а также от физико-химических свойств НЧ (размер и поверхностный заряд) [25]. С уменьшением размеров НЧ площадь поверхности увеличивается, что вызывает дозозависимое увеличение окислительного стресса [27]. Окислительный стресс является одним из основных механизмов токсического действия НЧ Al_2O_3 , возникающий в условиях воздействия НЧ на водные организмы [26]. Также значимым фактором является заряд частиц. Наибольшую опасность представляют

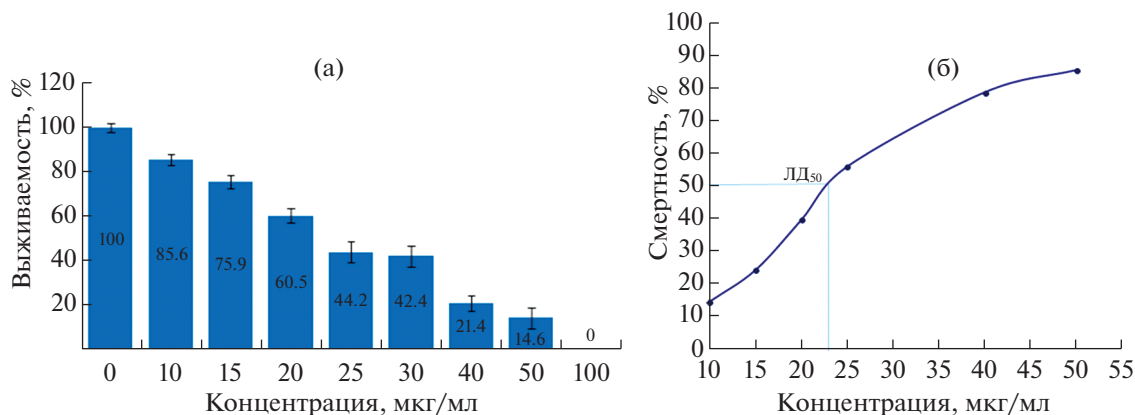


Рис. 3. Токсичность оксида алюминия на инфузориях *P. caudatum*: а – выживаемость инфузорий после 24 ч инкубации с оксидом алюминия, б – LD_{50} летальная доза оксида алюминия, вызывающая гибель 50% инфузорий за 24 ч.

положительно заряженные частицы, обладающие высоким сродством к макромолекулам ДНК и, следовательно, несущие генотоксический потенциал [27].

Токсичность НЧ Al_2O_3 различна для разных тест-организмов. Было выявлено ингибирующее влияние Al_2O_3 с размером частиц 70 нм на рост микроводорослей *Chlorella vulgaris* ($LD_{50} = 15$ мг/л), а для *Daphnia magna* Al_2O_3 оказался менее токсичным, LD_{50} составляет более 100 мг/л [26]. Оксид алюминия (с размером частиц 16 нм) в концентрации 4 мг/л индуцирует необратимые гистопатологические поражения жаберных, печеночных и мозговых тканей пресноводных рыб *Oreochromis mossambicus* после 96 ч воздействия [19]. При сравнении среднетелальной дозы Al_2O_3 у разных видов выявлено, что инфузории *P. caudatum* являются более чувствительными организмами для оценки токсичности Al_2O_3 в водных средах ($LD_{50} = 23$ мкг/мл).

При анализе литературных данных можно сделать вывод, что токсическое действие НЧ Al_2O_3 является специфическим и зависит от размера и поверхностного заряда частиц, а также от концентрации и времени экспозиции.

Таким образом, высокая токсичность НЧ Al_2O_3 может быть вызвана небольшими размерами частиц (13–16 нм) и высокой проникающей способностью, что облегчает их перераспределение внутри клетки. Оксид алюминия, используемый в этом исследовании, демонстрирует положительный поверхностный потенциал (44 мВ), что также может способствовать увеличению токсичности. Известно, что НЧ Al_2O_3 способны генерировать активные формы кислорода, повреждать ДНК, нарушать экспрессию белков, деполаризовывать клеточную мембрану, вызывать морфологические изменения и гибель клеток [12, 28]. Оксид алюминия оказывает вредное воздействие на низшие водные организмы, участвующие в самоочищении водоемов и представляющие собой кормовые ресурсы для рыб. Следовательно, контаминация водной среды НЧ Al_2O_3 может оказывать негативное влияние на живые организмы и представлять опасность для водных экосистем.

Несмотря на то что инфузории как модельный объект широко используются для оценки токсичности, механизмы токсических эффектов НЧ Al_2O_3 на *P. caudatum* практически не изучены. Это свидетельствует о необходимости проведения дополнительных токсикологических исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Опасность наночастиц оксида алюминия оценивали по выживаемости инфузორий *P. caudatum*.

НЧ Al_2O_3 оказывают острое токсическое воздействие на парамедий. При концентрации 100 мкг/мл (экспозиция 0.5 ч) наблюдается 100%-ная гибель инфузორий. Значение LD_{50} составляет 23 мкг/мл при 24-часовой экспозиции. Сравнительно высокая токсичность НЧ Al_2O_3 может быть вызвана небольшими размерами (13–16 нм) и положительным зарядом частиц, а также высокой проникающей способностью, что облегчает их перераспределение внутри клетки.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания № 0671-2020-0058 в сфере научной деятельности. Работа выполнена в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета за счет гранта президента Российской Федерации (МД-2153.2020.3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chatterjee R. // Environ. Sci. Technol. 2008. V. 2. P. 339. <https://doi.org/10.1021/eS0870909>
2. Gangwar J., Gupta B.K., Srivastava A.K. // Defense Sci. J. 2016. V. 66. № 4. P. 323. <https://doi.org/10.14429/dsj.66.10206>
3. Годымчук А.Ю., Савельев Г.Г., Зыкова А.П. Экология наноматериалов: учебное пособие. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. 272 с.
4. Зейналов О.А., Комбарова С.П., Багров Д.В. и др. // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2016. Т. 14. № 3. С. 24. <https://doi.org/10.17816/RCF14324-33>
5. Roussel N., Lallemand L., Chane-Ching J.Y. et al. // J. Am. Ceram. Soc. 2013. V. 96. № 4. P. 1039. <https://doi.org/10.1111/jace.12255>
6. Иванов В.В., Кайгородов А.С., Хрустов В.Р. и др. // Российские нанотехнологии. 2006. Т. 1. № 1–2. С. 201.
7. Шумакова А.А., Тананова О.Н., Арианова Е.А. и др. // Вопросы питания. 2012. Т. 81. № 6. С. 54.
8. Ma H., Williams P.L., Diamond S.A. // Environ. Pollut. 2013. V. 172. P. 76. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.08.011>
9. Моргалев Ю.Н., Гостева И.А., Моргалева Т.Г. и др. // Российские нанотехнологии. 2018. Т. 13. № 5–6. С. 97.
10. Parka E.J., Leeb G.H., Yoone C. et al. // J. Appl. Toxicol. 2016. V. 36. P. 424. <https://doi.org/10.1002/jat.3233>
11. Di Virgilio A.L., Reigosa M., de Mele M.F. // J. Biomed. Mater. Res. A. 2010. V. 92. № 1. P. 80. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32339>
12. Radziun E., Dudkiewicz-Wilczynska J., Ksiaek I. et al. // Toxicol. In Vitro. 2011. V. 25. № 8. P. 1694.
13. Song Z.M., Tang H., Deng X. et al. // J. Nanosci. Nanotechnol. 2017. V. 17. № 5. P. 2881. <https://doi.org/10.1166/jnn.2017.13056>

14. Dong E., Wang Y., Yang S.T. et al. // J. Nanosci. Nanotechnol. 2011. V. 11. № 9. P. 7848.
<https://doi.org/10.1166/jnn.2011.4748>
15. Шугалей И.В., Гарабаджю А.В., Илюшин М.А., Судариков А.М. // Экологическая химия. 2012. Т. 21. № 3. С. 172.
16. Cardwell A.S., Adams W.J., Gensemer R.W. et al. // Environ. Toxicol. Chem. 2018. V. 37. P. 36.
<https://doi.org/10.1002/etc.3901>
17. Pakrashi S., Dalai S., Humayun A. et al. // PLOS One. 2013. V. 8. № 9. P. e74003.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074003>
18. Musee N., Oberholster P.J., Sikhwivhilu L., Botha A.M. // Chemosphere. 2010. V. 81. № 10. P. 1196.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.040>
19. Vidya P.V., Chitra K.C. // Int. J. Fisheries Aquatic Studies. 2018. V. 3. P. 13.
20. Coleman J.G., Johnson D.R., Stanley J.K. et al. // Environ. Toxicol. Chem. 2010. V. 29. № 7. P. 1575.
<https://doi.org/10.1002/etc.196>
21. Stadler T., Buteler M., Weaver D.K., Sofie S. // J. Stored Prod. Res. 2012. V. 48. P. 81.
<https://doi.org/10.1016/j.jspr.2011.09.004>
22. ГОСТ 31674-2012. Межгосударственный стандарт. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности. Введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29.11.2012 г. N 1477-ст (с изменениями на 15.11.2016 г). 30 с.
23. Kryuchkova M., Danilushkina A., Lvov Y., Fakhrollin R. // Environ. Sci.: Nano. 2016. V. 3. P. 442.
<https://doi.org/10.1039/c5en00201j>
24. Fakhrollina G.I., Akhatova F.S., Lvov Y.M., Fakhrollin R.F. // Environ. Sci.: Nano. 2015. V. 2. P. 54.
<https://doi.org/10.1039/C4EN00135D>
25. Li K., Chen Y., Zhang W. et al. // Chem. Res. Toxicol. 2012. V. 25. P. 1675.
<https://doi.org/10.1021/tx300151y>
26. Gosteva I., Morgalev Yu., Morgaleva T., Morgalev S. // IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng. 2015. V. 98. P. 012007.
<https://doi.org/10.1088/1757-899X/98/1/012007>
27. Gato M.A., Naseem S., Arfat M.Y. et al. // BioMed Res. Int. 2014. V. 8. P. 498420.
<https://doi.org/10.1155/2014/498420>
28. Зайцева Н.В., Землянова М.А., Степанков М.С., Игнатова А.М. // Экология человека. 2018. № 5. С. 9.
<https://doi.org/10.33396/1728-0869-2018-5-9-15>