

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ БИОГЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ
СЕРЕБРА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНФУЗОРИЙ *PARAMECIUM CAUDATUM*© 2024 г. М. А. Крючкова^{1,*}, А. О. Рожин¹, Э. В. Рожина¹¹Казанский федеральный университет, Казань, Россия

*E-mail: maricshka80@gmail.com

Поступила в редакцию 13.03.2024 г.

После доработки 22.04.2024 г.

Принята к публикации 05.06.2024 г.

В настоящее время наночастицы серебра (AgНЧ) все чаще используются в качестве биоцидов, но попадая в окружающую среду, они могут влиять на нецелевые организмы. В связи с этим возрастает потребность развития синтеза AgНЧ с использованием биологических агентов. Однако токсическое воздействие биогенных AgНЧ на водные организмы детально не изучено. Предлагается модель использования пресноводной инфузории *Paramecium caudatum* в качестве тест-организма для оценки токсического действия AgНЧ, синтезированных с использованием сфагнового мха. Влияние разных концентраций биогенных AgНЧ исследовалось по биологическим реакциям парамеций на выживаемость, скорость роста, хемотаксис, фагоцитоз и морфологию макронуклеуса. Полученные результаты показали, что AgНЧ, стабилизированные экстрактом сфагноума, оказывают токсическое действие на инфузории, демонстрируя выраженный дозозависимый эффект.

DOI: 10.56304/S1992722324601538

ВВЕДЕНИЕ

Среди разнообразия наночастиц (НЧ) металлов наночастицы серебра (AgНЧ) имеют важное значение в медицинских и промышленных процессах благодаря своим физическим, химическим и биологическим характеристикам. Наночастицы серебра имеют множество применений в различных областях катализа, электроники, фотоники, биосенсорики и диагностики, текстильной и пищевой промышленности [1–3]. Особый интерес AgНЧ представляют для медицинской области благодаря своим антибактериальным, противогрибковым, противопаразитарным и антиоксидантным свойствам [4–7]. В связи с растущей потребностью в разработке безопасных технологий в последние годы все больше внимания уделяется синтезу НЧ металлов с использованием биологических агентов [8, 9]. Синтез НЧ с использованием растительных экстрактов, микроорганизмов, водорослей и грибов имеет преимущества перед химическим синтезом, при котором могут выделяться токсичные соединения [10]. Считается, что биогенные НЧ более безопасны и экологичны [11]. Однако использование биологически синтезированных AgНЧ необходимо тщательно исследовать, чтобы изучить их безопасность для окружающей среды и токсическое воздействие на водные организмы. В настоящее время токсичность биогенных AgНЧ при дли-

тельном поступлении в водную среду детально не изучена. Токсичность AgНЧ тесно связана с высвобождением ионов серебра, которые считаются очень токсичными для водных видов, тем не менее трудно отличить роль AgНЧ от роли ионов серебра [12]. Концентрация AgНЧ в водной среде колеблется от нано- до микрограмма на литр [13, 14]. По некоторым данным концентрации AgНЧ в поверхностных водах достигают 0.09–2.63 нг/л [15]. Постепенно накапливаясь в водной среде, AgНЧ приводят к биологическому обогащению и могут оказывать токсическое воздействие на водные организмы, имеющие разную чувствительность к AgНЧ. Известно, что наиболее чувствительными к воздействию AgНЧ являются ракообразные, инфузории, водоросли и рыбы, значения средней летальной концентрации (CL₅₀) для этих организмов варьируются от 0.1 до 100 мг/л [16, 17]. В нанотоксикологии пресноводные инфузории представляют собой экологически значимые модельные организмы, так как играют важную роль в водной пищевой цепи, являясь основными компонентами планктонных и бентосных экосистем [18–20].

Инфузории относятся к высокоорганизованным простейшим, широко распространенным в пресноводных водоемах. Этот простейший организм имеет двойственную природу, одновременно демонстрируя реакции на организменном и клеточном уровне, тем самым расширяя диапа-

зон критериев оценки токсичности [21]. В настоящем исследовании использовали пресноводную инфузорию *Paramecium caudatum* в качестве модельного эукариотического организма для оценки токсического действия биогенных AgНЧ, полученных с использованием экстракта сфагнома, и демонстрации влияния разных концентраций на выживаемость инфузорий, скорость размножения, хемотаксис, фагоцитарную активность и морфологию макронуклеуса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты. Для получения AgНЧ использовали нитрат серебра (AgNO_3), который, как и все другие химические вещества, был приобретен в Sigma-Aldrich (США).

Синтез биогенных AgНЧ. Для синтеза биогенных AgНЧ использовали экстракта мха сфагнома *Sphagnum fallax*, который действовал как стабилизатор. Биогенные AgНЧ получали восстановлением ионов серебра экстрактом сфагнома, как это было описано в [22]. Для этого 100 мл 0.01%-ного раствора AgNO_3 нагревали до 90°C при постоянном перемешивании, затем добавляли 10 мл 5%-ного раствора экстракта сфагнома. Полученную смесь выдерживали 2 ч при температуре 90°C. После этого раствор охлаждали и оставляли на 24 ч для созревания. Полученные частицы осаждали центрифугированием.

Технические характеристики. Гидродинамический диаметр и ζ -потенциал НЧ измеряли в воде при 25°C с использованием прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания) в стандартных U-образных кюветах. Светлопольные и флуоресцентные изображения были получены с использованием оптического микроскопа Carl Zeiss Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия), оснащенного камерой CCD AxioCam HRC (Carl Zeiss, Германия). Образцы для оптической микроскопии обрабатывали с использованием программного обеспечения ZEN (Carl Zeiss, Германия). Темнопольную микроскопию проводили с помощью вертикального микроскопа Olympus BX51 (Olympus, Япония), оснащенного масляным конденсатором темного поля CytoViva® (CytoViva, США) и камерой DAGE CCD (Dage-MTI, США). Изображения в темном поле были получены при экспозиции 350–900 мс с использованием программного обеспечения Exponent 7 (Stable Microsystems, Великобритания). Изображения электронной микроскопии получены с помощью просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) JEM-2100 (JEOL, Япония). Микрофотографии обрабатывали с использованием программного обеспечения Image J (V. 1.43).

Культура *Paramecium caudatum*. Инфузории были выделены из природного водоема [23]. Для

экспериментов использовали клональные культуры *P. caudatum*. После идентификации парамеций одну особь освобождали от посторонней микрофлоры путем последовательной пересадки через несколько микроаквариумов. Для размножения *P. caudatum* инфузорий культивировали на природной поликультурной среде при температуре 22°C. Для этого настой сена 10 г/л кипятили ~5 мин, затем давали отстояться, а надосадочную жидкость использовали в качестве питательной среды. Когда количество разделившихся инфузорий достигало 30–40 шт., их пересаживали в емкость с минеральной средой, содержащей NaCl (1.0 г/л), KCl (0.1 г/л), NaHCO_3 (0.2 г/л), MgSO_4 (0.1 г/л), CaCl_2 (0.1 г/л), с добавлением сухих пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при температуре 22–24°C. Изучение влияния биогенных AgНЧ проводили на модели свободноживущей инфузории *P. caudatum* согласно методическим рекомендациям [24]. Клетки *P. caudatum* в логарифмической фазе роста собирали центрифугированием (3000 об./мин, 10 мин). Для проведения экспериментов инфузорий отбирали вручную, используя микропипетку. Для наблюдения за парамециями использовали стереоскопический микроскоп Stemi 2000C (Carl Zeiss, Германия).

Исследование хронической токсичности in vivo. Токсичность биогенных AgНЧ исследовали на инфузориях в концентрациях 0.01–0.2 мг/мл при длительном воздействии в течение 96 ч. Все эксперименты проводили в трех повторах. При этом каждая серия опытов была выполнена не менее трех раз. При статистической обработке полученных результатов использовали t-критерий Стьюдента. Достоверными считали различия при $p \leq 0.05$.

Процент выживаемости. При проведении исследований по влиянию на выживаемость инфузорий в каждом повторе использовали по 10–15 особей. Эксперименты проводили в логарифмической фазе роста с использованием суточной культуры. Парамеции помещали в лунки планшета для культуры тканей. Затем в лунки вносили по 200 мкл культуральной среды, содержащей различные концентрации биогенных AgНЧ (0.01–0.2 мг/мл). Во время эксперимента инфузорий не кормили. *P. caudatum* инкубировали при 22–24°C 96 ч. Критерием токсичности служила гибель инфузорий. Подсчет выживших клеток проводили с помощью стереоскопического микроскопа. Неподвижные и изменившие форму клетки считались погибшими. В качестве контроля использовали культуральную среду, в которой инфузории должны оставаться живыми. Кроме того, оценивали изменение характера движения инфузорий.

Показатель выживаемости (N , %) рассчитывали по формуле

$$N = N_2/N_1 \times 100, \quad (1)$$

где N_2 — среднее количество простейших в конце, а N_1 — среднее количество простейших в начале эксперимента.

Репродуктивная активность. Большей чувствительностью обладает биотест на основе оценки скорости размножения. Для оценки репродуктивной активности инфузорий из культуры под стереомикроскопом рассаживали в лунки по одной. Ежедневно подсчитывали число парameций в каждой лунке. Дальнейшую подготовку к биотестированию проводили так же, как при исследовании выживаемости инфузорий. При этом критерием токсичности служит снижение прироста численности инфузорий в опыте относительно прироста численности в контроле (%).

Прирост численности особей (ΔN) определяли по формуле

$$\Delta N = N_t - N_0, \quad (2)$$

где N_t — средняя арифметическая численность клеток в конце анализа, шт.; N_0 — средняя арифметическая численность клеток в начале анализа, шт.

Показатель репродуктивной активности (T , %) рассчитывали по формуле

$$T = \Delta N_o / \Delta N_k \times 100, \quad (3)$$

где ΔN_o — прирост численности инфузорий в опыте в конце анализа, шт.; ΔN_k — прирост численности инфузорий в контроле в конце анализа, шт.

В дальнейших исследованиях при оценке хемотаксиса, фагоцитоза и макронуклеуса концентрацию 0.2 мг/мл не использовали из-за сильного токсического воздействия, приводящего к гибели парameций.

Анализ хемотаксиса. Хемотаксис относится к поведенческим реакциям, которые более чувствительны и быстры, чем физиологические реакции [25]. Хемотаксис проводили в течение 24 ч в трех повторях. На предметное стекло наносили по две капли 0.1 мл опытного раствора биогенных AgНЧ в концентрациях 0.01–0.1 мг/мл и контрольного раствора (минеральная среда с добавлением дрожжей). Помещали 10 инфузорий в опытную каплю, капли соединяли тонкой перемычкой и наблюдали перемещение парameций в поле зрения бинокуляра.

Фагоцитарная активность. Интенсивность фагоцитоза у *P. caudatum* определяли путем подсчета поглощенных инфузориями клеток дрожжей в присутствии различных концентраций биогенных AgНЧ (0.01–0.1 мг/мл) в течение 96 ч. Для визуализации пищеварительных вакуолей их окрашивали 0.1%-ным раствором Конго красный в течение 15 мин [26]. В конце экспозиции суспензию клеток фиксировали в 1.5%-ном растворе глутарового альдегида. После промывки клеток подсчитывали число помеченных пищевых вакуолей, используя прямой оптический микро-

скоп. Исследуемые растворы тестировали в трех повторях.

Исследование макронуклеуса. Морфологию макронуклеуса у инфузорий *P. caudatum* изучали при помощи флуоресцентного красителя (DAPI — 4,6-диамидин-2-фенилиндола). Исследование проводили в течение 96 ч в трех повторях. Биогенные AgНЧ исследовали в концентрациях 0.01–0.1 мкг/мл. Далее клетки отмывали и красили водным раствором DAPI (0.1 мг/мл). При помощи этого красителя проводится окраска всей ядерной ДНК [27]. Изучали макронуклеус в контрольных и опытных образцах, используя оптический микроскоп Carl Zeiss Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия). Клетки визуализировали в режиме светлого поля и в режиме флуоресценции (узкополосный УФ-фильтр DAPI). Затем светлоскопические и флуоресцентные изображения накладывали друг на друга с использованием программного обеспечения ZEN (Carl Zeiss, Германия). Кроме того, оценивали общую форму и числовые размеры макронуклеуса (длина, ширина, площадь поверхности и индекс вытянутости). Цитометрические показатели макронуклеуса анализировали с помощью программного обеспечения ZEN (Carl Zeiss, Германия).

Цитометрические показатели макронуклеуса определяли по следующим формулам:

— площадь поверхности макронуклеуса (NS)

$$NS = 2\pi \times NW/2 \times NL/2 \text{ (мкм}^2\text{)}, \quad (4)$$

где π — отношение длины окружности к ее диаметру (~ 3.14), NW — ширина ядра, NL — длина ядра;

— индекс вытянутости (I)

$$I = NW/NL, \quad (5)$$

где NW — ширина ядра, NL — длина ядра.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки токсического эффекта использовали AgНЧ, стабилизированные экстрактом сфагнома. Метаболический состав сфагнома *S. fallax* представлен гликозидными и кислотоподобными соединениями, которые могут обладать мощными антибактериальными свойствами [28]. Наночастицы серебра, стабилизированные экстрактом сфагнома, продемонстрировали сильную антибактериальную активность, полностью подавляя рост биопленок штамма *Escherichia coli* MG1655 [22]. Биогенные AgНЧ анализировали с помощью темнопольной микроскопии. Из рис. 1а видно, что частицы имеют разный размер, самые мелкие наночастицы синего и зеленого цвета, самые крупные — желтого. Средний гидродинамический диаметр AgНЧ составляет 240 ± 6.42 нм. Величина ζ -потенциала является одним из важных показателей стабильности коллоидной си-

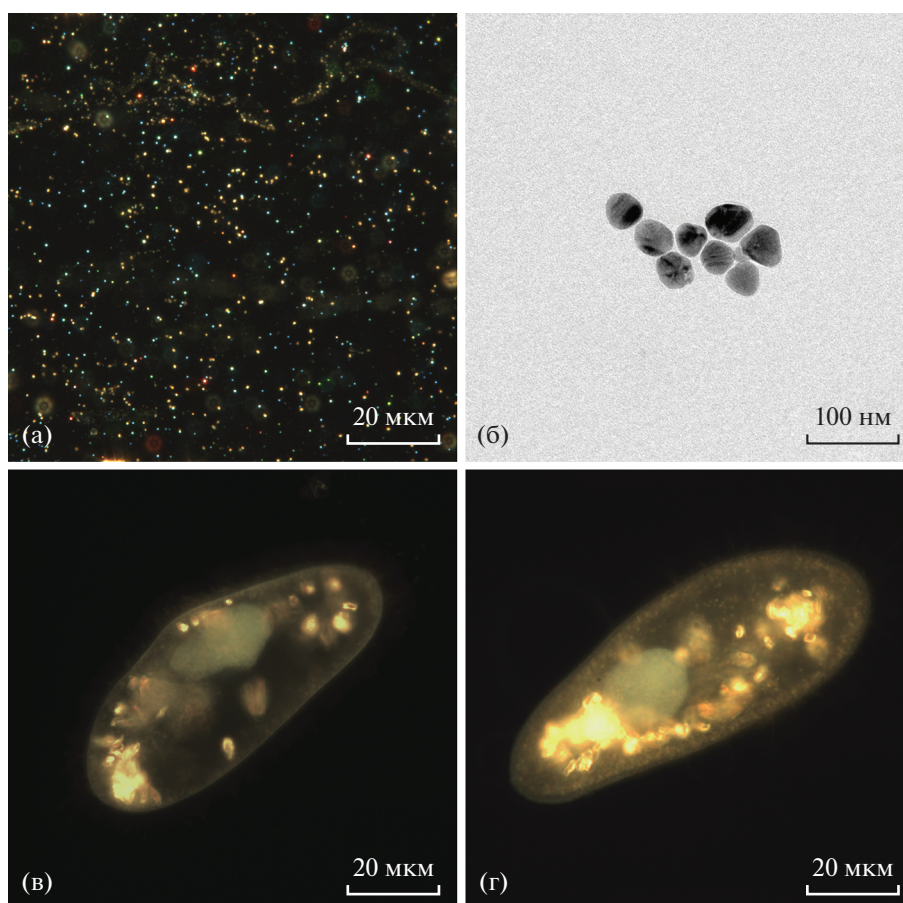


Рис. 1. Темнопольная микроскопия биогенных AgНЧ (а), ПЭМ-изображения биогенных AgНЧ (б). Изображения темнопольной микроскопии: контроль *P. caudatum* (в), *P. caudatum* с биогенными AgНЧ (0.1 мг/мл) (г).

стемы, влияющим на химический состав поверхности. Для предотвращения агрегации частиц должны быть достигнуты либо высокие отрицательные, либо высокие положительные значения ζ -потенциала. Установлено, что синтезированные частицы заряжены отрицательно и величина их ζ -потенциала при pH 7.3 составляет -28.3 ± 2.57 мВ. Следовательно, синтезированные частицы являются агрегационно стабильными. При этом размер частиц, форма и величина ζ -потенциала могут влиять на степень бактерицидного действия [29]. Согласно данным [22] с помощью просвечивающей электронной микроскопии определили морфологию и размер AgНЧ, стабилизированных экстрактом сфагнома. Частицы имели однородную сферическую форму и диаметр от 20 до 100 нм (рис. 1б). Просвечивающая электронная микроскопия позволяет получить более детальную информацию о форме и размере НЧ. Показано, что диаметр биогенных AgНЧ, определенный методом ПЭМ, существенно ниже гидродинамического диаметра, который показывает средний размер частиц, включая крупные частицы и агрегаты.

Наночастицы меньшего размера имеют более высокую способность проникать внутрь клетки, нарушая ее целостность и приводя к гибели. Известно, что бактерицидное действие AgНЧ обусловлено несколькими факторами, включая высвобождение ионов серебра из НЧ, генерацию активных форм кислорода и свободных радикалов [30, 31].

В качестве модельного объекта для изучения токсического действия стабилизированных экстрактом сфагнома AgНЧ были использованы пресноводные инфузории *P. caudatum*. Инфузории имеют типичную эллипсоидную форму и крупные размеры от 0.3 до 0.5 мм, что облегчает обнаружение коллоидных НЧ внутри прозрачных тел в отличие от бактерий и клеток человека, на которых чаще всего проводятся исследования. Использовали темнопольную микроскопию, чтобы продемонстрировать поглощение биогенных AgНЧ простейшими. Клетки достаточно прозрачны для видимого света, что позволяет визуализировать AgНЧ в концентрации 0.1 мг/мл (рис. 1г), тогда как в контроле таких частиц не наблюдается (рис. 1в). Примечательно, что большая

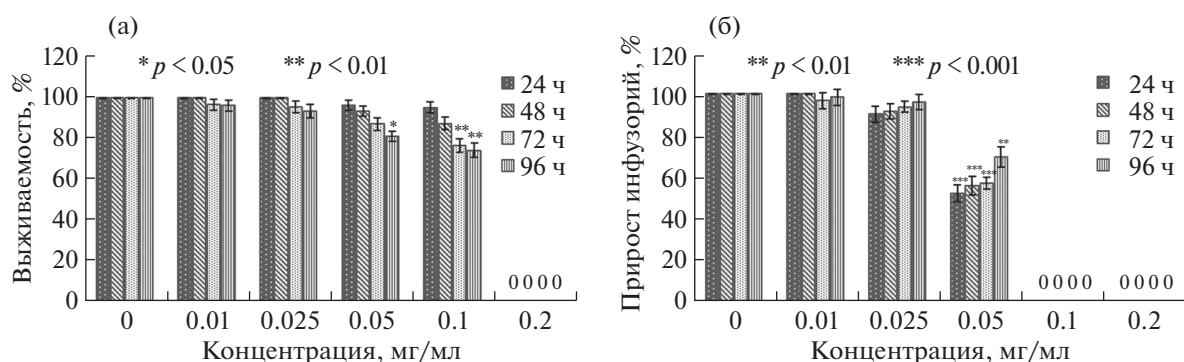


Рис. 2. Исследование хронической токсичности *P. caudatum*: выживаемость (а); репродуктивная активность (б), после воздействия возрастающих концентраций биогенных AgНЧ.

часть частиц обнаруживается вблизи клеточной мембраны, что может оказывать влияние на подвижность инфузорий.

Анализ жизнеспособности клеток является важным методом токсикологического анализа, объясняющим клеточную реакцию инфузорий на токсичные материалы [32]. В типичном эксперименте по токсичности стабилизированные экстрактом сфагнома AgНЧ вводили в культуральную среду для инфузорий в различных концентрациях (0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 мг/мл). Критерием определения токсичности служит время от начала воздействия испытуемого экстракта до гибели инфузорий, факт, который констатируют на основании полного прекращения движения и наличия признаков распада клеток.

Была оценена хроническая токсичность стабилизированных экстрактом сфагнома AgНЧ в концентрациях 0.01–0.2 мг/мл. При этом клетки исследовали под микроскопом в течение 96 ч, чтобы подсчитать жизнеспособные и мертвые клетки. Мертвыми считались неподвижные, деформированные клетки с разрушенной мембраной. Результаты, демонстрирующие воздействие биогенных AgНЧ на *P. caudatum* в течение 96 ч, представлены на рис. 2а, где представлены показатели выживаемости.

Стабилизированные экстрактом сфагнома AgНЧ в концентрации 0.2 мг/мл оказывали выраженное токсическое действие на *P. caudatum*. Изменялся характер движения инфузорий, что проявлялось в ускорении, а также изменении направления движения, появлялись движения вокруг своей оси. Изменялась форма клеток, парameции увеличивались или уменьшались в размере, наблюдались вакуолизация цитоплазмы и разрушение клеточной мембраны. В течение 10 мин клетки лизировались (рис. 3).

Концентрация 0.1 мг/мл не оказывала такого токсического действия. Так, через 24 ч выживаемость инфузорий составляла 95.2%, а через 96 ч —

74.4%. Концентрации 0.01–0.05 мг/мл не оказывали токсического действия на парameций. Через 96 ч выживаемость клеток составляла 96–82%.

Для исследования репродуктивной активности выделяли отдельные клетки *P. caudatum* и инкубировали их в индивидуальных лунках культурального планшета, а затем следили за их делением в течение 96 ч. Из рис. 2б видно, что биогенные AgНЧ в концентрациях 0.05–0.2 мг/мл ингибировали размножение *P. caudatum*. Концентрация 0.2 мг/мл оказывала сильное токсическое действие, поэтому клетки лизировались, но при концентрации 0.1 мг/мл отмечалась хорошая выживаемость, однако на протяжении всего эксперимента деления клеток не наблюдалось. Концентрация 0.05 мг/мл (96 ч) приводит к снижению прироста численности инфузорий до 69.7%. Концентрации 0.01–0.025 мг/мл не оказывали ингибирующего действия на репродуктивную активность парameций. Биотесты на выживаемость и репродуктивную активность показали выраженный дозозависимый эффект биогенных AgНЧ, что согласуется с данными [33], где были выявлены дозозависимые реакции AgНЧ как у пресноводных, так и у морских видов.

Следующий этап эксперимента начали с поведенческого теста на основе хемотаксиса. Таксисом называется изменение поведения простейших под влиянием факторов внешней среды. Метод биотестирования по реакции хемотаксиса парameций основан на способности инфузорий перемещаться в направлении или от источника воздействия AgНЧ. Таким образом, хемотаксис может быть положительным и отрицательным. Поведенческая реакция считается положительной, если клетки остаются внутри капли, содержащей НЧ, тогда как отрицательный хемотаксис наблюдается, если клетки активно мигрируют в культуральную среду с дрожжами. Из рис. 4 видно, что инфузории продемонстрировали положительный хемотаксис 50–70% при концентрациях биогенных AgНЧ 0.01–0.05 мг/мл и отрицатель-

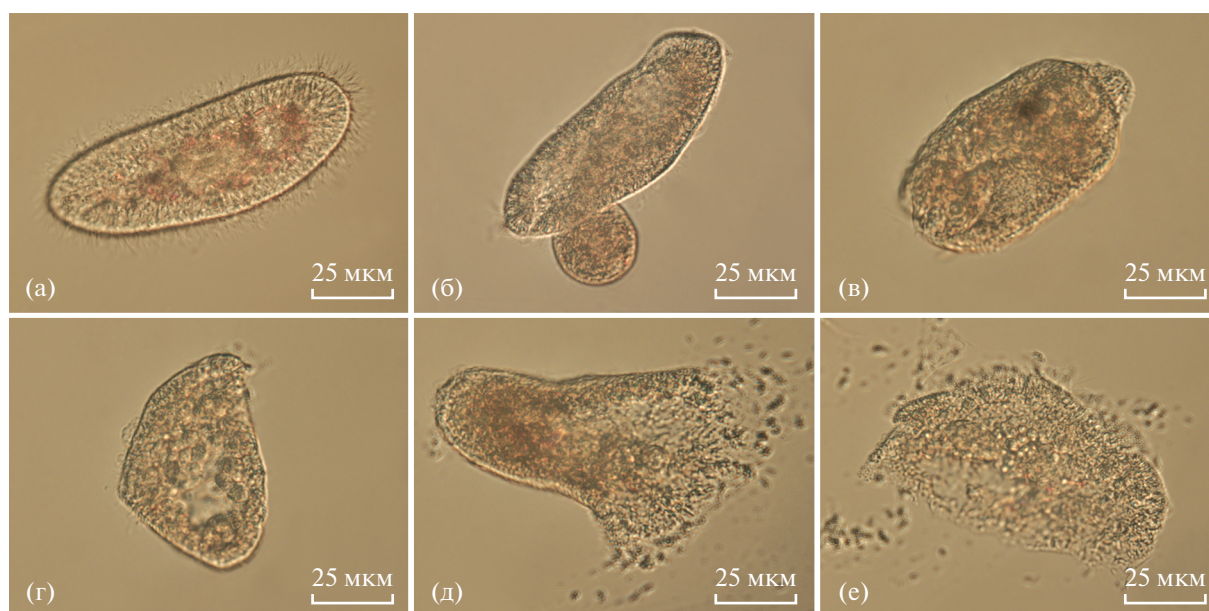


Рис. 3. Оптические микрофотографии инфузорий *P. caudatum*. Деформация клеток вызвана действием биогенных AgНЧ (0.2 мг/мл). Контроль (а), вакуолизация цитоплазмы (б), увеличение (в) и уменьшение размера (сморщивание) клетки (г), разрыв клеточной мембраны (д), лизис (разрушение) клетки (е).

ный хемотаксис 37% при концентрации 0.1 мг/мл.

Функцию питания определяли по скорости фагоцитоза (способность образовывать пищеварительные вакуоли). Интенсивность фагоцитоза у *P. caudatum* определяют путем подсчета поглощенных инфузориями клеток дрожжей с биогенными AgНЧ. Типичные изображения пищеварительных вакуолей у парамеций представлены на рис. 5.

Влияние биогенных AgНЧ на фагоцитарную активность инфузорий оценивали в течение 96 ч. Из рис. 5 видно, что стабилизированные сфагнумом AgНЧ в представленных концентрациях не

оказывали ингибирующего действия на фагоцитарную активность парамеций. Даже при концентрации 0.1 мг/мл (96 ч) фагоцитарная активность по сравнению с контролем снижалась на 22%, а в концентрациях 0.01–0.05 мг/мл на 10–12%.

Еще один важный морфологический признак, который может указывать на токсическое воздействие НЧ, — это размер и форма макронуклеуса. Макронуклеус — физиологически активное ядро, связанное почти со всеми процессами жизнедеятельности инфузорий. Макронуклеус очень богат ДНК, имеет бобовидную форму, ядро косо расположено, чуть выше середины тела, компактное, удлиненное. Для окрашивания макронуклеуса у инфузорий *P. caudatum* использовали флуоресцентный краситель DAPI. Он специфически связывается с ДНК и обладает синей флуоресценцией при возбуждении УФ-светом. При изучении макронуклеуса обращают внимание на форму ядра, его расположение и размеры. Форму и размеры макронуклеуса (длина, ширина) оценивали по изображениям, просматривая не менее 10 объектов. Цитометрические показатели макронуклеуса (длина, ширина, общая площадь и индекс растяжения) сведены в табл. 1.

Интересно, что биогенные AgНЧ в представленных концентрациях не вызвали никаких морфологических изменений (деформация, вакуолизация, диффузия макронуклеуса), указывающих на генотоксичное действие (рис. 6). Хотя AgНЧ могут оказывать генотоксичное действие, образуя более подвижные ионы серебра внутри клетки, которые генерируют активные формы кислорода

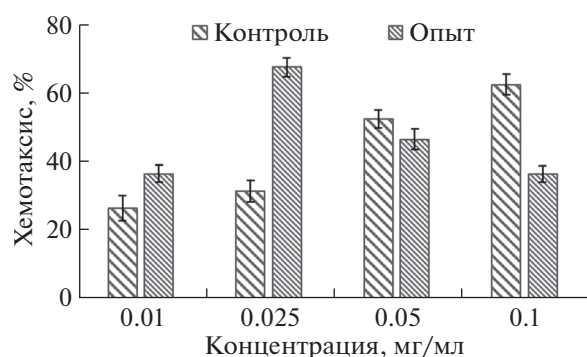


Рис. 4. Исследование хемотаксиса. Распределение клеток *P. caudatum* в контрольной и опытной каплях, после взаимодействия с различными концентрациями биогенных AgНЧ в течение 24 ч.

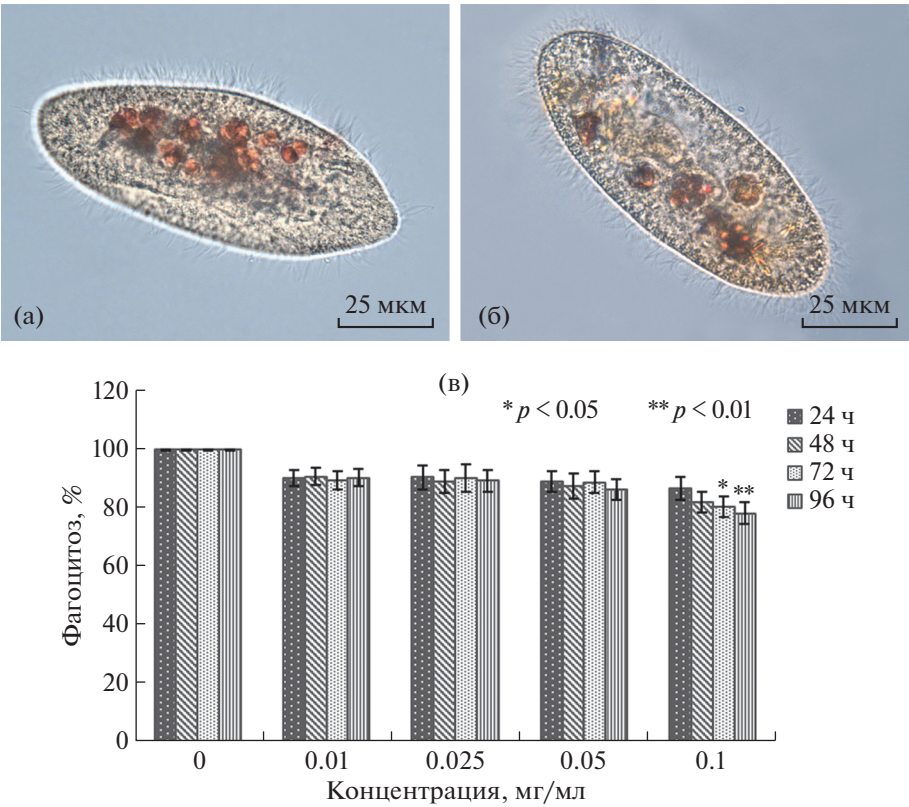


Рис. 5. Оптические изображения пищеварительных вакуолей у *P. caudatum* (окраска Конго красный): контроль (а), биогенные AgНЧ (0.1 мг/мл) (б). Влияние биогенных AgНЧ на фагоцитарную активность у инфузорий *P. caudatum* (в).

и вызывают повреждение ДНК [34]. Например, оксид графена в больших концентрациях вызывал достоверное растяжение макронуклеуса у инфузорий *P. caudatum* [35]. Однако стабилизированные экстрактом сфагнома AgНЧ в концентрации 0.2 мг/мл приводили к гибели парамеций, что не позволило выявить каких-либо морфологических изменений в макронуклеусе, а более низких концентраций оказалось недостаточно для оценки генотоксичности.

Таким образом, стабилизированные экстрактом сфагнома AgНЧ обладают выраженными токсическими свойствами в отношении инфузорий *P. caudatum*. Полученные данные наглядно демонстрируют, что повышение концентрации биогенных AgНЧ оказывает биоцидное действие. Причем согласно ранее проведенным исследованиям покрытие биомолекулами сфагнома не сыграло значительной роли в подавлении образования биопленок бактериями штамма *E. coli* MG 1655, ингибирование образования биопленок

Таблица 1. Цитометрические показатели макронуклеуса у инфузорий *P. caudatum* в зависимости от концентрации биогенных AgНЧ

Размеры макронуклеуса <i>P. caudatum</i>				
Концентрация, мг/мл	Длина (<i>NL</i>), мкм	Ширина (<i>NW</i>), мкм	Площадь поверхности (<i>NS</i>), мкм ²	Индекс вытянутости (<i>NW/NL</i>)
96 ч				
0	34.5 ± 5.5	16.2 ± 0.6	873.4 ± 176	0.52 ± 0.06
0.1	36.9 ± 5.7	15.8 ± 0.8	868.0 ± 128	0.52 ± 0.09
0.05	35.1 ± 5.5	15.4 ± 0.5	848.0 ± 147	0.45 ± 0.1
0.025	34.9 ± 5.9	15.2 ± 0.6	851.7 ± 138	0.47 ± 0.07
0.01	35.0 ± 5.1	15.5 ± 0.8	896.9 ± 153	0.48 ± 0.08

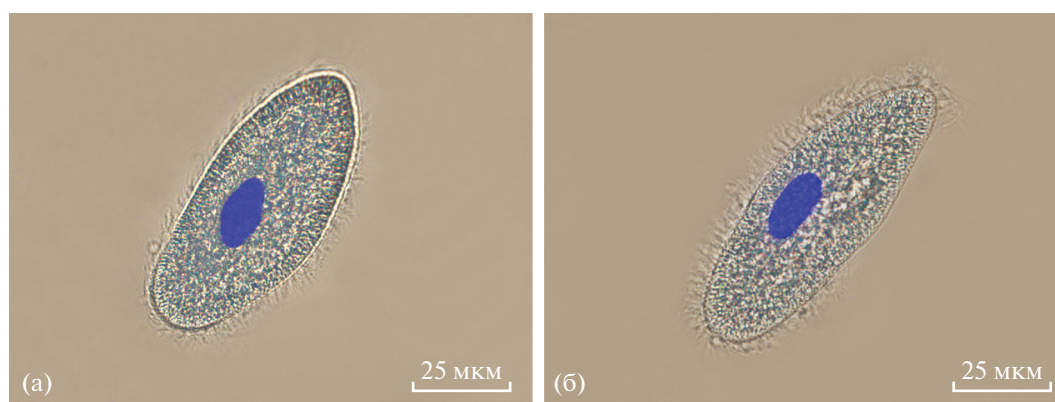


Рис. 6. Изображения оптической и объединенной флуоресцентной микроскопии макронуклеусов *P. caudatum*, окрашенных DAPI: контроль (а), биогенные AgНЧ (0.1 мг/мл) (б).

происходило в основном за счет действия AgНЧ [22]. К тому же высокая токсичность биогенных AgНЧ может быть вызвана медленным растворением в водной среде НЧ с образованием свободных ионов, вносящих дополнительный вклад в токсическое воздействие в условиях длительной временной экспозиции. Например, было установлено, что ионная форма серебра в концентрации 0.4 мг/л вызывала полную гибель инфузорий *P. caudatum* [36]. Биотоксический эффект AgНЧ зависит от ряда факторов, включая форму и размер частиц, концентрацию, поверхностный заряд, химический состав поверхности, а также биодоступность и характер распределения [37]. Различия в токсическом действии могут быть обусловлены разными физико-химическими свойствами исследуемых сред (пресная и морская вода), а также стабильностью частиц в каждой среде. Разные организмы имеют разный уровень чувствительности. При сравнении токсичности химически и биологически синтезированных AgНЧ у взрослых особей *Danio rerio* биогенные AgНЧ оказались менее токсичными, чем синтетические, CL_{50} для химически синтезированных AgНЧ составляла 80 мг/л, а для биогенных — 400 мг/л после 96 ч воздействия [38]. Воздействие биогенных AgНЧ в предельной концентрации 0.2 мМ приводило к изменению метаболизма *D. rerio*, но не вызывало смерти рыб [39]. Для пресноводных ракообразных *Daphnia magna* значения CL_{50} для разных размеров AgНЧ (10–80 нм) варьировались от 0.01 до 0.2 мг/л [40]. Согласно другим исследованиям как биогенные, так и химически синтезированные AgНЧ обладали выраженным концентрационно зависимым цитотоксическим действием на клеточную линию K562 лейкоза человека [3]. Несмотря на различия в чувствительности среди разных организмов, все результаты указывают на дозозависимый эффект, что согласуется с литературными данными. В частности, было обнаружено, что AgНЧ вызыва-

ют острые дозозависимые реакции как у пресноводных, так и у морских видов [33, 41].

Биологически синтезированные AgНЧ могут быть многообещающим вариантом для различных применений как в промышленной, так и в медицинской сфере. Биогенные AgНЧ могут рассматриваться не только как средства, обладающие антибактериальной активностью, но и как антипротозойные средства, против простейших, вызывающих зоонозы у человека (лейшманиоз и токсоплазмоз), которые трудно поддаются лечению доступными химиотерапевтическими препаратами [42, 43]. Помимо широкого спектра применения биогенных AgНЧ очень важно учитывать их токсичность. Чаще всего токсический эффект НЧ исследуется на клеточных культурах и значительно в меньшей степени с использованием живых моделей. Инфузории *P. caudatum* могут быть использованы в качестве недорогого, удобного тест-объекта для оценки токсичного действия биогенных НЧ и более глубокого понимания механизмов их действия на живые организмы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно полученным результатам стабилизированные экстрактом сфагнома AgНЧ оказывают токсическое действие на инфузории *P. caudatum*, демонстрируя выраженный дозозависимый эффект. Токсические эффекты воздействия биогенных AgНЧ изучались по биологическим реакциям исследуемого тест-организма. В процессе исследования выяснилось, что стабилизированные экстрактом сфагнома AgНЧ в концентрации 0.2 мг/мл оказывали выраженное биоцидное действие, вызывая гибель парамеций в течение 10 мин. Частицы в концентрации 0.1 мг/мл также влияли на жизнеспособность клеток, ингибируя размножение. Напротив, низкие концентрации биогенных AgНЧ (0.01–0.05 мг/мл) не оказывали цитотоксического действия на инфузории.

В концентрациях от 0.01 до 0.1 мг/мл не наблюдалось ингибирования фагоцитарной активности и достоверных изменений цитометрических показателей макронуклеуса. Водные организмы имеют разную чувствительность к AgНЧ, что может быть обусловлено разными факторами, включая размер и форму частиц, концентрацию, поверхностный заряд и химический состав поверхности, а также высвобождение ионов серебра из НЧ.

Спрос на уникальные свойства биогенных AgНЧ в различных областях продолжает расти. Биологически синтезированные AgНЧ могут найти широкое применение в медицинской сфере в качестве антибактериальных и антипротозойных средств, а инфузории могут быть использованы в качестве недорогого и удобного тест-объекта для оценки биоцидного действия НЧ. Однако у AgНЧ как биогенных, так и химически синтезированных есть потенциальные проблемы с точки зрения воздействия на окружающую среду, где они могут стать угрозой для экологической безопасности. В свою очередь, инфузории могут использоваться для экологического мониторинга, так как имеют короткий жизненный цикл, повсеместное распространение и быстро реагируют на изменения окружающей среды. Поэтому необходимы более подробные изучения воздействия биогенных НЧ на окружающую среду и проведение дальнейших исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-10034).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ahamed M., AlSalhi M., Siddiqui M.* // Clin. Chim. Acta. 2010. V. 411. № 23–24. P. 1841. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.08.016>
2. *Mohan Y., Lee K., Premkumar T., Geckeler K.* // Polymer. 2007. V. 48. № 1. P. 158. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.10.045>
3. *Datkhile K.D., Durgawale P.P., Patil M.N.* // Biomed. Pharmacol. J. 2017. V. 10. № 1. P. 337. <https://doi.org/10.13005/bpj/1114>
4. *Ravindra S., Mohan Y.M., Reddy N.N., Raju K.M.* // Colloids Surf. A. 2010. V. 367. № 1–3. P. 31. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.06.013>
5. *Duran N., Marcato P.D., De Souza G.I. et al.* // J. Biomed. Nanotechnol. 2007. V. 3. № 2. P. 203. <https://doi.org/10.1166/jbn.2007.022>
6. *Wijnhoven S.W.P., Peijnenburg W.J.G.M., Herberts C.A. et al.* // Nanotoxicology. 2009. V. 3. № 2. P. 109. <https://doi.org/10.1080/17435390902725914>
7. *Conde J., Doria G., Baptista P.* // J. Drug Deliv. 2012. P. 751075. <https://doi.org/10.1155/2012/751075>
8. *Akhtar M.S., Panwar J., Yun Y.S.* // ACS Sustain. Chem. Eng. 2013. V. 1. P. 591. <https://doi.org/10.1021/sc300118u>
9. *Mittal A.K., Chisti Y., Banerjee U.C.* // Biotechnol. Adv. 2013. V. 31. P. 346. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003>
10. *Singh J., Dutta T., Kim K.H. et al.* // J. Nanobiotechnol. 2018. V. 16. P. 84. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0408-4>
11. *Punjabi K., Choudhary P., Samant L. et al.* // Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 2015. V. 30. № 1. P. 219.
12. *McShan D., Ray P.C., Yu. H.* // J. Food Drug Anal. 2014. V. 22 № 1. P. 116. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.010>
13. *Ale A., Liberatori G., Vannuccini M.L. et al.* // Aquat. Toxicol. 2019. V. 211. P. 46. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.03.018>
14. *Park M., Neigh A., Vermeulen J. et al.* // Biomaterials. 2011. V. 32. № 36. P. 9810. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.085>
15. *Gottschalk F., Sonderer T., Scholz R.W., Nowack B.* // Environ. Sci. Technol. 2009. V. 43. № 24. P. 9216. <https://doi.org/10.1021/es9015553>
16. *Bondarenko O., Juganson K., Ivask A. et al.* // Arch. Toxicol. 2013. V. 87. P. 1181. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1079-4>
17. *Piersanti A., Juganson K., Mozzicafreddo M. et al.* // Environ. Pollut. 2021. V. 269. P. 115965. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115965>
18. *Karayanni H., Christaki U., Van Wambeke F. et al.* // J. Geophys. Res. 2005. V. 110. P. C07S15. <https://doi.org/10.1029/2004JC002602>
19. *Jia R., Zhang Y., Wang Y. et al.* // J. Hazard. Mater. 2024. V. 465 P. 133058. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.133058>
20. *Juganson K., Mortimer M., Ivask A. et al.* // Environ. Pollut. 2017. V. 225. P. 481. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.013>
21. *Володина Т.А.* // Омский научный вестник. Сер. Ресурсы Земли. Человек. 2012. Т. 2. № 114. С. 30.
22. *Akhatova F., Konnova S., Kryuchkova M. et al.* // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. P. 9274. <https://doi.org/10.3390/ijms24119274>
23. ГОСТ Р 57166-2016. Вода. Определение токсичности по выживаемости пресноводных инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg. Введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 17 октября 2016 г. № 1414-ст. 27 с.
24. 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. № 1477-ст (с изменениями на 15.11.2016 г). 30 с.
25. *Takiguchi N., Tajima T., Asayame K. et al.* // J. Biosci. Bioeng. 2002. V. 93. P. 416. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(02\)80077-9](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(02)80077-9)
26. *Nilsson J.R.* // Acta Protozool. 2003. V. 42. P. 19.
27. *Hussain M.M., Amanchi N.R., Solanki V.R., Bhagavathi M.* // Pestic. Biochem. Physiol. 2008. V. 2. P. 66. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.07.006>

28. *Fudyma J.D., Lyon J., Tabrizi R.A. et al.* // Plant Direct. 2019. V. 3. P. 1.
<https://doi.org/10.1002/pld3.179>
29. *Василькевич В.М., Богданов Р.В., Гилевская К.С. и др.* // Российские нанотехнологии. 2023. Т. 18. № 1. С. 135.
<https://doi.org/10.56304/S199272232301017X>
30. *Wahab Md A., Li L., Li H., Abdala A.* // Nanomaterials. 2021. V. 11. № 3. P. 581.
<https://doi.org/10.3390/nano11030581>
31. *Roy A., Bulut O., Some S. et al.* // RSC Adv. 2019. V. 9. P. 2673.
<https://doi.org/10.1039/C8RA08982E>
32. *Kryuchkova M., Danilushkina A., Lvov Y., Fakhrullin R.* // Environ. Sci.: Nano. 2016. V. 3. P. 442.
<https://doi.org/10.1039/C5EN00201J>
33. *Browning L.M., Lee K.J., Nallathamby P.D., Xu X.-H.N.* // Chem. Res. Toxicol. 2013. V. 26. № 10. P. 1503.
<https://doi.org/10.1021/tx400228p>
34. *Hsiao I.L., Hsieh Y.K., Wang C.F. et al.* // Environ. Sci. Technol. 2015. V. 49. № 6. P. 3813.
<https://doi.org/10.1021/es504705p>
35. *Kryuchkova M., Fakhrullin R.* // Environ. Sci. Technol. Lett. 2018. V. 5. № 5. P. 295.
<https://doi.org/10.1021/acs.estlett.8b00135>
36. *Асанова А.А., Полонский В.И.* // Проблемы агрохимии и экологии. 2017. № 4. С. 60.
37. *Akter M., Sikder M.T., Rahman M.M. et al.* // J. Adv. Res. 2018. V. 9. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.10.008>
38. *Sarkar B., Netam S.P., Mahanty A. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. India. B. Biol. Sci. 2014. V. 84. № 4. P. 885.
<https://doi.org/10.1007/s40011-013-0298-z>
39. *Otoni C.A., Lima Neto M.C., Leo P. et al.* // Chemosphere. 2020. V. 239. P. 124698.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124698>
40. *Ivask A., Kurvet I., Kasemets K. et al.* // PLoS ONE. 2014. V. 9. P. e102108.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102108>
41. *Gambardella C., Costa E., Piazza V. et al.* // Mar. Environ. Res. 2015. V. 111. P. 41.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.06.001>
42. *Fanti J.R., Tomiotto-Pellissier F., Miranda-Sapla M.M. et al.* // Acta Trop. 2018. V. 178. P. 46.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.027>
43. *Machado L.F., Sanfelice R.A., Bosqui L.R. et al.* // Exp. Parasitol. 2020. V. 211. P. 107853.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107853>