

**ИЗУЧЕНИЕ БИОЦИДНОГО ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ  
СЕРЕБРА, МЕДИ И ДИОКСИДА КРЕМНИЯ НА МОДЕЛИ  
СВОБОДНОЖИВУЩЕЙ ИНФУЗОРИИ-ТУФЕЛЬКИ  
*PARAMECIUM CAUDATUM***

<sup>1</sup>П.А. Красочко, <sup>1</sup>Р.Б. Корочкин, <sup>1</sup>М.А. Понаськов, <sup>2</sup>В.И. Еремец,  
<sup>2</sup>Л.А. Неминущая, <sup>2</sup>Т.А. Скотникова

<sup>1</sup>УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия  
ветеринарной медицины», Витебск, Республика Беларусь  
krasochko@mail.ru;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический  
институт биологической промышленности», Щелково, Московской обл.  
e-mail: vnitibp@mail.ru

**Резюме.** Использование нанокomпонентов практически во всех областях деятельности человека помимо получения выгод их применения поднимает вопрос о безопасности таких веществ из-за непредсказуемого воздействия на экологию. В данном исследовании авторами предложена модель использования реснитчатого протистного организма *Paramecium caudatum*, обитателя прудовых водоемов, в качестве удобной модели для оценки биоцидного действия растворов наночастиц благородных металлов и биоэлементов.

**Summary.** The use of nanocompounds in almost all areas of human activity, in addition to obtaining benefits, raises the question on the biosafety of such substances due to unpredictable environmental impacts. In this study, the authors proposed a model for using the ciliary protist organism *Paramecium caudatum*, an inhabitant of pond reservoirs, as a convenient model for assessing the biocidal effect of solutions of noble metal nanoparticles and bioelements.

**Ключевые слова:** наночастицы серебра, наночастицы меди, наночастицы кремния диоксида, биоцидность, инфузория-туфелька, *Paramecium caudatum*.

**Key words:** silver nanoparticles, copper nanoparticles, silicon dioxide nanoparticles, biocidal activity, ciliates, *Paramecium caudatum*.

**Введение.** Достижения нанотехнологий позволили значительно расширить сферы применения материалов, содержащих нано-

компоненты, что неизбежно приводит к воздействию наноразмерных частиц на живые биообъекты. С другой стороны, все еще остаются значительные сомнения в отношении влияния наноматериалов на биологические объекты, поскольку даже инертные вещества могут стать реакционными, иммуногенными или иным образом вредными для жизнедеятельности при применении в наноразмерных формах. Недавние исследования свидетельствуют о том, что некоторые наноматериалы не так биосовместимы, как считалось ранее, из-за их потенциала к биоаккумуляции и генерации активных форм кислорода в клетках-хозяевах [6]. Кроме того, мало что известно об экотоксическом действии наночастиц, попадающих в окружающую среду, а недавние исследования обитающих в воде эукариот, таких как *Daphnia spp.* и другие, продемонстрировали, что наноконпоненты могут потенциально нарушать водные экосистемы [5]

Оценку экотоксического действия различных ксенобиотиков ранее предлагалось проводить на насекомых, рыбах и даже грызунах [4], однако наиболее подходящей моделью для этого являются протистные организмы. Клетки простейших практически идеально могут служить в качестве биоиндикаторов химического загрязнения, особенно в водных средах, так как, во-первых, последние представляют собой их естественную среду обитания, во-вторых, простейшие демонстрируют значительный потенциал биоадаптации к токсикантам и, в-третьих, они очень удобны для тестирования. Применение одноклеточных организмов для изучения токсического воздействия загрязнителей является относительно новым явлением в лабораторной практике.

Определению токсического воздействия наночастиц металлов на одноклеточные эукариотические протистные тест-объекты в мировой научной практике уделялось лишь небольшое внимание, поэтому существует лишь ограниченное число научных статей, посвященных этой теме. Фактически отсутствует единая методика оценки токсического действия наночастиц на одноклеточные эукариоты.

Для оценки действия коллоидных растворов наночастиц на живую клетку была использована модель свободноживущей инфузории-туфельки *Paramecium caudatum*. Данный представитель реснитчатых относится к числу высокоорганизованных простейших,

представляет собой широко распространенный обитатель пресноводных водоемов.

Свободноживущие инфузории-туфельки *Paramecium caudatum* используется для скрининга природных соединений, обладающих адаптогенными и бактерицидными свойствами [1]. Этот протистный организм имеет двойственную природу. С одной стороны, эта инфузория имеет все структурные признаки клетки, но, с другой стороны, она реагирует на внешние раздражители как самостоятельный организм. Она не требовательно к условиям культивирования, поэтому при исследовании ее свойств возможно получать большое количество данных [2].

В качестве тестируемых компонентов нами были выбраны 3 разновидности наночастиц: серебра, меди и диоксида кремния. Первый из них является благородным металлом, а остальные представляют собой биоэлементы, однако экотоксичность их наноразмерных частиц практически никем не изучена.

**Цель и задачи.** Целью нашего исследования являлось изучение биоцидных свойств коллоидных растворов наночастиц серебра, меди и диоксида кремния методом биотестирования с применением инфузории *Paramecium caudatum* в качестве тест-объекта. Для решения поставленной цели были поставлены сразу несколько задач: провести экспресс-оценку биологической активности изучаемых коллоидных растворов наночастиц; определить биологическую активность скринингуемых коллоидных растворов; оценить биологическую активность изучаемых коллоидных растворов по интенсивности размножения парамеций.

**Материалы и методы исследований.** Изучение влияние коллоидных растворов наночастиц серебра, меди и диоксида кремния на модели свободноживущей инфузории-туфельки *Paramecium caudatum* проводили согласно методическим рекомендациям «Скрининг биостимулирующих и биоцидных веществ (адаптогены, бактерициды и другие препараты)» [3].

Инфузории-туфельки *Paramecium caudatum* – это саморегулирующие живые организмы, обладающее высокой степенью приспособляемости к раздражителям внешней среды. При контакте с последними они вырабатывают различные защитные соединения длительного действия.

Согласно методических рекомендаций, культивирование инфузорий-туфелек *Paramecium caudatum* проводили в среде Лозина-

Лозинского (рН 6,2–7,8) и температуре от 20°С до 26°С. Кормом для инфузорий-туфелек были выбраны живые дрожжи *Rhodotorula gracilis* с добавлением зерен риса.

Исследование проводилось в 3 этапа. На первом этапе проводили экспресс-оценку биологической активности коллоидных растворов наночастиц серебра, меди и диоксида кремния. Все дисперсии имели концентрацию наночастиц около 300 мкг·мл<sup>-1</sup>.

Для этого в 54 пробирок наливали по 4,2 мл культуры инфузорий *Paramecium caudatum* в стационарной фазе роста. В качестве контроля использовали дистиллированную воду, известный бактерицид (норфлоксацин), адаптоген (элеутерококк). В первую пробирку добавляли одинаковый объем подготовленного раствора наночастиц, после чего перемешивали, получая, таким образом, разведение раствора наночастиц 1:2, или (для математической записи) 1×2<sup>-1</sup>. Методом дальнейшего разбавления смеси получали разведения наночастиц 1:3; 1:4, 1:5, 1:6 и 1:7, или 1×3–7<sup>-1</sup>. После этого штатив с пробирками помещали на 24 часа в термостат при температуре 22°С. Затем брали содержимое каждой пробирки в объеме 0,1 мл и заполняли им микроаквариумы.

Оценку состояние инфузорий-туфелек проводили по следующим показателям: ПН - индифферентность (у инфузорий заметно равномерное броуновское движение); БА - биоактивность (изменение движения инфузорий); БЦ<sub>50</sub> — биоцидность (гибель 50±5% инфузорий); БЦ<sub>100</sub> - биоцидность (гибель 90%±10% инфузорий), причем в контрольных образцах должно быть не менее 100 инфузорий, совершающих равномерное броуновское движение.

Критериями оценки результатов служили два показателя: ИМ - показатель, когда химическое соединение признавалось не оказывающим биоцидного воздействия и БЦ - биоцидность. Степень биоцидности оценивали по следующим уровням: 1:1000 - слабая, 1:10000 - средняя, 1:100000 - сильная и 1:1000000 - высокая.

На втором этапе определяли биологическую активность скринируемых коллоидных растворов наночастиц серебра, меди и диоксида кремния методом функциональной нагрузки.

Для этого брали 4 пробирки по 1 мл культуры инфузорий *Paramecium caudatum*, к которой добавляли 0,3 мл 8%-ного раствора хлористого натрия, вызывающего гибель 100% парамеций в течение 5-ти минут. Учёт гибели инфузорий осуществляли в микроаквариумах под микроскопом и использованием таймера. Затем к 1

мл содержимого пробирок первого этапа добавляли 0,3 мл 8%-ного раствора хлористого натрия и измеряли время до 100% гибели всех парameций. Для получения достоверных данных опыт проводили несколько раз.

Учёт результатов проводили по формуле:

$$\text{ИБА} = \frac{\text{ТО}}{\text{ТК}} \quad (1),$$

где:

ИБА - индекс биологической активности скринингуемого (исследуемого) соединения;

ТО - продолжительность жизни (в минутах) инфузорий-туфельек под действием 0,3 мл 8%-ого раствора хлористого натрия, проживших 24 часа в среде Лозина-Лозинского с исследуемой концентрацией скринингуемого (исследуемого) соединения;

ТК - продолжительность жизни (в минутах) инфузорий-туфельек под действием 0,3 мл 8%-го раствора хлористого натрия, проживших 24 часа в контрольной среде.

После расчета показателя индекса биологической активности (ИБА) проводили ее оценку по следующим его значениям: при значении ИБА  $1,000 \pm 0,1000$  химическое соединение признавалось биоинертным; показатель ИБА выше  $1,000 \pm 0,1000$  указывал на положительное влияние химического соединения на жизнеспособность парameций; показатель ИБА менее  $1,000 \pm 0,1000$  указывало на снижение жизнеспособности парameций под действием химического соединения.

На третьем этапе исследований осуществляли оценку биологической активности коллоидных растворов наночастиц серебра, меди и диоксида кремния по интенсивности размножения парameций.

Для данного этапа использовали инфузорий-туфельек в активной фазе роста. В начале опыта определяли плотность инокулята (количество парameций в 1 мл среды), для чего определяли количество клеток в 1 мл культуры. Для этого к 1 мл парameций добавляли 20 микролитров 5% спиртового раствора йода. Затем содержимое аккуратно перемешивали, помещали в камеру Фукса-Розенталя и подсчитывали количество парameций в 10 квадратах. Определяли среднее количество парameций в 1 квадрате (объем – одна десятитысячная мл) и умножали на 10 000.

Далее работу осуществляли по методике, описанной на первом этапе. Затем пробирки ставили в термостат при температуре 22°C на 72 часа, в течение которых пробирки периодически встря-

живали 2–3 раза в день. Через 72 часа в каждой пробирке определяли плотность инокулята.

Расчёты проводили по формуле 2:

$$\text{ИИР} = \frac{(\text{ПИОК} \times \text{ПИКИ})}{(\text{ПИКК} \times \text{ПИОН})} \quad (2)$$

где:

ИИР – индекс интенсивности размножения парameций;

ПИОК – плотность инокулята в опыте после 72 часов инкубации;

ПИКН – плотность инокулята в контроле перед инкубацией;

ПИКК – плотность инокулята в контроле после 72 часов инкубации;

ПИОН – плотность инокулята в опыте перед инкубацией.

После расчета показателя индекса интенсивности размножения парameций его оценку проводили, исходя из следующих значений: ИИР = 1,000±0,100 - химическое соединение признавалось биологически инертным; ИИР более 1,000±0,100 - химическое соединение стимулирует размножение парameций; ИИР менее 1,000±0,100 - химическое соединение угнетает размножение парameций.

**Результаты исследований.** В ходе проведения серии опытов по оценке токсического действия коллоидных растворов наночастиц благородных металлов и биоэлементов были получены качественные результаты, которые отражены в таблице 1.

Таблица 1 – Скрининг по критерию «концентрации – эффект»

Исследуемое вещество	Биоцидность в разведениях $1 \times n^{-1}$					
	2	3	4	5	6	7
Контроль	–	–	–	–	–	–
Элеутерококк	+	–	–	–	–	–
Норфлоксацин	+	+	+	+	+	+
Наночастицы серебра	+	+	+	+	+	±
Наночастицы меди	+	+	±	±	–	–
Наночастицы диоксида кремния	+	+	±	±	±	–

Примечание: – биоцидность нет; ± до 50%; + есть 100%.

Согласно данным таблицы 1, изучаемые коллоидные растворы наночастиц имеют различающуюся биоцидную активность. Так, у коллоида наночастиц серебра ее уровень был значительно выше по сравнению с коллоидными растворами биоэлементов. В частности, разведения раствора наночастиц серебра 1:2-1:6 однозначно проявляли высокую биоцидность в отношении парameций, в то время как

растворы наночастиц меди вызывали гибель инфузорий в разведениях 1:2–1:3, после чего их активность снижалась. Раствор наночастиц диоксида кремния имел сопоставимую биоцидность (1:2–1:3 при более плавном ее снижении). Растворы наночастиц биоэлементов в разведении  $1 \times 7^{-1}$  (или 1:7) не оказывают влияния на жизнеспособность инфузорий, хотя раствор наночастиц серебра при данном разведении все еще не являлся биоинертным.

Результаты изучения влияния изучаемых коллоидных растворов наночастиц на выносливость *Paramecium caudatum* к токсической нагрузке отображены в таблице 2.

Полученные данные свидетельствует, что элеутерококк способствует повышению сопротивляемости клеток, а норфлоксацин и изучаемые коллоидные растворы наночастиц проявляет выраженное биоцидное действие, причем последние оказались активны до разведения 1:3.

Таблица 2 – Скрининг по критерию «концентрация – продолжительность сопротивляемости клеток функциональной нагрузке»

Исследуемое вещество	Биоцидность в разведениях $1 \times n^{-1}$					
	2	3	4	5	6	7
Контроль	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Элеутерококк	–	1,560	1,918	1,334	1,016	1,002
Норфлоксацин	–	–	0,698	1,046	0,957	0,854
Наночастицы серебра	–	–	0,655	0,988	0,856	0,799
Наночастицы меди	–	–	0,589	0,856	0,789	0,655
Наночастицы диоксида кремния	–	–	0,455	0,745	0,675	0,578

Примечание: - биоцидное действие.

Результаты определения биологической активности изучаемых коллоидных наночастиц по интенсивности размножения парameций приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Влияние изучаемых препаратов на размножение инфузорий

Исследуемое вещество	Оптимальная концентрация $1 \times n^{-1}$	Индекс интенсивности размножения инфузорий
Контроль	–	1,000
Элеутерококк	5	1,589
Норфлоксацин	7	0,450
Наночастицы серебра	7	0,390
Наночастицы меди	8	0,462
Наночастицы диоксида кремния	9	0,385

Согласно данным таблицы 3 раствор элеутерококка в концентрации 1:5 повышает интенсивность деления парameций в 1,589 раза. Изучаемые биоциды (норфлоксацин и коллоидные растворы наночастиц) в концентрациях, не вызывающих 100%-й гибели инфузорий, тем не менее, угнетают интенсивность их размножения на 55–61%.

**Заключение и выводы.** Результаты наших исследований позволяют сделать следующие выводы:

1. Инфузория-туфелька *Paramecium caudatum* может быть использована в качестве недорого, удобного тест-объекта для оценки биоцидного действия наночастиц благородных металлов и биоэлементов.

2. Изучаемые коллоидные растворы наночастиц обладает выраженными биоцидными свойствами, причем коллоид благородного металла (серебра) имеет намного выраженную токсическую активность в отношении одноклеточной протистной биологической модели по сравнению с растворами наночастиц биоэлементов (меди и диоксида кремния).

3. С целью изучению цитотоксического и экотоксического воздействия коллоидных растворов наночастиц необходимо провести ряд дополнительных исследований по определению их всестороннего влияния на протистные организмы в качестве тестовой лабораторной модели.

#### Литература

1. Володина Т. А. Обоснование оптимального состава композиций из растительных экстрактов с использованием биологического теста на парameциях // ОНВ. – 2012. – №2 (114). Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/obosnovanie-optimalnogo-sostava-kompozitsiy-iz-rastitelnyh-ekstraktov-s-ispolzovaniem-biologicheskogo-testa-na-parametsiyah>. – Дата доступа : 10.06.2020.
2. Демиденко Г.А., Шуранов В.В. Оценка токсичности кормов с использованием инфузорий *Paramecium caudatum* //Вестник КрасГАУ. – 2015. – № 10. – Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/otsenka-toksichnosti-kormov-s-ispolzovaniem-infuzoriy-paramecium-caudatum>. – Дата доступа : 10.06.2020.
3. Шабунин С.В. и др.. Скрининг биостимулирующих и биоцидных веществ (адаптогены, бактерициды и другие препараты): методические рекомендации – Москва – Воронеж: Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии, 2006. – 51 с.
4. J. Venkateswara Rao et al. Acute toxicity bioassay using *Paramecium caudatum* , a key member to study the effects of monochrotophos on swimming behaviour, morphology and reproduction // Toxicological & Environmental Chemistry. – 2007. – Vol. 89, Issue 2. – P. 307–317.



5. I. Blinova et al. Ecotoxicity of nanosized magnetite to crustacean *Daphnia magna* and duckweed *Lemna minor* //Hydrobiologia. – 2017. – Vol. 798, Issue 1. – P. 141–149.

6. Mayne R., Cells J., Whiting, A. Adamatzky. Toxicity and Applications of Internalised Magnetite Nanoparticles Within Live *Paramecium caudatum* // BioNanoScience. – 2018. – Vol. 8, Issue 1. – P. 90–94.

DOI 10.47804/978-5-89904-028-3\_2020\_296

## НЕКУЛЬТИВИРУЕМОЕ СОСТОЯНИЕ БАКТЕРИЙ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

*И.И.Тарасова*

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности». Щелково, Московской обл.  
e-mail: vnitibp@mail.ru

**Резюме.** В статье представлен анализ литературы и собственных исследований некоторых аспектов индукции/реверсии микроорганизмов в/из L - формы как сукцессионной трансформации (стадии).

**Summary.** L-forms are known for a wide variety of microorganisms, including pathogens. The aim of this review is data analysis L-forms of pathogenic and saprophytic microbes, their detection and resuscitation.

**Ключевые слова:** L - формы, некультивируемое состояние бактерий (НС), цистоподобные формы (ЦПФ), реверсия, индукторы НС.

**Key words:** L-forms, viable but not culturable, detection, resuscitation.

**Введение.** До настоящего времени в науке и практике, активно изучались свойства, физиология микроорганизмов, путем их культивирования на жидких и плотных питательных средах («культуральный» анализ). Однако, сейчас известно, что большое число видов микроорганизмов могут переходить в физиологическое состояния, подобное анабиозу - в L - формы (НС), при этом замедляется или временно прекращается деление, что затрудняет или делает невозможным их анализ стандартными культуральными методами. Некультивируемое состояние НС (dormant, dormancy, moribund, quiescent, resting, starved, sublethally damaged, viable but not culturable (VBNC), nonculturable state, dormancy, detection, resuscitation)