

УДК 581.1; 582.232; 628.394

ВЛИЯНИЕ НАНОКОМПОЗИТА Ag/AgCl НА КУЛЬТУРЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ SCENEDESMUS QUADRICAUDA И PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM

А.Г. Тригуб¹, В.И. Ипатова²

¹ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, 107140, г. Москва, Российская Федерация
²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, г. Москва, Российская Федерация

Токсичность нанокompозита Ag/AgCl оценивали в разных концентрациях в хронических опытах 41 сут, используя стандартные пресноводные и морские растительные тест-организмы *Scenedesmus quadricauda* (0,05; 0,1; 0,5 и 1,0 мг/л) и *Phaeodactylum tricornutum* (0,25; 0,5; 1,0 и 2,0 мг/л). Проведена сравнительная чувствительность тест-организмов в острых экспериментах (72 час) по величине полуметальной концентрации (LC_{50}). Установлено, что зеленая водоросль *S. quadricauda* более чувствительна к нанокompозиту Ag/AgCl ($LC_{50} = 0,02$ мг/л), чем морская диатомея *P. tricornutum* ($LC_{50} = 0,3$ мг/л). Наибольший альгицидный эффект на рост культуры *S. quadricauda* оказал нанокompозит в концентрациях 1 и 0,5 мг/л, при которых культура не росла на протяжении всего эксперимента. А при концентрациях 0,1 и 0,05 мг/л наблюдался альгостатический эффект в течение 10 и 1 сут, соответственно, после чего культура возобновляла рост. В культуре *P. tricornutum* при концентрациях 1,0 и 2,0 мг/л происходило длительное ингибирование роста, однако после 25 сут при 1,0 мг/л численность клеток начинала увеличиваться. В присутствии 0,5 мг/л культура возобновляла рост после 4-сут лаг-фазы и догоняла по численности контроль. В концентрации 0,25 мг/л рост *P. tricornutum* был или на уровне контроля или даже превышал его. Различия в ответной реакции двух видов водорослей можно объяснить как индивидуальной особенностью вида, так и более сложным составом морской питательной среды, снижающей токсичность нанокompозита. По данным аналитической электронной микроскопии установлено, что серебро из нанокompозита Ag/AgCl уже через сутки попадает внутрь клеток водорослей *S. quadricauda* и *P. tricornutum*, беспрепятственно проходя как через клеточную стенку, так и мембрану клеток.

Ключевые слова: *Scenedesmus quadricauda*, *Phaeodactylum tricornutum*, нанокompозит Ag/AgCl, токсичность.

Введение. Увеличение интереса к наночастицам связано с возможностью использования наноматериалов во многих областях науки и техники. К одним из таких продуктов относятся наночастицы серебра, которые могут быть в виде кластеров, коллоидов и нанокompозитов с различными стабилизаторами. Препараты на основе наносеребра представляют серьезный научный интерес и широко используются для санитарно-гигиенических целей.

Широкий спектр антибактериального, антивирусного и фунгицидного действия характерен как для ионов, так и для наночастиц серебра (НЧС) [1, 2]. Эффективность НЧС зависит от концентрации и их стабильности, размера и формы. В наноразмерном состоянии любые вещества приобрета-

ют новые химические, физические и биологические свойства, существенно отличающиеся от их свойств в макрообъемном состоянии [3]. Чем меньше НЧС, тем больше отношение площади поверхности к объему, что увеличивает область контакта серебра с бактериями или вирусами, значительно повышая антимикробный эффект [4].

В краткосрочных экспериментах на примере лабораторных культур водорослей показано, что наиболее чувствительными к НЧС являются пресноводные зеленые водоросли *Scenedesmus quadricauda* и морские диатомовые водоросли *Phaeodactylum tricornutum* по сравнению с организмами зоопланктона и мальками рыб [5].

У зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* наиболее чувствительной мишенью является фо-

Тригуб Анатолий Григорьевич (Trigub Anatolii Grigoryevich), младший научный сотрудник лаборатории эколого-токсикологических исследований ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии, 107140, г. Москва, trigub931@gmail.com
 Ипатова Валентина Ивановна (Ipatova Valentina Ivanovna), к.б.н., доцент, старший научный сотрудник кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва, viipatova@hotmail.com.

тосинтетический аппарат. Происходит снижение активности ФС II, нарушается поток электронов от ФС II в пул хинонов, снижается энергизация мембран [6]. Показано [7], что в присутствии НЧС происходит уменьшение содержания хлорофилла в клетках водорослей *Chlorella vulgaris* и *Dunaliella tertiolecta* и увеличение образования активных форм кислорода.

Одной из задач, стоящих перед исследователями, является выяснить, токсичны ли на самом деле НЧС или токсичны ионы Ag^+ , выделяемые этими частицами. Исследование влияния НЧС и ионов Ag^+ (в форме соли $AgNO_3$) на фотосинтез водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* показало [8], что $AgNO_3$ в 18 раз токсичнее НЧС по величине EC_{50} . При этом в суспензии НЧС вначале присутствовало всего 1% ионной формы (Ag^+). Однако токсичность НЧС может со временем увеличиваться вследствие поступления ионов серебра в среду в течение экспозиции в присутствии водорослей.

Следующей немаловажной задачей является выяснение путей поступления НЧС в клетку. Некоторые авторы полагают, что в клетки проникают не сами НЧС, а выделенные ими ионы серебра (Ag^+) [4, 9, 10].

Предложено несколько путей поступления и накопления НЧС и ионов Ag^+ в клетках водорослей:

1. Адсорбция на клеточной стенке с последующим поступлением внутрь клетки ионов Ag^+ [8, 11];

2. Интернализация – эндоцитозное поглощение НЧС через клеточную мембрану, как было показано на примере золотистой пресноводной водоросли *Ochromonas danica* [12];

3. Выделение ионов Ag^+ из НЧС в среду, а затем поступление ионов Ag^+ внутрь клетки [8, 10, 13, 14]

Несмотря на высокую токсичность НЧС, обнаружена способность водорослей *Scenedesmus quadricauda* и *Monoraphidium arcuatum* к адаптации к ним [15] и их детоксификации в воде в присутствии морской диатомовой водоросли *Thalassiosira weissflogii* [11].

Ag^+ оказывают плейотропное действие на различные клеточные процессы, взаимодействуя со многими клеточными мишенями, но основные мишени и механизм действия серебра изучены недостаточно. Для микробной клетки известно, что при низких концентрациях Ag^+ взаимодействуют с мембраной, а при более высоких концентрациях – с цитоплазматическими компонентами внутри клетки. С клетками снаружи связывается около 40 %, а внутрь клетки проникает около 60 % Ag^+ [9, 16].

При действии Ag^+ цитоплазматическая мембрана становится проницаемой, нарушается гра-

диент протонов и из нее выходят ионы калия [17]. Предполагается, что Ag^+ инактивируют ферменты, содержащие тиоловые группы, например, ферменты дыхательной цепи, связанные с мембраной. Показано, что Ag^+ повреждают электрон-транспортную цепь, разобщают окислительное фосфорилирование [18]. Аналогично действуют Ag^+ , образованные из НЧС. Ингибируя дыхательные ферменты, они способствуют синтезу супероксид-аниона, пероксида водорода, гидроксила и других активных форм кислорода, способных повреждать бактериальную клетку. В присутствии Ag^+ нарушается работа цикла трикарбоновых кислот [9, 19]. Известно, что НЧС нарушают работу клеточных стенок, мембран, негативно воздействуют на генетический материал [20].

Токсическое действие наночастиц обусловлено индукцией сильного окислительного стресса, нарушающего баланс между окислительными и антиокислительными процессами в клетке [21, 22]. Такое действие может вызывать взаимодействие Ag^+ с функциональными тиоловыми группами (-SH), поскольку ионы Ag^+ имеют высокое сродство к ним [23]. Увеличение свободных радикалов приводит к повреждению белков, ДНК, а также к перекисному окислению липидов [24].

В санитарных нормах России для Ag^+ установлен норматив ПДК равный 0,05 мг/л и присвоен второй класс опасности (высоко опасное вещество), а в гигиенических нормативах содержания приоритетных наноматериалов в объектах окружающей среды» представлен ориентировочно допустимый уровень (ОДУ) содержания наночастиц равный 0,05 мг/л. Увеличивающееся производство промышленных товаров, содержащих наночастицы, в том числе и наночастицы серебра, увеличивает и риск их попадания в водоемы. До настоящего времени нет разработанного норматива содержания НЧС для водных объектов рыбохозяйственного значения [5, 25].

Синтезируемые на основе серебра наноматериалы и наночастицы в случае попадания в окружающую среду могут стать фактором риска для живых организмов [26]. В связи с этим важно проводить оценку их токсичности. Для этих целей может служить широко известный метод биотестирования с использованием тест-организмов различных трофических уровней. При антропогенном загрязнении одними из наиболее уязвимых объектов в водной экосистеме являются продуценты, в частности организмы фитопланктона.

Целью данной работы является оценка токсичности нанокompозита $Ag/AgCl$ методом биотестирования с использованием тест-культур микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* и *Phaeodactylum tricornutum*.

Материалы и методы исследования. Для исследований использовали стандартные растительные тест-объекты – пресноводную зеленую ценобиальную микроводоросль *Scenedesmus quadricauda* (= *Desmodesmus communis* (E. Hegew.) E. Hegew.) и морские одноклеточную диатомею *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin, 1897). В качестве токсиканта – биоцидный препарат на основе нанокompозита Ag/AgCl стабилизированного не-ионогенным ПАВ. Размер частиц 10-70 нм. Хронические эксперименты проводили в трех повторностях длительностью 41 сут.

S. quadricauda выращивали на среде Прата, а *P. tricornutum* – на морской среде Гольдберга (в модификации Кабановой) соленостью 20‰ в люминистате при освещенности 3 клк со сменой темного и светового периода каждые 12 часов и температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Постановку и ведение экспериментов проводили согласно методическим указаниям [27]. Для пресноводной водоросли *S. quadricauda* исследованы концентрации 0,05; 0,1; 0,5 и 1,0 мг/л, а для морской – *P. tricornutum* 0,25; 0,5; 1,0 и 2,0 мг/л нанокompозита Ag/AgCl.

Численность водорослей в контроле и опыте определяли методом измерения быстрой флуоресценции хлорофилла а на приборе «Флюорат 02-3М».

Детекцию и выявление локализации серебра в клетках водорослей проводили методом аналитической просвечивающей электронной микроскопии [28] при ускоряющем напряжении 100 кВ на аналитическом просвечивающем микроскопе JEOL -2100 (JEOL, Япония) с энергодисперсионным рентгеновским детектором X-Max (Oxford instruments, Великобритания).

Подготовку клеток водорослей для анализа на аналитическом просвечивающем микроскопе проводили после 1 сут экспозиции водорослей в нанокompозите Ag/AgCl с концентрацией 2 мг/л. Клетки отмывали чистой питательной средой для культивирования путем центрифугирования при 4000 об/мин. Осадок смешивали с чистой средой, содержащей 2,5% глутарового альдегида и 4% формальдегида, а затем дофиксировали в 1% растворе OsO_4 в течение 2 часов. Процедуру обезвоживания проводили в спиртовых растворах возрастающей концентрации (30, 40, 50, 60, 70, 80, 96 каждый этап по 20 минут и 100% 30 минут). Далее проводили заливку ацетоном с эпоксидной смолой (в пропорциях 1:3, 1:1, 3:1) и чистой смолой. Каждый этап заливки занимал сутки. После чего залитые пробы полимеризовали в течение суток при 37°C и до полного застывания при 64°C . Заполимеризованные эпоксидные блоки нарезали на ультрамикротоме алмазным ножом на срезы толщиной 80-100 нм. Полученные срезы монтировали на медные сеточки для электронной

микроскопии с ультратонким слоем из формвара, контрастировали по Рейнольдсу и стабилизировали углеродом.

Статистическую обработку результатов проводили в программе Excel-2010 с использованием пакета анализа данных. Достоверность различий опытных значений от контрольных рассчитывали при помощи критерия Стьюдента для уровня значимости 0,05.

Результаты и обсуждение. Данные по влиянию нанокompозита Ag/AgCl в диапазоне исследованных концентраций от 0,05 до 1 мг/л на культуру *S. quadricauda* представлены на рисунке 1А. Наибольший альгицидный эффект на рост культуры оказал нанокompозит в концентрациях 1 и 0,5 мг/л, при которых в течение всего срока наблюдений (41 сут) культура не росла совсем. При концентрациях 0,1 и 0,05 мг/л наблюдался альгостатический эффект, выражавшийся в отсутствии роста в течение 10 и 1 сут, соответственно, после чего культура возобновляла рост в обоих случаях. Стоит отметить, что хотя значения максимальной численности были ниже максимальных значений в контроле, тем не менее, к 41 суткам численность клеток при 0,1 и 0,05 мг/л нанокompозита была или на уровне контроля или даже превышала его.

Для морской водоросли *P. tricornutum* (рис. 1Б) в диапазоне исследованных концентраций нанокompозита Ag/AgCl от 0,25 до 2,0 мг/л установлено, что при концентрациях 1,0 и 2,0 мг/л происходило длительное ингибирование роста культуры на протяжении эксперимента, однако после 25 сут при концентрации 1,0 мг/л численность клеток начинала увеличиваться. В присутствии 0,5 мг/л культура возобновляла рост после 4 сут лаг-фазы и догоняла по численности контроль на 25 сут. В концентрации 0,25 мг/л рост *P. tricornutum* был или на уровне контроля или даже превышал его. К концу опыта на 41 сут численность клеток при 0,25 и 0,5 мг/л нанокompозита была как в контроле.

Таким образом, различие в ответной реакции двух видов водорослей состояло в том, что по показателю численности клеток минимально летальной концентрацией для *S. quadricauda* была 1 мг/л, а для *P. tricornutum* – 2 мг/л, что свидетельствует о большей устойчивости к токсическому действию нанокompозита морской водоросли по сравнению с пресноводной. Это можно объяснить как индивидуальной особенностью вида, так и более сложным составом морской питательной среды, снижающей токсичность нанокompозита.

В проведенных исследованиях при оценке эффектов НЧС были определены их полуэффективные концентрации. Установлено, что зеленая водоросль *S. quadricauda* более чувствительна к нанокompозиту Ag/AgCl ($\text{LC}_{50} = 0,02$ мг/л), чем

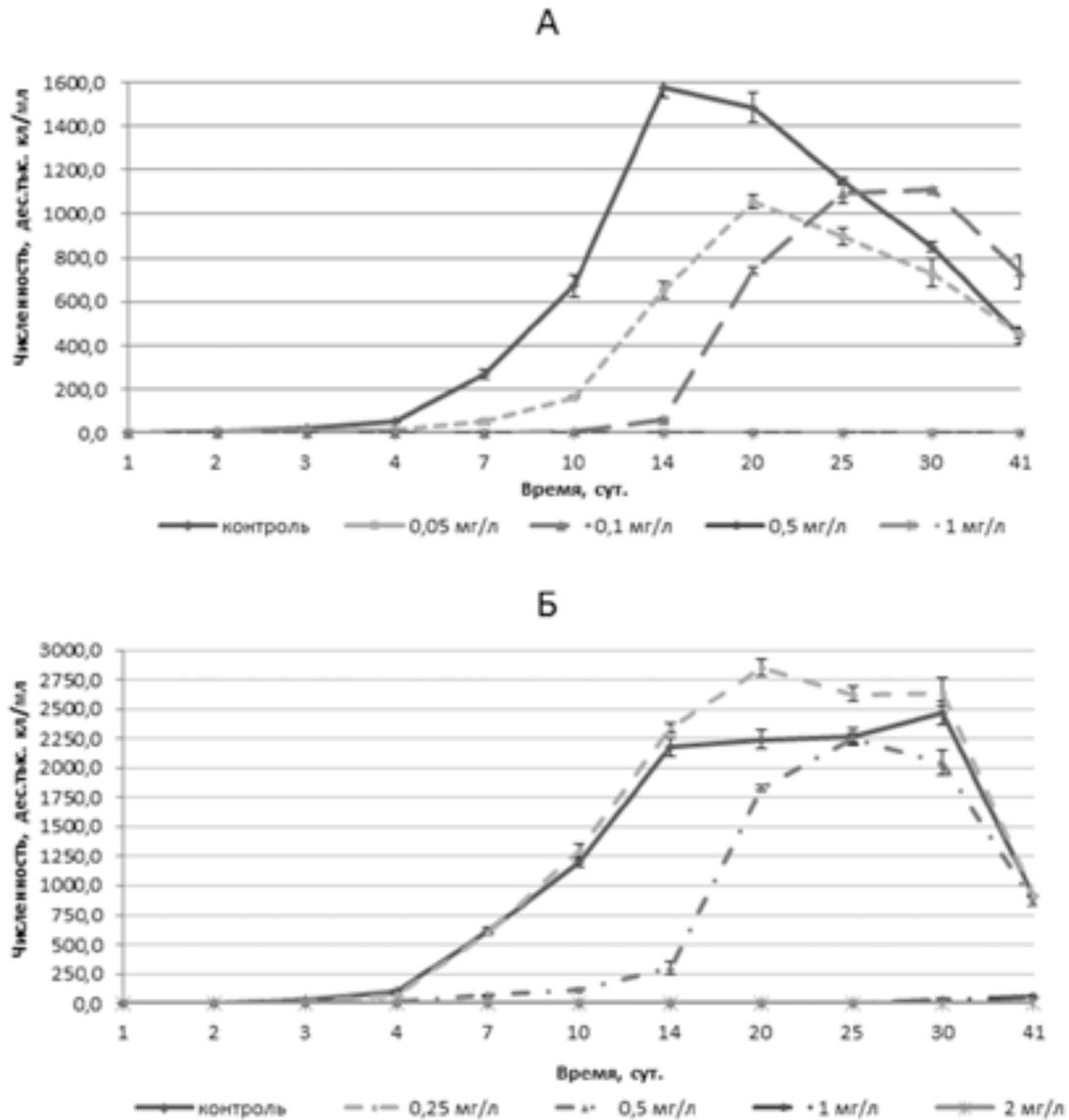


Рис. 1. Влияние нанокompозита Ag/AgCl на культуры *Scenedesmus quadricauda* (А) и *Phaeodactylum tricornutum* (Б) в динамике их развития

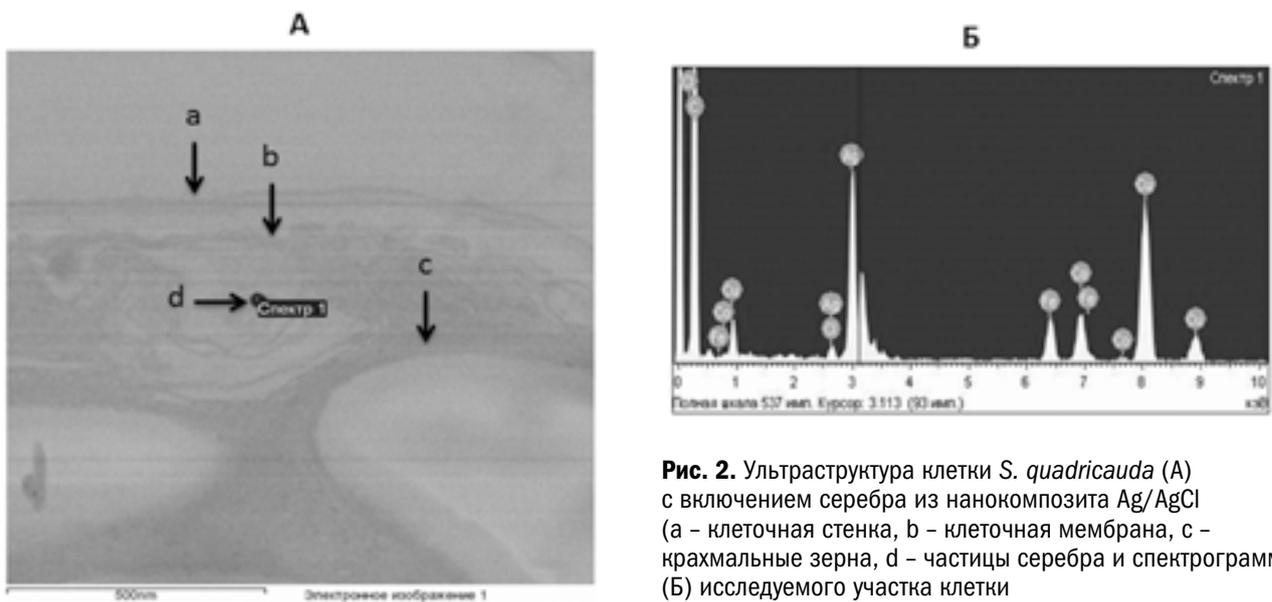


Рис. 2. Ультраструктура клетки *S. quadricauda* (А) с включением серебра из нанокompозита Ag/AgCl (а – клеточная стенка, б – клеточная мембрана, с – крахмальные зерна, д – частицы серебра и спектрограмма (Б) исследуемого участка клетки

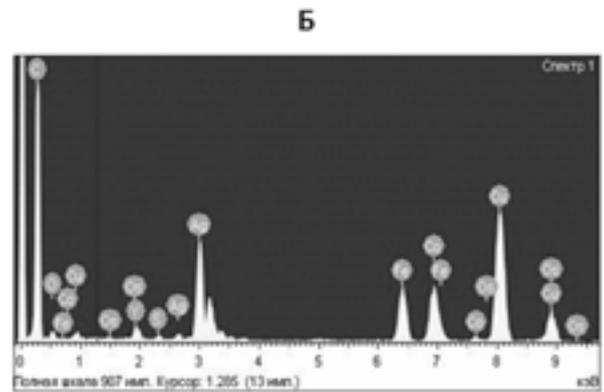
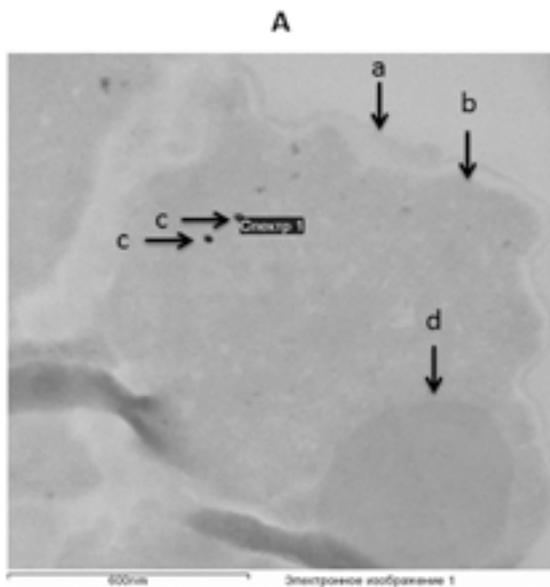


Рис. 3. Ультраструктура клетки *P. tricornutum* (А) с включением серебра из нанокompозита Ag/AgCl (а – клеточная стенка, b – клеточная мембрана, с - частицы серебра, d – жировые включения) и спектрограмма (Б) исследуемого участка клетки

морская диатомея *P. tricornutum* ($LC_{50} = 0,3$ мг/л). При этом, судя по величине LC_{50} за 72 час, нанокompозит более токсичен, чем коллоидное серебро [5] для *S. quadricauda*, а для *P. tricornutum* - наоборот.

Методом аналитической просвечивающей электронной микроскопии после 1 сут экспозиции *S. quadricauda* и *P. tricornutum* в присутствии нанокompозита Ag/AgCl в концентрации 2 мг/л были получены изображения включений серебра в клетках водорослей и подтверждены данными энергодисперсионного рентгеновского детектора.

Анализ изображений, представленных на рисунках 2 и 3, показал, что серебро из нанокompозита Ag/AgCl, добавленного в культуры *S. quadricauda* и *P. tricornutum* на момент постановки опыта, за срок эксперимента (1 сут) проникает

в растительные клетки и накапливается в них.

На рисунке 4 помимо включений серебра из нанокompозита Ag/AgCl в клетке *P. tricornutum* показана контрольная точка на участке без включений серебра и приведена спектрограмма этого контрольного участка клетки.

Методом сканирующей электронной микроскопии и световой микроскопии нами ранее [29] было выявлено воздействие наночастиц коллоидного серебра на наружную мембрану клеток микроводорослей. Коллоидное серебро приводит к изменению структуры клеточной мембраны клеток фитопланктона *S. quadricauda* и *P. tricornutum*, что, возможно, нарушает работу фотосинтетического аппарата, а так же обмен веществом и энергией клеточной мембраны с окружающей средой. Влияние нанокompозита Ag/AgCl на структуры клетки водорослей пока не выяснено.

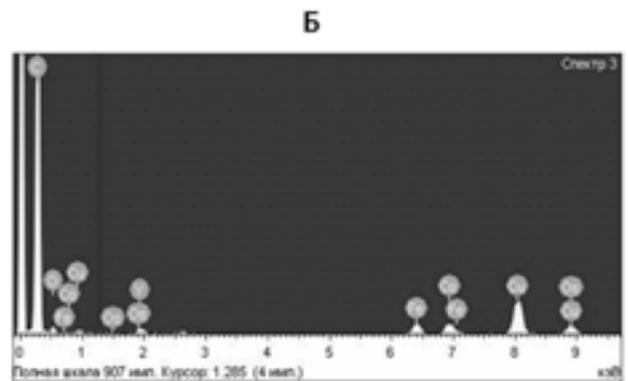
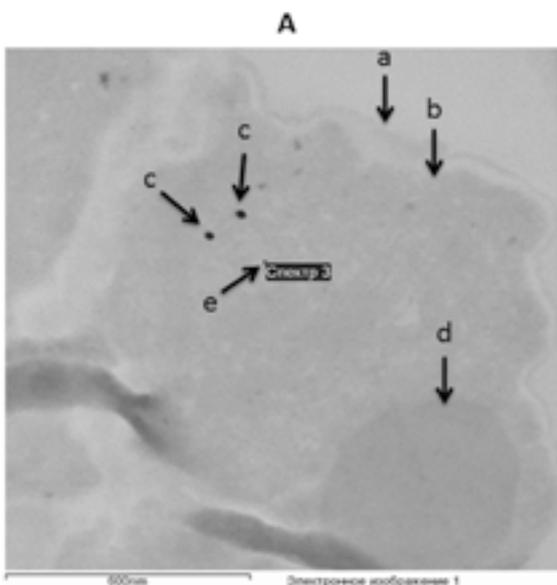


Рис. 4. Ультраструктура клетки *P. tricornutum* (А) с включением серебра из нанокompозита Ag/AgCl (а – клеточная стенка, b – клеточная мембрана, с - частицы серебра, d – жировые включения; e – контрольная точка на участке без включений серебра) и спектрограмма (Б) контрольного участка клетки

Было показано, что наночастицы коллоидного серебра оказывают прямое механическое действие на фильтрационный аппарат рачков *D. magna*, приводя к его слипанию [29]. Наноконкомпозит серебра также приводит к слипанию фильтрационного аппарата и частично проникает в выводящую камеру [5]. Для морских рачков *Artemia salina* показано, что как коллоидное серебро, так и наноконкомпозит Ag/AgCl напрямую попадают в кишечник, что приводит к гибели рачков. У личинок *Brachydanio regii* и молоди *Poecilia reticulata* установлено, что наноконкомпозит Ag/AgCl в первую очередь оказывает влияние на жабры рыб, а также наблюдается активное выделение слизи по всему телу как защитный механизм при воздействии серебра [5].

Приведенные данные литературы и наши экспериментальные данные с культурами двух видов микроводорослей позволяют считать, что

токсическое действие наноконкомпозита Ag/AgCl скорее всего обусловлено ионами серебра, диффундирующими из него в среду, поступающими в дальнейшем в клетки водорослей, где оно и депонируется.

Заключение. По полученным результатам можно заключить, что наносеребро является особо токсичным веществом и нуждается в нормировании для воды водных объектов рыбохозяйственного значения. По данным аналитической электронной микроскопии установлено, что серебро из наноконкомпозита Ag/AgCl уже через сутки попадает в клетки водорослей *S. quadricauda* и *P. tricornutum*, беспрепятственно проходя как через клеточную стенку, так и мембрану клетки. Однако не было обнаружено ни путей поступления наночастиц или ионов серебра в клетку, ни конкретных мест локализации серебра в клетке, где оно накапливалось.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J.H., Park S.J., Lee H.J. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 2007; 3 (1):95-1
- Silver S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 2003; 27 (2-3):341-
- Wise J.P.Sr., Goodale B.C., Wise S.S., Craig G.A., Pongan A.F., Walter R.B. et al. Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. *Aquat. Toxicol.* 2010; 97:34-41.
- Ivask A., Elbadawy A., Kaweeteerawat C., Boren D., Fischer H., Ji Z. et al. Toxicity Mechanisms in *Escherichia coli* Vary for Silver Nanoparticles and Differ from Ionic Silver. *ACS Nano*. 2014; 8:374-86.
- Тригуб А.Г., Соколова С.А. Сравнение чувствительности пресноводных и морских гидробионтов к коллоидному серебру и наноконкомпозиту Ag/AgCl в острых экспериментах. В кн.: Материалы Второй научной школы молодых ученых и специалистов по рыбному хозяйству и экологии «Комплексные исследования водных биологических ресурсов и среды их обитания». М.: ВНИРО; 20
- Маторин Д.Н., Тодоренко Д.А., Ленбаум В.В., Заядан Б.К. Влияние наночастиц серебра на фотосинтез зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. *Вестник КазНУ. Сер. Биол.* 2013; 59 (3/1):274-6.
- Oukarroum A., Bras S., Perreault F., Popovic R. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotox. Environ. Safe.* 2012; 78:80-5.
- Navarro E., Piccapietra F., Wagner B., Marconi F., Kaegi R., Odzak N. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Sci. Technol.* 2008; 42:8959-64.
- Надточено В.А., Радциг М.А., Хмель И.А. Антимикробное действие наночастиц металлов и полупроводников. *Российские нанотехнологии*. 2010; 5 (5-6):37-46.
- Pal S., Tak Y.K., Song J.M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73 (6):1712-20.
- Miao A.J., Schwehr K.A., Xu C., Zhang S.J., Luo Z.P., Quigg A. et al. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. *Environ. Pollut.* 2009; 157 (11):3034-41.
- Miao A.J., Luo Z.P., Chen C.S., Chin W.C., Santschi P.H., Quigg A. Intracellular uptake: A possible mechanism for silver engineered nanoparticle toxicity to a freshwater alga *Ochromonas danica*. *Plos One*. 2010; 5 (12). e151
- Зарубина А.П., Деев Л.И., Пархоменко И.М., Паршина Е.Ю. Оценка токсичности ионов и наночастиц серебра методом биотестирования на модельном бактериальном объекте со светящимся фенотипом. *Российские нанотехнологии*. 2015; 10 (5-6):115-21.
- Piccapietra F., Allué C.G., Sigg L., Behra R. Intracellular silver accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* upon exposure to carbonate coated silver nanoparticles and silver nitrate. *Environmental science & technology*. 2012; (13):7390-7.
- Ipatova V.I., Spirkina N.E., Dmitrieva A.G. Resistance of microalgae to colloidal silver nanoparticles. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2015; 62 (2):253-61.
- Richards R.M.E., Odelola H.A., Anderson B. Effect of silver on whole cells and spheroplasts of a silver resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbios*. 1984; 39 (157-158): 151-7.
- Dibrov P., Dzioba J., Gosink K.K., Hase C.C. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag(+) in *Vibrio cholera*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46 (8):2668-70.
- Holt K.B., Bard A.J. Interaction of silver (I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag+. *Biochemistry*. 2005; 44 (39):13214-23.
- Park H.J., Kim J.Y., Kim J., Lee J.H., Hahn J.S., Gu M.B. et al. Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. *Water Res.* 2009; 43 (4):1027-32.
- Xiong D., Fang T., Yu I., Zhu W. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidativedamage. *Sci. Total Environ.* 2011; 409 (8):1444-52.
- Klaine S.J., Alvarez P.J., Batley G.E., Fernandes T.F., Handy R.D., Lyon D.Y. et al. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2008; 27 (9):1825-51.
- Hu X., Cook S., Wang P., Hwang H.M. In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles. *Science of the Total Environment*. 2009; 407 (8):3070-72.
- Szivák I., Behra R., Sigg L. Metal-induced reactive oxygen species production in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*. 2009; 45 (2):427-35.
- Lima R., Seabra A. B., Durán N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology*. 2012; 32 (11):867-79.
- Тригуб А.Г. Влияние коллоидного наносеребра на пресноводные и морские планктонные организмы. В кн.: Петрова М.Г., ред. Теоретические и прикладные аспекты современной науки. Белгород: ИП Петрова М.Г.; 2015:123.
- Xiong D., Fang T., Yu I., Zhu W. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidativedamage. *Sci. Total Environ.* 2011; 409 (8):1444-52.
- Соколова С.А., ред. Методические указания по разработке нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения. М.: ВНИРО; 2011.
- Schrand A.M., Schlager J.J., Dai L., Hussai S.M. Preparation of cells for assessing ultrastructural localization of nanoparticles with transmission electron microscopy/ Nature protocols. 2010; 5 (4):744-
- Тригуб А.Г., Ипатова В.И. Особенности действия коллоидного наносеребра на организмы фито- и зоопланктона. *Экологические системы и приборы*. 2017; 4:38-49.

REFERENCES:

- Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J.H., Park S.J., Lee H.J. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 2007; 3 (1):95-1
- Silver S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 2003; 27 (2-3):341-
- Wise J.P.Sr., Goodale B.C., Wise S.S., Craig G.A., Pongan A.F., Walter R.B. et al. Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. *Aquat. Toxicol.* 2010; 97:34-41.
- Ivask A., Elbadawy A., Kaweeteerawat C., Boren D., Fischer H., Ji Z. et al. Toxicity Mechanisms in *Escherichia coli* Vary for Silver Nanoparticles and Differ from Ionic Silver. *ACS Nano*. 2014; 8:374-86.
- Тригуб А.Г., Соколова С.А. Comparison of the sensitivity of freshwater and marine hydrobionts to colloidal silver and the Ag/AgCl nanocomposite in acute experiments. In: *Materials of the Second Scientific School of Young Scientists and Specialists on Fisheries and Ecology «Comprehensive Studies of Aquatic Biological Resources and Their Habitats»*. Moscow: VNIRO; 2015 (in Russian).
- Matorin D.N., Todorenco D.A., Lenbaum V.V., Zayadan B.K. Effect of silver nanoparticles on the photosynthesis of green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bulletin of KazNU. Ser. Biol.* 2013; 59 (3/1):274-6 (in Russian).
- Oukarroum A., Bras S., Perreault F., Popovic R. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotox. Environ. Safe.* 2012; 78:80-5.

8. Navarro E., Piccapietra F., Wagner B., Marconi F., Kaegi R., Odzak N. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. Environ. Sci. Technol. 2008; 42:8959–64.
9. Nadtochenko V.A., Radtsig M.A., Khmel' I.A. Antimicrobial action of metal and semiconductor nanoparticles. Russian nanotechnologies. 2010; 5 (5–6):37–46 (in Russian).
10. Pal S., Tak Y.K., Song J.M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 2007; 73 (6):1712–20.
11. Miao A.J., Schwehr K.A., Xu C., Zhang S.J., Luo Z.P., Quigg A. et al. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by copolymeric substances. Environ. Pollut. 2009; 157 (11):3034–41.
12. Miao A.J., Luo Z.P., Chen C.S., Chin W.C., Santschi P.H., Quigg A. Intracellular uptake: A possible mechanism for silver engineered nanoparticle toxicity to a freshwater alga *Ochromonas danica*. Plos One. 2010; 5 (12). e151
13. Zarubina A.P., Deev L.I., Parkhomenko I.M., Parshina E.Yu. Estimation of toxicity of ions and silver nanoparticles by the method of biotesting on a model bacterial object with luminous phenotype. Russian nanotechnologies. 2015; 10 (5–6):115–21 (in Russian).
14. Piccapietra F., Allué C.G., Sigg L., Behra R. Intracellular silver accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii* upon exposure to carbonate coated silver nanoparticles and silver nitrate. Environmental science & technology. 2012; (13):7390–7.
15. Ipatova V.I., Spirikina N.E., Dmitrieva A.G. Resistance of microalgae to colloidal silver nanoparticles. Russian Journal of Plant Physiology. 2015; 62 (2):253–61.
16. Richards R.M.E., Odolola H.A., Anderson B. Effect of silver on whole cells and spheroplasts of a silver resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Microbios. 1984; 39 (157–158): 151–7.
17. Dibrov P., Dzioba J., Gosink K.K., Hase C.C. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag(+) in *Vibrio cholerae*. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46 (8):2668–70.
18. Holt K.B., Bard A.J. Interaction of silver (I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag+. Biochemistry. 2005; 44 (39):13214–23.
19. Park H.J., Kim J.Y., Kim J., Lee J.H., Hahn J.S., Gu M.B. et al. Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. Water Res. 2009; 43 (4):1027–32.
20. Xiong D., Fang T., Yu I., Zhu W. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidativedamage. Sci. Total Environ. 2011; 409 (8):1444–52.
21. Klaine S.J., Alvarez P.J., Batley G.E., Fernandes T.F., Handy R.D., Lyon D.Y. et al. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. Environmental Toxicology and Chemistry. 2008; 27 (9):1825–51.
22. Hu X., Cook S., Wang P., Hwang H.M. In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered metal oxide nanoparticles. Science of the Total Environment. 2009; 407 (8):3070–72.
23. Szivák I., Behra R., Sigg L. Metal-induced reactive oxygen species production in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). Journal of Phycology. 2009; 45 (2):427–35.
24. Lima R., Seabra A. B., Durán N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. Journal of Applied Toxicology. 2012; 32 (11):867–79.
25. Trigub A.G. Influence of a colloid nanosilver on freshwater and marine planktonic organisms. In: Petrova M.G., ed. Theoretical and applied aspects of modern science. Belgorod: IP Petrova M.G.; 2015:123 (in Russian).
26. Xiong D., Fang T., Yu I., Zhu W. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidativedamage. Sci. Total Environ. 2011; 409 (8):1444–52.
27. Sokolova S.A., ed. Methodological guidelines for the development of water quality standards for water bodies of fishery importance, including standards for maximum permissible concentrations of harmful substances in the waters of water bodies of fishery importance. Moscow: VNIRO; 2011 (in Russian).
28. Schrand A.M., Schlager J.J., Dai L., Hussai S.M. Preparation of cells for assessing ultrastructural localization of nanoparticles with transmission electron microscopy/ Nature protocols. 2010; 5 (4):744–
29. Trigub A.G., Ipatova V.I. Features of the action of a colloid nanosilver on organisms of phyto- and zooplankton. Ecological systems and devices. 2017; 4:38–49 (in Russian).

A.G. Trigub¹, V.I. Ipatova²

INFLUENCE OF NANOCOMPOSITE Ag/AgCl ON THE CULTURE OF MICROALGAE SCENEDESMUS QUADRICAUDA AND PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM

¹All-Russian Research Institute of Fishery and Oceanography, 107140, Moscow, Russian Federation

²M.V. Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russian Federation

The toxicity of the Ag/AgCl nanocomposite was evaluated at different concentrations in chronic experiments for 41 days using standard freshwater and marine plant test organisms of *Scenedesmus quadricauda* (0.05, 0.1, 0.5 and 1.0 mg/l) and *Phaeodactylum tricorutum* (0.25, 0.5, 1.0, and 2.0 mg/L). Comparative sensitivity of test organisms in acute experiments (72 hours) in terms of LC₅₀ was carried out. It was established that the green alga of *S. quadricauda* is more sensitive to the Ag/AgCl nanocomposite (LC₅₀ = 0.02 mg/l) than the marine diatomea *P. tricorutum* (LC₅₀ = 0.3 mg/l). The greatest algicidal effect on the growth of *S. quadricauda* culture was provided by the nanocomposite in concentrations of 1 and 0.5 mg/l, at which the culture did not grow during the experiment. And at concentrations of 0.1 and 0.05 mg/l the algostatic effect was observed for 10 and 1 days, respectively, after which the culture resumed growth. In the culture of *P. tricorutum* at concentrations of 1.0 and 2.0 mg/l there was a prolonged inhibition of growth, but after 25 days at 1.0 mg/l the number of cells began to increase. In the presence of 0.5 mg/l the culture resumed growth after 4 days of lag phase and overtook the number of control. At the concentration of 0.25 mg/l the growth of *P. tricorutum* was either at or above the control level. The difference in the response of the two species of algae can be explained both by the individual feature of the species and by the more complex composition of the marine nutrient medium, which reduces the toxicity of the nanocomposite. According to analytical electron microscopy silver from Ag/AgCl nanocomposites within a day falls inside the cells of *S. quadricauda* and *P. tricorutum* algae, passing unimpeded both through the cell wall and the cell membrane.

Keywords: *Scenedesmus quadricauda*, *Phaeodactylum tricorutum*, nanocomposite Ag/AgCl, toxicity.

Материал поступил в редакцию 28.03.2018 г.