

# ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ

УДК 574.583:595.3

## ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ИЗОФОРМ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ТИТАНА НА ПЛАНКТОННЫХ РАКООБРАЗНЫХ *CERIODAPHNIA AFFINIS LILLJEBORG*

В.А. Гремячих,  
И.И. Томилина

ИБВВ РАН, Федеральное  
государственное бюджетное  
учреждение Институт биологии  
внутренних вод им. И.Д.Папанина  
РАН, 152742 пос. Борок,  
Ярославская обл., Некоузский р-н,  
Российская Федерация

**И**зучено влияние различных концентраций водных суспензий наночастиц  $TiO_2$  (в изоформах анатаза и рутила) на выживаемость и плодовитость ветвистоусого рачка *Ceriodaphnia affinis*. В 400 и 100 мг/л анатаза за 7 суток отмечено статистически значимое снижение выживаемости рачков. Средняя продолжительность жизни животных достоверно отличалась от контрольных значений в суспензиях рутила 2 и 0,2 мг/л, анатаза – во всех исследованных концентрациях. Значение показателя снижалось с увеличением концентрации вещества ( $r = -0,21$ ;  $p < 0,02$ ). Изоформы диоксида титана оказывали негативное влияние на репродуктивную функцию цериодафний. Зарегистрировано достоверное снижение суммарной плодовитости рачков за жизненный цикл для анатаза в концентрациях 0,2 и 0,02 мг/л и рутила – 0,2 мг/л. Анатаз в равных с рутилом концентрациях оказывал на цериодафний более выраженное токсическое действие, что, связано с меньшими размерами его частиц.

**Ключевые слова:** диоксид титана, наночастицы, токсичность, цериодафнии.

**Введение.** Среди известных на сегодняшний день наноматериалов наиболее широко производятся и используются наночастицы (НЧ) диоксида титана. Только в США четыре крупные компании вырабатывают в год более 100 000 тонн НЧ  $TiO_2$ , к 2025 году их производство прогнозируется довести до 2,5 млн. тонн [1]. НЧ  $TiO_2$  применяются в различных отраслях промышленности и в медицине. 57 % используется в строительстве в составе лакокрасочной продукции, цемента, облицовочных плиток, 26 % — в производстве пластмасс, 13 % — бумаги, 4 % — в электронике, косметике (солнцезащитный крем, зубная паста и др.), пищевой промышленности

(пищевые добавки), а также в производстве керамики, типографской краски, зеркал и т.д. [2].

Диоксид титана существует в виде нескольких модификаций. В природе чаще встречаются кристаллы диоксида титана с тетрагональной сингонией (анатаз, рутил), реже - с ромбической сингонией (брукит). НЧ  $TiO_2$  производятся в изоформах нанорутила и наноанатаза в виде кристаллов, наносфер или лент [3].

Очевидная неполнота и противоречивость информации об особенностях поведения наноматериалов в сочетании с реальными перспективами резкого увеличения их содержания в среде обитания человека и других биологических объек-

**Гремячих Вера Алексеевна (Gremyachikh Vera Alekseevna)**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии и токсикологии водных животных, Федеральное бюджетное учреждение Институт биологии внутренних вод им. И.Д.Папанина РАН, 152742, пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, Российская Федерация, grva@ibiw.yaroslavl.ru

**Томилина Ирина Ивановна (Tomilina Irina Ivanovna)**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии и токсикологии водных животных, Федеральное бюджетное учреждение Институт биологии внутренних вод им. И.Д.Папанина РАН, 152742, пос. Борок, Ярославская обл., Некоузский р-н, Российская Федерация, tomil@ibiw.yaroslavl.ru

тов выдвигает на первый план проблемы биобезопасности нанотехнологий и наноматериалов [4]. Роль живых организмов в их распространении в окружающей среде практически не исследована [5]. Гидробионты (особенно беспозвоночные) могут влиять на перемещение наноматериалов в пределах и за пределами водоемов. Одним из условий получения адекватной оценки безопасности техногенных наночастиц является использование традиционных тест-организмов, включенных в стандартные программы биотестирования многих стран, в том числе и России.

*Цель работы* – оценить изменения биологических параметров (выживаемости, плодовитости и интенсивности размножения) *Ceriodaphnia affinis* L. при действии разных изоформ наночастиц диоксида титана.

**Материалы и методы исследования.** Суспензии  $TiO_2$  готовили методом диспергирования навески порошка в отстоянной артезианской воде на ультразвуковом диспергаторе УЗДН-2Т в режиме 0,5 А, 44 кГц. Концентрации исследуемых частиц от 400 до 0,002 мг/л получали путем последовательного разведения маточной суспензии (400 мг/л) непосредственно перед опытом на отстоянной артезианской воде. Наночастицы диоксида титана были представлены в виде двух изоформ: анатаза, размером до 50 нм и форме, близкой к сферической; и рутила, имеющего форму палочек или стержней диаметром около 10 и длиной до 100 нм.

В качестве тест-объекта использовали ветвистоусого рачка *Ceriodaphnia affinis* Lillijeborg, 1862 (Cladocera, Crustacea). Токсичность соединений титана исследовали по стандартной методике [6]. В первые сутки от рождения рачков помещали по одному в стаканчики с 15 мл тестируемого раствора или суспензии и наблюдали либо в течение 7 суток (0,002 – 400 мг/л), либо на протяжении всего жизненного цикла (0,002 – 2 мг/л). Ежедневно регистрировали количество живых организмов, число пометов и молоди у каждой самки. Исследовали выживаемость, продолжительность жизненного цикла и индивидуальную плодовитость животных.

Результаты обрабатывали статистически, используя метод однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и процедуру LSD-теста при уровне значимости  $p=0,05$  [7]. Статистический анализ результатов проводили с помощью пакета программ STATGRAPHICS Plus 2.1.

**Результаты и обсуждение.** Во всём исследованном диапазоне концентраций суспензий наночастиц диоксида титана, за исключением анатаза в концентрации 400 мг/л, за 48 часов экспозиции зарегистрирована 90-100 % выживаемость цериодафний (табл. 1). Достоверное снижение выживаемости рачков за 7 суток экспозиции отмече-

но в суспензии анатаза в концентрациях 400 и 100 мг/л. Плодовитость рачков за указанный период, как по среднему количеству пометов на 1 самку, так и по количеству молоди на 1 самку во всех концентрациях была ниже контрольных значений. Анатаз в диапазоне концентраций 400 – 100 мг/л подавлял плодовитость цериодафний на 80-90%. Снижение плодовитости рачков за указанный период экспозиции достоверно зависело от концентрации вещества (для рутила  $r = -0,48$ ;  $p = 0,00$ ; для анатаза  $r = -0,51$ ;  $p = 0,00$ ).

Влияние низких концентраций наночастиц диоксида титана (2-0,002 мг/л) на цериодафний исследовали в опытах, охватывающих весь их жизненный цикл. Выживаемость рачков в первую и вторую недели эксперимента во всех опытных вариантах не отличалась от контрольных значений (табл. 2) К концу 3-й и 4-й недели отмечена тенденция к снижению выживаемости цериодафний, для анатаза в концентрации 0,2 мг/л - достоверная. Средняя продолжительность жизни животных достоверно отличалась от контрольных значений в суспензиях всех исследованных веществ и концентраций, за исключением рутила в концентрации 0,002 мг/л. Значение показателя в суспензии рутила не зависело от концентрации НЧ ( $r = -0,1$ ;  $p = 0,34$ ), а в растворах анатаза – статистически значимо уменьшалось с её увеличением ( $r = -0,21$ ;  $p = 0,02$ ) (табл. 2).

Во всех группах исследованных веществ отмечена тенденция к снижению средней суммарной плодовитости животных и интенсивности их размножения, достоверная – для анатаза в концентрациях 0,2, 0,002 и рутила – 0,2 мг/л (рис.). При экспонировании цериодафний в суспензиях анатаза установлены статистически значимые отрицательные концентрационные зависимости для показателей суммарной плодовитости ( $r = -0,29$  при  $p=0,004$ ) и интенсивности размножения животных ( $r = -0,23$  при  $p=0,02$ ). НЧ вещества в наименьшей из исследованных концентраций (0,002 мг/л) максимально (на 50%) подавляли плодовитость рачков, особенно во второй половине эксперимента (рис.). В суспензии анатаза с концентрацией 0,2 мг/л эта тенденция сохранялась. В суспензиях рутила кривые, характеризующие увеличение количества отрождённой молоди по неделям, фактически от контрольной не отличались.

Токсическое действие наночастиц связано с их способностью проникать в неизменном виде через клеточные барьеры, длительное время циркулировать и накапливаться в органах и тканях, вызывать в них патоморфологические нарушения и медленно выводиться из организма [8]. В водные организмы помимо желудочно-кишечного тракта НЧ могут поступать через наружные покровы и жабры, попадать в их икру и личинки,

Таблица 1

**Влияние изоформ диоксида титана на выживаемость и репродуктивные показатели цериодафний за 7 суток эксперимента**

Вещество	Концентрация, мг/л	Выживаемость, %		Среднее количество молоди за 7 суток, экз, % от контроля
		48 ч	7 сут	
анатаз	400	75±15	60±10*	8,7 ± 2,6*
	200	90±10	90±10	17,4 ± 3,1*
	100	90±10	60±10*	11,6 ± 2,9*
	50	100±0	90±10	22,7 ± 2,5*
	20	100±0	100±0	34,6 ± 4,6*
	2	100±0	95±5	23,0 ± 3,8*
	0,2	100±0	85±5	27,4 ± 3,6*
	0,02	100±0	85±5	39,8 ± 7,1*
	0,002	100±0	90±10	61,0 ± 8,3
рутил	400	90±10	80±10	29,7 ± 4,7*
	200	90±10	90±10	41,3 ± 5,9*
	100	100±0	85±5	47,4 ± 6,1*
	50	100±0	90±10	45,6 ± 3,4*
	20	100±0	100±0	57,0 ± 4,3*
	2	100±0	95±5	46,2 ± 6,2*
	0,2	100±0	95±5	37,6 ± 3,1*
	0,02	100±0	100±0	72,6 ± 7,0
	0,002	100±0	100±0	64,6 ± 7,9
контроль		100±0	95±5	100 ± 7,0

Примечание: В табл. 1 и 2 даны средние значения и их ошибки (x±SE)

\* Достоверные различия при уровне значимости p=0,05

Таблица 2

**Влияние изоформ диоксида титана на выживаемость и продолжительность жизненного цикла рачков при хроническом воздействии**

Вещество	Концентрация, мг/л	Выживаемость к концу недели, %				Средняя продолжительность жизненного цикла, сут
		1-ая неделя	2-ая	3-я	4-я	
анатаз	2	95±5	80 ± 5	75±10	55±10	27,7 ± 2,7*
	0,2	95±5	70 ± 10	50±10*	50±10*	25,4 ± 3,0*
	0,02	85±5	85±5	80±10	75± 10	30,7 ± 3,3*
	0,002	90±10	85 ± 5	60±15	55±10	27,8 ± 2,4*
рутил	2	95±5	85 ± 10	70 ± 15	50±15	24,2 ± 2,3*
	0,2	95±5	85 ± 10	65±10	45±10	25,7 ± 2,3*
	0,02	100±0	70 ± 0	65±5	60±10	30,7 ± 3,3*
	0,002	100±0	100±0	95±5	90±10	31,3 ± 2,5
контроль		95±5	95±5	95±5	85±10	35,3 ± 2,5

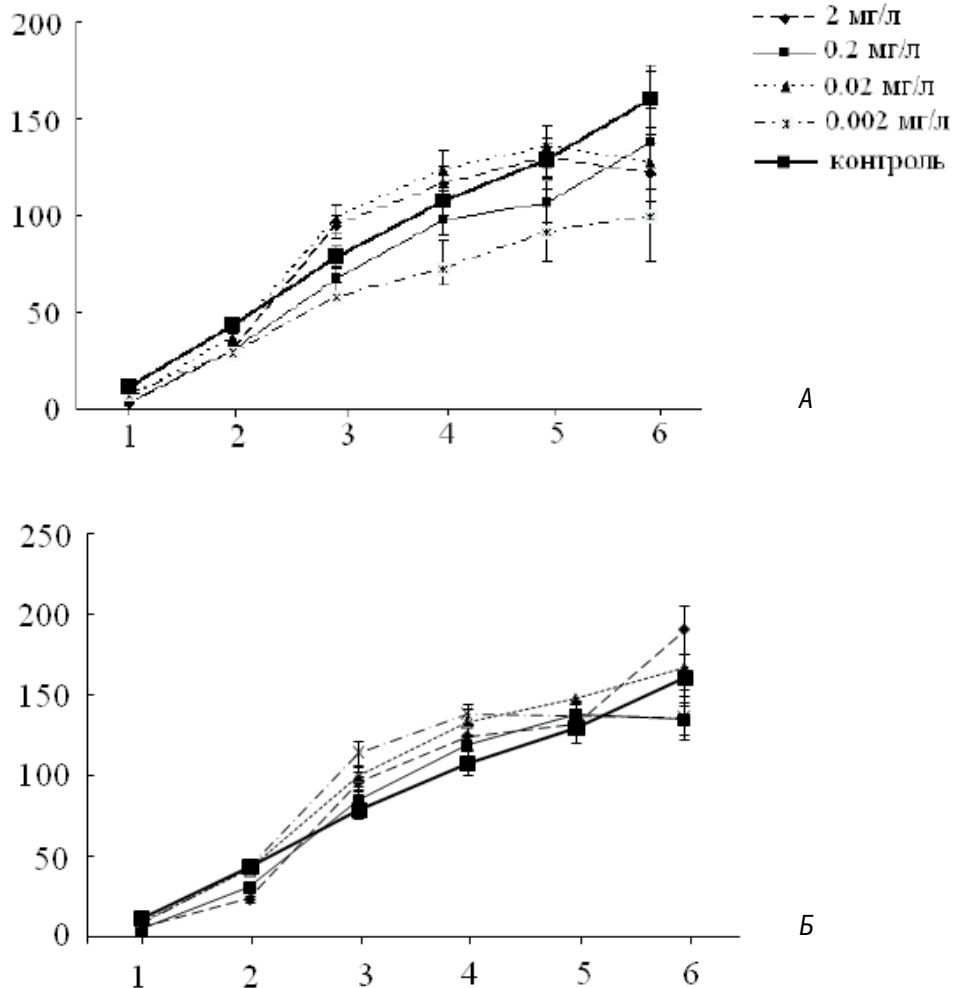
Примечание: \* Достоверные различия при уровне значимости p=0,05

а также становятся более доступными для многочисленных представителей более низких трофических сетей – простейших одноклеточных организмов [9].

Несмотря на то, что многие исследованные наноматериалы не обладают острой токсичностью, их хроническое действие до настоящего времени изучено недостаточно. В нашем исследовании отмечены достоверные отличия средней продолжительности жизни цериодафний от контрольных значений в суспензиях рутила с концентрацией 2 и 0,2 и анатаза – во всех исследованных концентрациях. В растворах анатаза значение показателя статистически значимо снижалось с увеличением концентрации вещества. Наночастицы в большей степени влияют на воспроизводство водных беспозвоночных, угнетая или стимулируя их плодовитость, замедляя рост, вызывают неспецифические поведенческие и морфофункциональные нарушения, снижая тем самым жизнеспособность организмов [10,11]. Репродуктивные показатели цериодафний оказались чувствитель-

нее показателя выживаемости: суммарная плодовитость рачков за жизненный цикл снижалась при экспонировании в концентрациях анатаза 0,2 и 0,02 мг/л, рутила – 0,2 мг/л. Причем, анатаз в самой меньшей концентрации подавлял плодовитость в большей степени. Для этой же концентрации интенсивность размножения достоверно была ниже контрольных значений. Таким образом, анатаз в равных концентрациях с рутилом оказывал более выраженное токсическое действие на выживаемость и плодовитость рачков, что связано с меньшими размерами его частиц.

**Заключение.** Острая токсичность суспензий наночастиц диоксида титана различной полиморфной модификации для цериодафний в исследованном диапазоне концентраций не зарегистрирована. Достоверное снижение выживаемости рачков за 7 суток отмечено в концентрациях 400 и 100 мг/л анатаза. Средняя продолжительность их жизни достоверно отличалась от контрольных значений в суспензиях рутила с концентрацией 2 и 0,2, анатаза



**Рис.** Накопленная плодовитость *Ceriodaphnia affinis* при экспонировании в суспензии наночастиц диоксида титана (а – анатаз, б – рутил), по оси абсцисс – недели эксперимента, по оси ординат – количество молоди, экз

– во всех исследованных концентрациях. Значение показателя статистически значимо снижалось с увеличением концентрации вещества ( $r = -0,21$ ;  $p < 0,02$ ). Изоформы диоксида титана оказывали негативное влияние на репродуктивную функцию цериодафний. Зарегистрировано достоверное снижение суммарной плодовитости рачков за жизненный цикл для анатаза в концентрациях 0,2 и 0,02 мг/л и рутила – 0,2 мг/л. В

суспензиях анатаза установлена статистически значимая отрицательная концентрационная зависимость для показателей суммарной плодовитости ( $r = -0,29$  при  $p=0,004$ ) и интенсивности размножения рачков ( $r = -0,23$  при  $p=0,02$ ). Анатаз в равных с рутилом концентрациях оказывал на цериодафний более выраженное токсическое действие, что, вероятно, связано с меньшими размерами его частиц.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Robichaud K.O., Uyar A.E., Darby M.R. Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO<sub>2</sub> production as a basis for exposure assessment // Environ. Sci. Technol. 2009; 43 (12): 4227-4233.  
 2. Гмошинский И.В., Смирнова В.В., Хотимченко С.А. Современное состояние проблемы оценки безопасности наноматериалов // Российские нанотехнологии. 2010; 5 (9-10): 5-20.  
 3. Hamilton R.F., Wu N., Porter D. Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity // Particle and Fibre Toxicology. 2009; 6 (35): 1-11.

4. Моргалёв Ю.Н., Хоч Н.С., Моргалёва Т.Г., Гулик Е.С., Борило Г.А. и др. Биотестирование наноматериалов: о возможности транслокации наночастиц в пищевые сети // Российские нанотехнологии. 2010; 5 (11-12): 98-102.  
 5. Крысанов Е.Ю., Павлов Д.С., Демидова Т.Б., Дгебуадзе Ю.Ю. Наночастицы в живой природе: что нам об этом известно? // Российские нанотехнологии. 2009; 4 (7- 8): 26-27.  
 6. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости

цериодафний. Федеральный реестр (ФР). ФР.1.39.2007.032М., «АКВАРОС». 2007; 56 с.  
 7. Sokal R. R., Rohlf F. J. Biometry. The principals and practice of statistics in biological research. NY.W.H. Freeman and Co. 1995; 887 p.  
 8. Baun A., Hartmann N.B., Grieger K., Kusk K.O. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing // Ecotoxicology. 2008; 17: 387-395.  
 9. Крысанов Е.Ю., Павлов Д.С., Демидова Т.Б., Дгебуадзе Ю.Ю. Наноча-

стицы в окружающей среде и их влияние на гидробионтов // Известия РАН. Серия Биологическая. 2010; 4: 1-8.  
 10. Hall S., Bradley T., Moore J. Acute and chronic toxicity of nano-scale TiO<sub>2</sub> particles to freshwater fish, cladocerans, and green algae, and effects of organic and inorganic substrate on TiO<sub>2</sub> toxicity // // Nanotoxicology. 2009; 3 (2): 91-97.  
 11. Zhu X., Zhu L., Chen Y., Tian S. Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to Daphnia magna // Journal of Nanoparticle Research.. 2008; 11: 67 - 75.

## REFERENCES:

1. Robichaud K.O., Uyar A.E., Darby M.R. Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO<sub>2</sub> production as a basis for exposure assessment // Environ. Sci. Technol. 2009; 43 (12): 4227-4233.  
 2. Gmshinskij I.V., Smirnova V.V., Khotimchenko S.A. State of the problem of safety evaluation of nanomaterials // Rossijskie nanotekhnologii. 2010; 5 (9-10): 5-20 (in Russian).  
 3. Hamilton R.F., Wu N., Porter D. Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity // Particle and Fibre Toxicology. 2009; 6 (35): 1-11.

4. Morgalyov Yu.N., Khoch N.S., Morgalyova T.G., Gulik E.S., Borilo G.A. et al. Biotesting of nanomaterials: opportunities translocation of nanoparticles in food network // Rossijskie nanotekhnologii. 2010; 5 (11-12): 98-102 (in Russian).  
 5. Krysanov E.Yu., Pavlov D.S., Demidova T.B., Dgebuadze Yu.Yu. Nanoparticles in nature: what we know about this? // Rossijskie nanotekhnologii. 2009; 4 (7-8): 26-27 (in Russian).  
 6. Test method for measuring the toxicity of water and aqueous extracts of soil, sewage sludge, waste on mortality and

fertility change ceriodaphnia. Federal'nyj reestr (FR). FR.1.39.2007.032M., «AKVAROS». 2007; 56 s (in Russian).  
 7. Sokal R. R., Rohlf F. J. Biometry. The principals and practice of statistics in biological research. NY.W.H. Freeman and Co. 1995; 887 p.  
 8. Baun A., Hartmann N.B., Grieger K., Kusk K.O. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing // Ecotoxicology. 2008; 17: 387-395.  
 9. Krysanov E.Yu., Pavlov D.S., Demidova T.B., Dgebuadze Yu.Yu. Nanoparticles

in the environment and their impact on hydrobionts // Izvestiya RAN. Seriya Biologicheskaya. 2010; 4: 1-8 (in Russian).  
 10. Hall S., Bradley T., Moore J. Acute and chronic toxicity of nano-scale TiO<sub>2</sub> particles to freshwater fish, cladocerans, and green algae, and effects of organic and inorganic substrate on TiO<sub>2</sub> toxicity // // Nanotoxicology. 2009; 3 (2): 91-97.  
 11. Zhu X., Zhu L., Chen Y., Tian S. Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to Daphnia magna // Journal of Nanoparticle Research.. 2008; 11: 67 - 75.

V.A. Gremyachikh, I.I. Tomilina

## THE STUDY OF BIOLOGICAL EFFECTS OF TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES ISOFORMS ON PLANKTONIC CRUSTACEANS *CERIODAPHNIA AFFINIS* LILLJEBORG

I.D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Russian Academy of Sciences, 152742 Borok, Yaroslavl region, Russian Federation

The influence of different concentrations of TiO<sub>2</sub> nano-particles water suspensions (anatase and rutile isoforms) on survival and fertility of cladocerans *Ceriodaphnia affinis* was investigated. A statistically significant decrease of crustaceans survival in 400 mg/l and 100 mg/l anatase water suspensions over 7 days was observed. Median life span of animals authentically differed from control values in rutile 2,00 mg/l and 0,2 mg/l suspensions and anatase in all studied concentrations. The indicator value decreased with an increasing substance concentration ( $r=-0,21$ ;  $p < 0,02$ ). TiO<sub>2</sub> isoforms produced negative effect on the *Ceriodaphnia* reproduction function. An authentic reduction of crustaceans total fertility over life span was recorded for anatase in concentrations of 0,2 mg/l and 0,02 mg/l and rutile in concentration of 0,2 mg/l. Anatase having equal concentrations with rutile posed a more expressed toxic effect on *Ceriodaphnia* which is linked to its lesser particles size.

**Keywords:** titanium dioxide, nanoparticles, toxicity, ceriodaphnia.

Материал поступил в редакцию 04.09.2013 г.