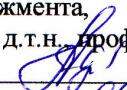


Министерство образования и науки Российской Федерации
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)

Институт биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства
Кафедра экологического менеджмента

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГЭК

Руководитель ООП,
зав. каф. экологического
менеджмента,
к.б.н., д.т.н., профессор
 А. М. Адам
« 07 » 06 2016 г.

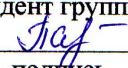
БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

**ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ТИТАНА, ЦИНКА И ПЛАТИНЫ НА ПОЧВЕННЫЕ
МИКРООРГАНИЗМЫ**

по основной образовательной программе подготовки бакалавров
направление подготовки
05.03.06 – Экология и природопользование.

Падалко Елизавета Пезтеровна

Руководитель ВКР
к.б.н.
 И.В.Луцаева
подпись
« 07 » 06 2016 г.

Автор работы
студент группы №
 Е.П.Падалко
подпись

Министерство образования и науки Российской Федерации

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)

Институт биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства
Кафедра экологического менеджмента

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГЭК

Руководитель ООП,
зав. каф. экологического
менеджмента,
к.б.н., д.т.н., профессор
_____ А. М. Адам
« ____ » _____ 2016 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

**ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ТИТАНА, ЦИНКА И ПЛАТИНЫ НА ПОЧВЕННЫЕ
МИКРООРГАНИЗМЫ**

по основной образовательной программе подготовки бакалавров
направление подготовки
05.03.06 – Экология и природопользование

Падалко Елизавета Пеэтеровна

Руководитель ВКР
к.б.н.

_____ И.В.Лушаева
подпись

« ____ » _____ 2016 г.

Автор работы
студент группы № _____
_____ Е.П.Падалко
подпись

Министерство образования и науки Российской Федерации
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)
Институт биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства
Кафедра экологического менеджмента

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель ООП,
зав. кафедрой экологического
менеджмента
К.б.н., д.т.н., профессор
_____ А.М.Адам
«_____» _____ 20____ г.

ЗАДАНИЕ

по подготовке выпускной квалификационной работы бакалавра

студенту Падалко Елизавете Пеэтеровне _____ группы 01207
фамилия, имя, отчество

1. Тема выпускной работы _____ Влияние наночастиц титана, цинка и платины на почвенные микроорганизмы

2. Срок сдачи студентом выполненной выпускной работы:

- а) на кафедре _____
б) в ГЭК _____

3. Исходные данные к работе Цель исследования: изучение влияния наночастиц (TiO₂, ZnO, Pt) на почвенные микроорганизмы и биологическую активность почв. Задачи: собрать и проанализировать сведения о воздействии наночастиц на живые организмы и природные сообщества; провести опыт по оценке чувствительности Pseudomonas fluorescens и Trichoderma koningii к присутствию в среде наночастиц TiO₂; провести опыт по влиянию наночастиц ZnO и Pt на биологическую активность почв; обобщить результаты и сделать выводы.

цели и задачи исследования,

Объект исследования - наночастицы TiO₂, ZnO, Pt. Предмет исследования – почвенные микроорганизмы Pseudomonas fluorescens и Trichoderma koningii, влияние наночастиц на биологическую активность почв.

объекты и методы исследования,

Проведение работ по определению степени токсичности наночастиц и интерпретация результатов соответствуют методике определения токсичности почв по отношению к микроорганизмам.

методы оценки достоверности результатов

описанной в «Методах микробиологического контроля почвы. Методические рекомендации. 24 декабря 2004 г. ФЦ/4022». Проведение работ по определению влияния почвы, обработанной раствором наноматериалов, на интегральные показатели биологической активности почв соответствуют методике определения токсичности почв по биологической активности почв, описанной в «Почва, очистка населенных мест, бытовые и промышленные отходы, санитарная охрана почвы. Гигиеническая оценка качества почвы населенных мест. Методические указания МУ 2.1.7.730-99» и в «Методических указаниях по гигиеническому обоснованию ПДК химических веществ в почве» от 05.08.82 N 2609-82».

4. Краткое содержание работы Планируемые работы:

дать перечень основных разделов, сроки их выполнения и ожидаемые результаты

1. Собрать и проанализировать сведения о воздействии наночастиц на живые организмы и природные сообщества. Сроки выполнения: 06.2014 – 09.2014. В результате должен быть собран обзор литературы по данной тематике.

2. Провести опыт по оценке чувствительности *Pseudomonas fluorescens* и *Trichoderma koningii* к присутствию в среде наночастиц TiO_2 . Сроки выполнения: 06.2014– 07.2014. Ожидается определение степени чувствительности тест-организмов к наночастицам.

3. Провести опыт по влиянию наночастиц ZnO и Pt на биологическую активность почв. Сроки выполнения: 07.2014 – 02.2015. В результате должно быть проведено 2 серии опытов – в полевых и модельных условиях по влиянию наночастиц оксида цинка и платины на почвенные микроорганизмы.

4. Обобщить результаты и сделать выводы. Сроки выполнения: 02.2016-05.2016

5. Указать предприятие, организацию по заданию которого выполняется работа_

ТГУ, Государственное задание на выполнение проекта № 37.901.2014

6. Перечень графического материала (с точным указанием обязательных иллюстраций) 3 рисунка

7. Дата выдачи задания «____» _____ 20__ г.

Руководитель выпускной работы

к.б.н., ст.науч.сотр.ТГУ

И.В. Луцаева

должность, место работы

подпись

инициалы, фамилия

Задание принял к исполнению _____

дата, подпись студента

АННОТАЦИЯ

Тема дипломной работы – изучение влияния наночастиц на почвенные микроорганизмы и биологическую активность почв.

Структура исследования обусловлена целью и задачами, поставленными и реализованными в процессе исследования. Работа состоит из введения, трёх глав, заключения, списка использованных источников. Во введении обоснованы выбор темы, актуальность, сформулированы цель и задачи. Актуальность данной работы обусловлена постоянно расширяющимся применением нанотехнологий при недостаточно полных сведениях о биологических рисках применения наночастиц.

Были собраны и проанализированы имеющиеся данные о влиянии различных наночастиц на живые микроорганизмы и природные сообщества. Описаны методики проведения собственных опытов по оценке влияния наночастиц TiO_2 , ZnO , Pt на почвенные микроорганизмы (*Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma koningii*) и биологическую активность почв. В работе рассмотрены результаты проведенных опытов и сделаны соответствующие выводы.

SUMMARY

The diploma thesis focuses on the study of the influence of nanoparticles on soil microorganisms and soil biological activity.

The structure of the work is determined by the purpose and the objectives formulated and achieved in the research process. The work consists of Introduction, Three Chapters, Conclusion and List of References. The Introduction explains the choice and the relevance of the research topic, as well as the purpose and the objectives of the thesis. The relevance of the work is linked to the rapidly expanding use of nanotechnology in the absence of complete information about the biological risks of nanoparticles applications.

We have collected and analyzed the available data on the effects of different nanoparticles on living organisms and natural communities. The thesis describes the techniques of conducting our own experiments to assess the effect of TiO_2 , ZnO and Pt nanoparticles on the soil microorganisms (*Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma koningii*) and soil biological activity, analyzes the results of the experiments, and presents the corresponding conclusions.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
1. ТОКСИЧНОСТЬ НАНОМАТЕРИАЛОВ.....	9
1.1. Влияние наночастиц TiO ₂ на микроорганизмы.....	13
1.2. Влияние наночастиц ZnO на микроорганизмы.....	17
1.3. Влияние наночастиц Pt на микроорганизмы.....	24
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	27
2.1. Опыт по оценке чувствительности <i>Pseudomonas fluorescens</i> и <i>Trichoderma koningii</i> к присутствию в среде наночастиц TiO ₂	27
2.2. Опыт по влиянию наночастиц ZnO и Pt на биологическую активность почв.....	29
3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	35
3.1. Оценка чувствительности <i>Pseudomonas fluorescens</i> и <i>Trichoderma koningii</i> к присутствию в среде наночастиц TiO ₂	35
3.2. Изучение влияния наночастиц ZnO на биологическую активность почв.....	38
3.3. Изучение влияния наночастиц Pt на биологическую активность почв.....	45
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	54
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	56

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время все возрастающее внимание во всем мире уделяется перспективам развития технологий направленного получения и использования материалов в диапазоне размеров до 100 нм. Уникальные свойства наноматериалов и их биологическая активность могут быть использованы в микроэлектронике, энергетике, строительстве, химической, фармацевтической, парфюмерно-косметической и пищевой промышленности и др. Однако до сих пор не проведена полноценная оценка биологических рисков применения наночастиц. За рубежом проблема безопасности наноматериалов в настоящее время выдвигается на первый план. Такие исследования проводятся в США, Евросоюзе, а также в ряде других международных организаций. Необходимо учитывать, что при переводе исходного вещества в наносостояние происходит коренное изменение его свойств. В литературе неоднократно отмечалось, что неблагоприятное воздействие наночастиц нельзя с надежностью предсказать или установить, исходя из известных токсических свойств более крупных частиц того же самого химического вещества.

В развитии современных нанотехнологий значительную роль играют исследования наночастиц металлов. Это обусловлено, прежде всего, широким спектром возможностей их практического применения, в которых используются специфические свойства как самих наночастиц, так и модифицированных ими материалов. Перспективно использование наночастиц в экологическом аспекте. Наночастицы оксидов титана могут разлагать не только сложные органические соединения, но и опасные для человека монооксида азота и углерода, содержащиеся в автомобильных выхлопах. Поэтому пудру из этих наночастиц стали добавлять в топливо, чтобы снизить содержание этих вредных примесей в выхлопных газах.

Учеными ведутся исследования по очистке экосред от загрязнений при помощи наноструктурированных ингредиентов. Японские авторы разработали новый материал, который включает в себя пористый оксид марганца с частицами золота, выращенными в нем. Созданное вещество эффективно удаляет летучие органические соединения, а также оксиды серы и азота из воздуха при комнатной температуре. С применением нанофильтрации ведется обработка поверхностных вод. Существуют действующие установки в США, Голландии и Франции.

Широкое распространение получили композиционные материалы из наночастиц в медицине и фармацевтике, в которых наночастицы ориентированы на доставку лекарств и протеинов к клеткам органов, а также на создание искусственных мускулов и костей.

Американскими учеными с помощью нанотехнологий удалось создать пломбирующий материал, который является более прочным, чем любые ранее известные лечебные наполнители, и при этом более эффективно предотвращает повторное заражение зуба.

В то же время, за последнее десятилетие установлено, что наночастицы различных видов, особенно наночастицы металлов, попадая в организм человека, могут стать причиной серьезных заболеваний (нанопатологий). Известно, что наночастицы металлов могут проникать в организм человека различными путями: через слизистые оболочки дыхательных путей и пищеварительного тракта, трансдермально (например, при использовании косметических средств), через кровоток в составе вакцин и сывороток и т. д.

Таким образом, можно утверждать, что определение путей и способов воздействия наночастиц металлов на живой организм - это чрезвычайно важная и актуальная работа, необходимая для установления научно обоснованных допустимых диапазонов концентраций и размеров наночастиц в воде, воздухе или в составе различных материалов, с которыми контактирует человек.

Чтобы лучше понимать какое воздействие оказывают наночастицы титана на окружающую среду, целесообразно проводить опыты влияния наночастиц на микроорганизмы, поскольку они являются одними из наиболее разнообразных таксономическими группами на Земле, выполняют многие важные процессы в экосистемах. Кроме этого микроорганизмы используют как индикаторы состояния природной среды: отражением антропогенного воздействия служат морфологические изменения микробных популяций, кинетика их роста и развития, структурные преобразования микробных сообществ, биохимическая активность.

Микробные реакции на воздействие антропогенного фактора проявляются быстро, достаточно отчетливо, что позволяет в короткие сроки выявить наиболее ранимые экологические зоны, прогнозировать их состояние при сохранении или устранении антропогенного воздействия.

Цель исследования: изучение влияния наночастиц (TiO_2 , ZnO , Pt) на почвенные микроорганизмы и биологическую активность почв.

Задачи:

- собрать и проанализировать сведения о воздействии наночастиц на живые организмы и природные сообщества;
- провести опыт по оценке чувствительности *Pseudomonas fluorescens* и *Trichoderma koningii* к присутствию в среде наночастиц TiO_2 ;

- провести опыт по влиянию наночастиц ZnO и Pt на биологическую активность почв;
- обобщить результаты и сделать выводы.

1. ТОКСИЧНОСТЬ НАНОМАТЕРИАЛОВ

Исследования по токсичности наноматериалов и их влияние на живую природу в первую очередь проводились в лабораториях, так называемые исследования «In Vitro», что в переводе с латинского означает – в пробирке, в искусственных условиях.

Одни из первых наночастиц с уникальными свойствами, известные ученым с давних пор являются металлические наночастицы и образуемые ими нанокластеры. Среди всех металлических наноматериалов следует выделить наночастицы золота и серебра.

Коллоидное золото известно еще с древности и использовалось в лечебных целях. С XX века золото стало применяться в изучении оптических и фрактальных свойств, механизмов агрегации и стабилизации коллоидов, биологии и медицине, физике и аналитической химии.

Учеными было доказано, что типы и способы модификации поверхности наночастиц золота оказывают воздействие на развитие токсического эффекта (in vitro), а также на функциональную активность макрофагов [1]. Изучение токсичности наночастиц золота на эмбрионах показало, что эмбриотоксические свойства сильнее проявляются у наночастиц размером 0,8 нм, чем 1,5 нм. В тоже время тератогенный эффект характерен вне зависимости от их размера.

Наночастиц серебра размером 5-50 нм обладают сильной антибактериальной и цитотоксической активностью по отношению к гепатоцитам крыс. Механизм развития токсичности связан с окислительным стрессом, нарушением функций митохондрий и увеличением проницаемости мембраны. Однако, ингаляционное воздействие наночастицами серебра на крыс в концентрации $1,73 \cdot 10^4 - 1,23 \cdot 10^6$ частиц/см³ в течение двадцати восьми дней не выявило значимых изменений в массе тела и больших отклонений от контрольной группы биохимических показателей периферической крови. Это соответствует требованиям американской конференции (ACGIH), установившей предельно допустимую концентрацию наночастиц серебра в воздухе – $2,16 \cdot 10^6$ частиц/см³. Токсичность наночастиц серебра зависит от используемых клеточных линий (in vitro) и включения наночастиц в дендримеры [2, 3, 4].

Наиболее широко используемым в настоящее время, как в чистом виде, так и в составе наноматериалов оксид титана. Токсикологические исследования тонких (250 нм) и ультратонких (20 нм) TiO₂ при ингаляционном введении крысам показали, что частицы размером 20 нм способны накапливаться в лимфоидных тканях, обладают повреждающим действием по отношению к ДНК лимфоцитов и клеток мозга. Основным механизмом токсического действия наночастиц оксида титана является индукция активных форм

кислорода, причем реактивность зависит не только от размеров наночастиц, но и от того какой структурой представлен TiO_2 [6, 7].

Сильными токсическими свойствами обладают наночастицы алюминия, которые способны подавлять синтез м-РНК. Вызывать пролиферацию клеток, индуцировать проатерогенное воспаление, нарушение функций митохондрий и т.д.[6, 7].

Наночастицы оксида ванадия размером менее 30 нм в концентрации выше 10 мкг/мл обладают сильными каталитическими свойствами и способны генерировать OH^- - радикалы, который в дальнейшем окисляет липиды [5, 7] .

Исследования цитотоксичности диоксида кремния в форме нанопроволоки и наночастиц (*in vitro*) на двух линиях эпителиальных клеток человека показали, что концентрация 190 мкг/мл является предельной, ниже которой токсические эффекты не наблюдаются. Более высокие концентрации вызывали разрушение мембраны и некроз клеток. Использование культуры клеток бронхоальвеолярной карциномы человека показали цитотоксический эффект наночастиц диоксида кремния размером 15 и 46 нм. Наночастицы на основе полистирола (30, 100 и 300 нм) при пероральном введении способны проникать в печень и селезенку [5, 7].

Исследования по токсичности наноматериалов и их влиянию на живую природу проводимые на живых организмах, не в лабораторных условиях, исследования «*In Vivo*», что в переводе с греческого означает - живой, на живом.

Исследования воздействия наночастиц железа на живые организмы, на мышей, крыс, крупно рогатый скот, птиц, рыб, некоторые растительные объекты описанны в монографии Коваленко и Фолманиса «Биологически активные нанопорошки железа».

Так, острое пероральное введение мышам суспензии наночастиц железа в дозе 50, 100 и 500 мкг/кг не вызывало каких-либо токсических эффектов. Только дробное введение доз 1000, 2000 и 5000 мкг/кг приводило к развитию воспалительного процесса на слизистой желудка и кишечника, а также сдвигов в гемопоэзе. Хроническое воздействие наночастицами железа в дозах 20 и 40 мкг/кг в течение 90 дней не приводило к значимым отклонениям от биохимических и гематологических показателей контрольной группы. Кроме того, было показано, что дозы 2 – 6 мкг/кг стимулируют рост животных, бактерицидную активность сыворотки крови и увеличение общего белка в крови. Предпосевная обработка семян нанопорошками железа в концентрации 0,001 % положительно влияло на энергию прорастания, однако увеличение концентрации до 0,01 % приводило к подавлению прорастания. Была рассчитана оптимальная доза предпосевной обработки (2-6 мг на 1 га), дающей от 5 % до 30 % повышения урожайности и улучшения товарного вида растительной продукции. Низкая токсичность суспензии

оксида железа $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ в комплексе с гуминовыми кислотами была показана на клеточной культуре фибробластов человека. Слабая токсичность, биосовместимость и магнитные свойства железа позволили создать маркер на основе Fe_2O_3 , стабилизированного декстраном и цитратом натрия для онкодиагностики (торговое название Синерем). Исследования острой токсичности на крысах и собаках показало, что Синерем проявляет остро-токсические свойства в дозах превышающих 400 мг/кг. Изучение хронической токсичности выявило увеличение активности АЛТ и АСТ в крови, ассоциированных с цитоморфологическими изменениями в печени. Синерем не обладал генотоксичностью. Темнее менее были обнаружены некоторые тератогенные эффекты и эмбриотоксичность. Ингаляционное воздействие наночастиц оксида железа размерами 22 и 280 нм на крыс в дозах 0,8 и 20 мг/кг вызывало индукцию активных форм кислорода в клетках, гиперемии, гиперплазию и фиброз тканей легких. Также было выявлено нарушение системы свертывания крови [8].

Изучение токсичности наночастиц меди (23,5 нм), микрочастиц меди (17 микрон) и ионов (CuCl_2) на мышах при пероральном введении позволило рассчитать параметры острой токсичности: 413, 5000 и 110 мг/кг. Органами-мишенями токсического воздействия оказались печень, селезенка, почки. При этом не масса тела животных не изменялась [8,9].

Фитотоксические исследования свойств наночастиц цинка и его оксида на кукурузе, редисе, огурце показали, что их концентрация 2000 мг/л отрицательно действует на прорастание семян кукурузы и подавляет удлинение корней. Была рассчитана пятидесяти процентная ингибиторная концентрация для редьки, которая составила 50 мг/л.

Воздействие различных концентраций суспензий микрочастиц, наночастиц и ионов цинка на бактерий выявило летальные концентрации –1,8, 1,9 и 1,1 мг/л.

Различия в токсичности наночастиц и микрочастиц цинка также были показаны на взрослых мышах. Причем микрочастицы цинка оказались токсичнее, чем наночастицы. В обоих случаях наблюдалось поражение почечной функции, также нано-цинк вызывал анемию и нарушение системы свертывания крови [7].

Ученые выяснили что углеродные нанотрубки токсичны для клеток кишечной палочки. Исследователи использовали штамм кишечной палочки со встроенным геном из светящихся морских бактерий. Суспензию клеток смешивали с одностенными углеродными нанотрубками таким образом, чтобы в 1 мл водной суспензии присутствовали 1 млрд. клеток и 0,2 мг частиц, и выдерживали разное время при комнатной температуре. Затем клетки отмывали от нанотрубок и рассматривали с

помощью атомно-силового микроскопа. Клетки кишечной палочки, прошедшие несколько дней в воде, выглядят как настоящие палочки. Однако после четырех суток инкубации с углеродными нанотрубками поверхность бактерий была деформирована. Клетка частично утрачивает содержимое, из-за чего ее изображение имеет провал в средней части. На 7-8-е сутки содержимое клеток вытекает полностью, и от бактерий остается только сплюснутая клеточная оболочка.

Исследователи отмечают, что материал, из которого изготовлены нанотрубки, не оказывает на клетки такого действия. Бактерицидными свойствами обладают именно нанотрубки. Через двое суток инкубации с ними количество живых бактерий в суспензии сократилось вдвое, через 3 суток – более чем на порядок. Очевидно, эти структуры механически разрушают бактериальную клеточную стенку и мембрану под ней. Таким образом, углеродные нанотрубки не только вызывают внешние изменения бактерий и снижают их жизнеспособность, но и влияют на клеточный метаболизм. Уже через час совместной инкубации бактерии в два раза увеличивают потребление кислорода, но к третьему часу оно приходит в норму. Уровень метаболизма удобно также определять по свечению клетки: после инкубации с нанотрубками кишечная палочка с геном морской фотобактерии светится далеко не так ярко, как должна. Уже через сутки биолюминесценция снижается на 45-50 %.

Наночастицы SiO_2 диаметром 100 нм не цитотоксичны при концентрации до 30 мкг/мл, однако при увеличении концентрации цитотоксичность возрастает. В работах Pigott G также показана цитотоксичность частиц SiO_2 и их способность к разрушению клеточной мембраны.

Исследования проведенные учеными из НАСА показали, что при впрыскивании наночастиц в дыхательные пути мышей углеродные нанотрубки причиняли значительный вред легким и вызывали гибель нескольких мышей, но при этом фуллерены не наносили никакого вреда [10].

Таким образом видно, что токсичность наноматериалов зависит не только от физической природы, способа получения, размеров, структуры нанокластеров и наночастиц, но и от биологической модели, на которой проводятся испытания. Органы-мишени и механизмы развития токсического эффекта разнообразны. Одни наноматериалы благодаря своей физической природе способны индуцировать активные формы кислорода. Другие способны проникать через тканевые барьеры, внутрь клеток и взаимодействовать с внутриклеточными компонентами. Третьи, дендримеры различной степени генерации, некоторые типы наноматериалов могут нарушать мембранные структуры, делая их проницаемыми. Рассматривая выше изложенный материал, можно увидеть, что не всегда

и не везде наноматериалы оказывают токсическое или иное повреждающее действие. Так одни исследователи однозначно обнаружили цитотоксический эффект магнитных частиц на основе оксида железа, другие же напротив, показали, что они безвредны. Изложенное выше показывает - насколько уникальны по своим свойствам наноматериалы, даже если они состоят из одного и того же химического вещества.

Токсичность же наноматериалов напрямую связана с их размерами, а значит, с крайне высокой удельной площадью, которая обуславливает высокую химическую активность и высокую способность к проникновению в организм, таким образом получается так, что чем меньше размер материала, тем больше его удельная площадь и тем больше степень токсичности материала.

1.1. Влияние наночастиц TiO_2 на микроорганизмы

В настоящее время диоксид титана и особенно его наноразмерные структуры привлекают внимание многих исследователей и в чисто научных, и в прикладных аспектах. Дело в том, что диоксид (двуокись) титана TiO_2 может иметь множество применений в различных областях науки, техники, медицины, охраны окружающей среды. С его добавлением можно получать широкий спектр материалов, обладающих уникальными свойствами. Это оптические материалы, фотокатализаторы, сенситизаторы для солнечных элементов и т. д.

Целый ряд свойств ультрадисперсного диоксида титана проявляется при взаимодействии его с ультрафиолетовым (УФ) излучением. Даже его наноразмерные плёнки или небольшие добавки в материалы существенно снижают воздействие ультрафиолетового излучения за счёт его поглощения, отражения и рассеивания. Поэтому наночастицы диоксида титана (с размерами первичных частиц в 20 — 70 нм) используются при производстве солнцезащитных экранов, пластиковых фильтров для защиты от УФ-излучения, автомобильных эмалей, магнитных лент, тонеров и катализаторов. При облучении TiO_2 ультрафиолетом с длиной волны ниже 385 нм в присутствии паров воды образуются радикалы $-\text{OH}$ и ионы $\text{O}_2^{\cdot-}$, которые активно взаимодействуют со всеми органическими веществами. Недавно была обнаружена способность нанодиоксида титана под воздействием ультрафиолетового излучения генерировать свободные радикалы, смертоносные для микроорганизмов, в том числе вирусов гриппа. Оксид титана разлагает органические соединения только при солнечном свете, используя для этого его ультрафиолетовую составляющую. Поэтому на основе

оксида титана изготавливают фотокатализаторы, очищающие воду и воздух от токсичных органических веществ.

Нанесённая на стекло плёнка из наночастиц оксида титана прозрачна и незаметна для глаза. Однако такое стекло под действием солнечного света способно самоочищаться от органических загрязнений, превращая любую органическую грязь в углекислый газ и воду. Стекло, обработанное наночастицами оксида титана, лишено жирных пятен и поэтому хорошо смачивается водой. В результате, такое стекло меньше запотевают, так как капельки воды сразу распластываются вдоль поверхности стекла, образуя тонкую прозрачную плёнку.

К сожалению, оксид титана перестаёт работать в закрытых помещениях, т.к. в искусственном свете практически нет ультрафиолета. Однако учёные считают, что, слегка изменив структуру оксида титана, можно будет сделать его чувствительным и к видимой части солнечного спектра. На основе таких наночастиц оксида титана можно будет изготовить покрытие, например, для туалетных комнат, в результате чего содержание бактерий и другой органики на поверхностях туалетов может снизиться в несколько раз.

Наночастицы оксидов титана могут разлагать не только сложные органические соединения, но и опасные для человека моноокиси азота и углерода, содержащиеся в автомобильных выхлопах. Поэтому пудру из этих наночастиц стали добавлять в топливо, чтобы снизить содержание этих вредных примесей в выхлопных газах.

Фотокатализаторы на основе TiO_2 используются для ускорения процесса фотохимических реакций. К сферам их применения относятся очистка воды, дезодорация и очистка воздуха, антибактериальная обработка, удаление пятен и потускнения. В космической отрасли наноразмерный диоксид титана применяют при производстве специальных пластмасс для защиты от ультрафиолетового излучения, изготовлении самоочищающихся стёкол, фотокатализаторов, электрохромных дисплеев, электротехнических керамик и композиционных материалов. Большая часть производимого диоксида титана используется в лакокрасочной промышленности. Диоксид титана – разрешенная к применению микродисперсная пищевая добавка (E171); отрабатываются технологии получения препаратов более высокой степени дисперсности.

Применение наночастиц в промышленности и, значит, содержание их в нашем окружении, с каждым годом продолжает увеличиваться. С одной стороны, преимущество использования наночастиц очевидно. С другой стороны, на настоящий момент проблема обнаружения наночастиц не изучена, и возможность влияния их на организм человека остается открытой. Данные, полученные в различных исследованиях о влиянии наночастиц на организмы достаточно противоречивы. Чтобы лучше понимать какое

воздействие оказывают наночастицы титана на окружающую среду, целесообразно проводить опыты влияния наночастиц на микроорганизмы, поскольку они являются одними из наиболее разнообразных таксономическими группами на Земле, выполняют многие важные процессы в экосистемах. Кроме этого микроорганизмы используют как индикаторы состояния природной среды: отражением антропогенного воздействия служат морфологические изменения микробных популяций, кинетика их роста и развития, структурные преобразования микробных сообществ, биохимическая активность. Микробные реакции на воздействие антропогенного фактора проявляются быстро, достаточно отчетливо, что позволяет в короткие сроки выявить наиболее ранимые экологические зоны, прогнозировать их состояние при сохранении или устранении антропогенного воздействия.

Имеющиеся данные о влиянии наночастиц диоксида титана на микроорганизмы и бактерии не дают однозначного ответа на вопрос токсичности этих наночастиц.

По некоторым данным внесение в среду культивирования высокодисперсных частиц диоксида титана оказывает стимулирующее действие на рост *Azotobacter vinelandii*. Авторами установлено, что максимальный эффект наблюдается при концентрации данного материала 5 г/л и 10 г/л. В этих условиях количество выросших бактерий в несколько раз выше, чем в контрольных вариантах. Показано, что стимулирующий эффект не может быть следствием сорбции сахарозы на поверхности частиц дисперсного материала. Возможно, контактное взаимодействие клеток бактерий с диоксидом титана обуславливает увеличение проницаемости клеточной стенки, что приводит к возрастанию степени поступления субстрата в клетку [11].

При культивировании бактерий *Bacillus mucilaginosus* с внесением дисперсной системы наночастиц TiO_2 размером 5 нм в питательную среду удельная скорость роста культуры, по сравнению с контролем, увеличивается. Однако при выходе в стационарную фазу развития культуры наблюдается некоторое ингибирование роста бактерий. Аналогичные результаты были получены для роста бактериальных культур в присутствии дисперсной системы наночастиц TiO_2 размером 50 нм. В то же время, при культивировании бактерий *Pseudomonas fluorescens* в питательной среде с добавлением ДС НЧ TiO_2 размером 5 нм удельная скорость роста культуры во всех вариантах опыта ниже, чем в контроле. Однако можно отметить, что на последующих стадиях развития периодических бактериальных культур (стадия замедления и стационарная фаза) происходит стимуляция роста бактериальных культур во всех опытных вариантах. Добавление дисперсной системы микрочастиц TiO_2 размером 350 нм практически не повлияло на рост бактерий *Pseudomonas fluorescens* и *Bacillus mucilaginosus*. В целом,

присутствие в питательной среде ДС НЧ TiO_2 размерами 5 и 50 нм влияет на рост популяции бактерий: стимулирует рост *Pseudomonas fluorescens* и подавляет рост *Bacillus mucilaginosus* [12].

Воздействие наночастиц титана и в концентрации 0,01 мг/мл в течение 30 мин не приводило к статистически достоверным изменениям антибиотикочувствительности клинических штаммов *Escherichia Coli*.

Также имеются данные о количественном определении токсичности диоксида титана. Так три вида бактерий *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и *Saccharomyces cerevisiae*, были использованы для проведения опыта по уровню выживаемости микроорганизмов в присутствии наночастиц титана. *Escherichia coli* показала самый низкий уровень выживаемости (36 %), в то время как *Saccharomyces cerevisiae* самый высокий уровень выживаемости (71 %). Антимикробное действие TiO_2 также зависит и от длины волны ультрафиолетового излучения: коэффициент выживаемости *Escherichia coli* был 40 % при длине волны 254 нм и 80 % при 365 нм [13].

Исследовательская команда департамента естественных наук в Китае ввела наночастицы диоксида титана в семена шпината. Эти частицы должны были привести к увеличению поглощения органическими соединениями воды и кислорода в растении и уменьшить долю свободных радикалов, образующихся в процессе фотосинтеза. Результаты показали, что растения после всходов фотосинтезировали втрое эффективней, а также возросло образование хлорофилла более чем на 45%. В рамках второго исследования в этой области, команда из университета Арканзаса использовала внедрение в семена томатов углеродные нанотрубки. Это увеличило всхожесть растений на 90%. Однако нужно быть осторожным с «дозировкой» наноматериалов. Например, переизбыток наночастиц подавляет рост корней таких растений как редька, рапс, салат и огурцы, а внедрение большого количества ионов серебра являются фитотоксичными для растений.

В работах Ге с соавторами сообщили, что наночастицы TiO_2 (в дозах 0, 0,5, 1,0 и 2,0 мг на 1г почвы) и отрицательно влияют на почвенные бактериальные сообщества в условиях микрокосма.

Ду с соавторами изучали влияние наночастиц TiO_2 (в дозах 10 г и 5 г в 110 кг почвы, соответственно) на рост пшеницы и активность почвенных ферментов. Было показано, что эти наночастицы не влияют на активность уреазы, но значительно ингибируют почвенные протеазы, каталазу, пероксидазу, то есть они являются токсичными для экосистемы почвы.

Таким образом, экотоксикологические эксперименты требуют дальнейшего развития, чтобы включить оценку воздействия наночастиц на следующее ранее не подвергавшееся воздействию поколение, которое в настоящее время не включено в стандартные протоколы испытаний [14].

1.2. Влияние наночастиц ZnO на микроорганизмы

Наночастицы цинка обладают высокой противокоррозионной и противогрибковой активностью, способны выступать в качестве полезного организму микроэлемента, а так же активно поглощают УФ излучение. Составы содержащие цинк в различной форме широко применяются в современной промышленности для производства большого количества товаров бытового, промышленного и специального назначения. Наиболее распространено применение соединений цинка в парфюмерной, косметической и лакокрасочной промышленности.

Ниже приведены некоторые данные о влиянии наночастиц оксида цинка на микроорганизмы.

В основном все работы по исследованию влияния наночастиц оксида цинка на микроорганизмы проводятся на чистых культурах. Работы, проведенные на микробном сообществе почвы, немногочисленны. В работе Collins с соавторами (2012) при анализе микробных сообществ почвы с использованием культурно-зависимые и независимые методы четко указано, что наночастицы ZnO изменили структуру микробного сообщества [15]. Пирокселирование подтверждает гипотезу о том, что воздействие наночастиц существенно изменяет микробное сообщество. В частности, бактерии двух порядков - *Flavobacteriales* и *Sphingomonadales*, обнаруженных в ризосфере, были особенно чувствительны к присутствию наночастиц оксида цинка. В работе Ge с соавторами (2012), которые также изучали влияние наночастиц оксида цинка на микробное почвенное сообщество методом пирокселирования, показано изменение структуры сообщества. Отмечено снижение представителей таксонов, связанных с фиксацией азота (*Rhizobiales*, *Bradyrhizobiaceae* и *Bradyrhizobium*) и окислением метана (*Methylobacteriaceae*), в то время увеличилось представительство бактерий таксонов, связанных с разложением органических загрязнителей (*Sphingomonadaceae*) и биополимеры, в том числе белка (*Streptomycetaceae* и *Streptomyces*), что указывает на возможные масштабные последствия для экосистем [16].

В другой работе показано снижение роста бактерий почвы под влиянием наноZnO. Отмечено, что все формы Zn были токсичны для почвенных бактерий и ZnO в

макроформе был более токсичным, чем наноZnO. Полученные Rousk с соавторами результаты свидетельствуют о том, что основным механизмом токсичности было растворение оксидов металлов и сульфатов в виде ионов металлов, что как известно высоко токсично для бактерий, а не прямой эффект наноразмерных частиц, действующих на бактерии [17]. В работах других авторов также показано уменьшение общего микробного числа, бактериального разнообразия и изменение структуры почвенного микробного сообщества при внесении в почву наночастиц оксида цинка [18;19].

Наночастицы оксида цинка ZnO (диаметр ~15 нм) влияют на рост бактерий *Escherichia coli*. Такие наночастицы были синтезированы путем окисления солей цинка в диэтиленгликоле. На подложку наносили наночастицы ZnO и различные соединения, а именно три-н-октилфосфиноксид, додецилсульфат натрия, полиоксиэтиленстеарат и бычий сывороточный альбумин (технологические примеси в искусственных наноматериалах). Обнаружено, что рост бактерий замедляется в присутствии додецилсульфата натрия, в то время как три-н-октилфосфиноксид и полиоксиэтиленстеарат способствуют росту бактерий. Аналогичные эксперименты проводились и в отсутствие адсорбированных молекул при концентрации наночастиц ZnO 1—10 мМ. При концентрациях ZnO выше 1,3 мМ наблюдается повреждение бактерий. Полная гибель бактерий наступает при концентрациях 3—10 мМ.

Для оценки антибактериальной активности наночастиц ZnO используют разные аналитические методы. Один из наиболее часто используемых методов это метод разбавления питательной агаризованной среды суспензией наночастиц, добавление культуральной жидкости с тест-бактериями, инкубирование в благоприятных условиях и а затем подсчет выросших колоний в сравнении с контролем, без внесения НЧ. В настоящее время в основном в качестве модельных бактерий для оценки антибактериальной активности наночастиц ZnO используют грамотрицательную *Escherichia coli* и грамположительный *Staphylococcus aureus*. Исследования с использованием других видов бактерий, таких как *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio fischer*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Campylobacter jejuni* и *Proteus vulgaris* для оценки антибактериальной активности наночастиц ZnO ограничены [19;20;21;22;23;24;25]. Chitra и Annadurai (2013) исследовали антибактериальную активность наночастиц ZnO в отношении *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*, противогрибковую активность наночастиц ZnO анализировали в отношении *Aspergillus niger* [26].

Xie с соавторами (2011) обнаружили, что минимальная ингибирующая концентрация из наночастиц ZnO размером около 30 нм для *Campylobacter jejuni*

составляет 0,05-0,25 мг мл⁻¹, а для штаммов *Staphylococcus enteric* и *Escherichia coli* O157:H7 - 0,4 мг мл⁻¹ [25]. Raghupati с соавторами (2011) и Jones с соавторами (2008), также наблюдали разницу в антибактериальной активности наночастиц ZnO различных концентраций для разных штаммов золотистого стафилококка [27]. Многие авторы также показали, что размер частиц может повлиять на антибактериальную активность наночастиц ZnO [18;20;21;22]. Yamamoto (2001) исследовал влияние размера наночастиц ZnO в диапазоне 100-800 нм на антибактериальную активность [28]. Было обнаружено, что антибактериальная активность наноZnO увеличивается с уменьшением размера частиц. Особенно зависимость наблюдалась в диапазоне 100 - 800 нм на культурах золотистого стафилококка и кишечной палочки. Это же в экспериментах с *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* подтвердили другие авторы [29;23]. Padmavathy and Vijayaraghavan (2008) изучали бактерицидную способность суспензии ZnO с тремя различными размерами частиц (12 нм, 45 нм, 2 мкм) в нижнем диапазоне концентраций (0,01- 1 мМ) и высоком диапазоне концентраций (5-100 мМ) против кишечной палочки. Результаты показали, что суспензия наноZnO с частицами размером 12 нм были более эффективными, чем суспензии с большими размерами частиц [30]. Raghupati с соавторами (2011) также установили, что антибактериальная активность наночастиц ZnO была обратно пропорциональна размеру. Ингибирование роста золотистого стафилококка отмечено в присутствии 6 мМ наночастиц ZnO различных размеров от 12 до 307 нм. Дополнительно жизнеспособность клеток золотистого стафилококка определяли путем пересева из растущих в присутствии 6 мМ наночастиц ZnO с размерами от 12 до 307 нм клеток на среду без наночастиц. Было отмечено, что жизнеспособность клеток значительно снизилась с уменьшением размера наночастиц ZnO [31].

Многими исследователями показано, что антибактериальный эффект наночастиц ZnO зависит не только от размера частиц, но и от их концентрации. Jalal с соавторами (2010) показали, что с увеличением концентрации наночастиц наблюдается повышение антибактериальной активности в отношении кишечной палочки из-за увеличения количества H₂O₂, генерируемого с поверхности ZnO [24]. Wahab с соавторами (2012) исследовали антибактериальную активность наночастиц ZnO. Результаты ясно показали, что рост скорости ингибирования штаммов возрастает с увеличением концентрации наночастиц ZnO от 5 до 45 мкг мл⁻¹ [32].

Размеры и морфология наночастиц ZnO также играют важную роль в определении антибактериального эффекта [17;26;27;28]. Тем не менее, отношения между различными формами наночастиц ZnO и антибактериальной активностью до конца не ясно. Wang с соавторами (2007) изучали отношения между антибактериальной

активностью и различными ориентациями массивов наноZnO. Результаты показали, что хаотически ориентированные нано-массивы ZnO показали лучшую антибактериальную активность по сравнению с менее или хорошо ориентированными нано-массивами ZnO по отношению к культуре *Escherichia coli* [33]. Stankovic с соавторами (2013) исследовали влияние размерности и морфологии на антибактериальные свойства наночастиц ZnO гидротермально синтезированных с использованием различных стабилизирующих поверхностных агентов, таких как поливинилпирролидон (ПВП), поливиниловый спирт (ПВС) и поли (α , γ , L-глутаминовой кислоты) (PGA). Различия между синтезированными наночастицами могут быть отнесены к различной природе реакционных стабилизирующих агентов, используемых в процедуре синтеза [34]. Значительных различий в антибактериальной активности в зависимости от морфологии и размера синтезированных наночастиц ZnO не наблюдалось.

Yamamoto с соавторами (2004) показали, что порошок НЧ ZnO, состоящий из наносферических частиц со средним диаметром около 30 нм имел высокую антибактериальную активность. Антибактериальная активность порошка ZnO возрастала с увеличением значений постоянной решетки в гексагональной структуре ZnO порошка. Образование H_2O_2 во всех образцах нано-ZnO способствовало возникновению антибактериальной активности и его количество возрастает с увеличением значений в гексагональной структуре [35]. Ohira и Yamamoto (2012) изучали взаимосвязь между антибактериальной активностью и размером кристаллов ZnO. Результаты показали, что антибактериальная деятельность наночастиц ZnO с небольшим размером кристаллов была больше, чем у кристаллов с большим размером. Ионы Zn^{2+} больше элюируют из наночастиц ZnO, имеющих малый размер кристаллитов, что приводит к более высокой антибактериальной активности [36].

Многие исследования также показали, что наночастицы ZnO имеют более высокую активность по отношению к грамположительным бактериям, чем к грамотрицательным [23;27]. Kim and An (2012) оценили влияние наночастиц ZnO на рост *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*. Было установлено, что EC50 на *Escherichia coli* наблюдается при концентрации наноZnO 80 мг л⁻¹. Результаты просмотра изображений показали, что обнаруженные в культуре *Escherichia coli* отражатели (рефлекторы) наблюдаются предположительно в результате некроза клеток под воздействием наночастиц ZnO. Тем не менее, в культуре *Bacillus subtilis* не было обнаружено никаких отражателей. Причиной может быть, вероятно, разница в структуре клеточных мембран. Клеточная стенка грамположительных бактерий состоит из слоя пептидогликана с тейхоевой и липотейхоевой кислотами [37]. Клеточная стенка грамотрицательных

бактерий имеет наружную мембрану, которая в основном состоит из липополисахарида и тонкого слоя пептидогликана [38]. Таким образом, внешняя мембрана грамотрицательных бактерий может уменьшить ущерб от наночастиц ZnO. Applerot с соавторами (2009) наоборот обнаружили, что грамотрицательные *Escherichia coli* показали более высокую восприимчивость к наночастицам ZnO по сравнению с грамположительными *Staphylococcus aureus*. Тем не менее, в соответствии с объяснением Applerot с соавторами (2009), причиной может быть различия содержания внутриклеточных антиоксидантов, таких как пигменты каротиноиды, а также присутствие сильнодействующих агентов детоксикации, таких как антиоксидантные ферменты бактерий [39]. Исследования показали, что антибактериальная активность наночастиц ZnO в сочетании с другими антибактериальными агентами имеет лучшую активность по сравнению с несвязанными наночастицами ZnO.

Gordon с соавторами (2011) сочетали наночастицы ZnO с оксидом железа для получения магнитных наночастиц с антибактериальной активностью. Результаты показали, что антимикробный эффект объединенных наночастиц зависит от соотношения веса Zn / Fe, то есть, чем выше соотношение, тем выше антибактериальная активность [40].

Точный механизм токсичности наночастиц ZnO является до сих пор до конца неясным. Тем не менее, рядом авторов были предложены некоторые антибактериальные механизмы воздействия наночастиц оксида цинка, такие как формирование реактивной формы кислорода (РФК), взаимодействие наночастиц с бактериями, ведущим к повреждению бактериальных клеток, и высвобождение Zn^{2+} [41;42].

Многие исследования показали, что формирование РФК является основным антибактериальным механизмом nanoZnO [32;33;34;41]. Многие исследования ясно показали, что наночастицы ZnO в водном растворе могут производить различные РФК такие как гидроксильные радикалы, синглетный кислород или супероксид анион и перекись водорода (H_2O_2). Гидроксильные радикалы и синглетный кислород не могут проникать в клеточные мембраны, тогда как пероксид водорода может легко проникать в клетку [43]. Образование РФК зависит от площади поверхности наночастицы ZnO, т.е. чем выше площадь поверхности, тем выше образование РФК [21;23].

Другой механизм, объясняющий антимикробный эффект наночастиц ZnO, связан с повреждениями бактериальной поверхности. Zhang с соавторами (2007) ясно показали, что присутствие наночастиц ZnO приводит к повреждению клеточной мембраны *Escherichia coli*. Электрохимические измерения показали, что такое воздействие может быть за счет прямых взаимодействий между наночастицами ZnO и клеточной мембраны

при высоких концентрациях наночастиц [44]. В другой своей работе эти авторы указали, что сильное связывание между наночастицами и поверхностью бактерий происходит за счет электростатических сил и ведет к повреждению клеточных мембран [45].

Хие с соавторами (2011) наблюдали, что при взаимодействии между наночастицами ZnO и *C. jejuni* происходят морфологические изменения, утечка внутриклеточного содержимого [23]. Повреждение клеточных мембран при взаимодействии наночастиц ZnO и бактерий, которые привели к утечке клеточного содержимого, было также отмечено Wahab с соавторами (2012) при использовании типичной технологии био-ТЕМ. С помощью полученных био-ТЕМ изображений был предложен возможный механизм взаимодействия НЧ ZnO с клеточными мембранами: первоначально наночастицы прикрепляются к наружной мембране клетки, в результате чего происходит формирование ямок в клеточной стенке с последующим пробоем наружной мембраны клетки [35]. Таким образом, в соответствии с этими исследованиями, прямое взаимодействие между наночастицами ZnO и бактериальной поверхностью, а также образование РФК приводит к повреждению клеточной мембраны.

Исследование таких видов бактерий как *Staphylococcus aureus* и *Salmonella typhimurium* на предмет их ингибирования в присутствии в среде наночастиц оксида цинка в размере 20-25 нм, показало, что наночастицы ZnO проявляют значительное бактерицидное действие в отношении этих бактерий. [32]

Известно, что ионы цинка, могут ингибировать деятельность бактерий, таких как гликолиз, перемещение трансмембранных протонов и кислотную толерантность. Наличие ионы цинка может продлить лаг фазу бактерий и, таким образом, внести вклад в антибактериальную активность [36]. Тем не менее, низкие концентрации растворимого Zn^{2+} могут способствовать росту бактерий. Padmavathy и Vijayaraghavan (2008) обнаружили, что суспензия наночастиц ZnO в концентрациях 0,01-1 mM обладают меньшей антибактериальной активностью против кишечной палочки из-за наличия растворимых ионов Zn^{2+} [33].

В работах Ге с соавторами сообщили, что ZnO (в дозах 0,05, 0,1 и 0,5 мг на 1г почвы) отрицательно влияют на почвенные бактериальные сообщества в условиях микрокосма. При этом они отмечают, что снижается микробная биомасса, бактериальное разнообразие и состав. Эффект у НЧ ZnO был сильнее, чем у НЧ TiO₂. [Error! Reference source not found.]. В другой работе этих авторов в аналогичном эксперименте на основе анализа ДНК было установлено, что в микробном сообществе снижается доля таксонов, связанных с фиксацией азота и окислением метана, в то же время НЧ ZnO увеличивается

доля таксонов, связанных с разложением трудно разлагаемых органических загрязнителей и биополимеров [3Error! Reference source not found.].

В исследовании Шана с соавторами показано, что НЧ Cu и ZnO изменили структуру микробного сообщества минимально. Наблюдаемые результаты авторы объясняют биологической адаптацией почвенных микроорганизмов к переходным металлам.

В работе Коллинса с соавторами [3Error! Reference source not found.] изучались последствия добавления наночастиц меди оксида цинка в почву в горшках, которые были выставлены в природные условия. Культурально-зависимыми (FAME-анализ и пироксвенирование) и культурально-независимыми (Biolog® ecoplates) методами четко было установлено изменение структуры микробного сообщества. Так отмечено снижение бактерий, принадлежащих к Flavobacteriales и Sphingomonadales, вплоть до полного их исчезновения в нижних слоях исследуемых микрокосмов (горшках).

В исследовании Ге с соавторами [Error! Reference source not found.] зафиксированы изменения в структуре бактериальных сообществ при внесении НЧ оксида цинка (0,5 г кг⁻¹) в почву, незасеянную растениями. Так, например, увеличивается содержание Rhizobium и Sphingomonas, но уменьшается количество других групп бактерий - Ensifer, Rhodospirillaceae, Clostridium, Azotobacter. В то же время в почвах, засеянных соей, такие изменения незначительны. Авторы предполагают, что снижение негативного эффекта воздействия НЧ оксида цинка можно объяснить сорбцией ионов к корням растений либо происходит взаимодействие НЧ с корневыми выделениями и отшелушивающимися клетками корней, приводящее к снижению биотоксичности НЧ.

В некоторых работах рассматривается влияние наночастиц металлов на почвенные ферменты. Ду с соавторами [Error! Reference source not found.] изучали влияние НЧ TiO₂ и ZnO (в дозах 10 г и 5 г в 110 кг почвы, соответственно) на рост пшеницы и активность почвенных ферментов. Было показано, что эти наночастицы не влияют на активность уреазы, но значительно ингибируют почвенные протеазы, каталазу, пероксидазу, то есть они являются токсичными для экосистемы почвы. В работе Ким с соавторами [Error! Reference source not found.] показано, что НЧ ZnO ингибируют деятельность дегидрогеназы, β-глюкозидазы и кислой фосфатазы в почвах под Cucumis sativus (огурец обыкновенный).

Чей с соавторами [Error! Reference source not found.] показали, что при воздействии НЧ оксида цинка на сельскохозяйственную почву происходит снижение ферментативной активности почвы и уменьшается количество азотобактера.

В отчете предыдущего этапа данного Госзадания были рассмотрены литературные данные по влиянию наночастиц ZnO и Pt на чистые культуры микроорганизмов.

Показано, что в основном, наночастицы негативно влияют на рост и развитие бактерий. Анализируя опубликованные данные по влиянию наночастиц на почвенные микробные сообщества, можно сделать заключение о том, что, несмотря на то, что в целом наночастицы отрицательно влияют на жизнедеятельность микроорганизмов, в полевых условиях органическое вещество почвы и связанные с ним компоненты, такие как гуминовые и фульвокислоты, а также растения могут свести на нет токсическое воздействие наночастиц с помощью различных механизмов.

1.3. Влияние наночастиц Pt на микроорганизмы

Платина обладает сочетанием необычных физических и химических свойств, благодаря чему находится под пристальным вниманием уже очень давно. У неё есть целый ряд применений в технике: химические сенсоры, биосенсоры, катализаторы для получения водорода из метана, электрокатализаторы в полимерных электродных мембранах топливных батарей и т.д. Платиновые наночастицы используются для промышленного синтеза азотной кислоты, уменьшение выхлопных газов от транспортных средств и в качестве каталитических агентов для синтеза магнитных наночастиц. Каталитическая реакционная способность НП зависит от формы, размера и морфологии частиц [33]. Также платина является мощнейшим антиоксидантом, что способствовало широкому распространению наночастиц в косметологии.

Как известно, платина инактивирует микроорганизмы, взаимодействуя с их ферментами, белками или ДНК, что сдерживает клеточное деление. Платина связывается с бактериальной клеткой, изменяя функциональность клеточной мембраны, тем самым предотвращая бактериальную регенерацию, что приводит к гибели клетки [46].

Некоторыми исследователями показано, что наночастицы платины обладают антибактериальной активностью. Польские исследователи добавляли гидроколлоиды нано-Pt непосредственно в суспензию бактерий *Salmonella Enteritidis* и *Listeria monocytogenes* [47]. Электронно-микроскопические исследования морфологических изменений показали, что наночастицы Pt проникают в клетки *Listeria monocytogenes*, но удаляются из клеток после их отмывания. В случае с *Salmonella Enteritidis*, гидроколлоиды нано-Pt были зафиксированы внутри бактериальных клеток, что свидетельствует о высокой вероятности связывания наночастиц с ДНК бактериальных клеток. Даже после промывки и центрифугирования клеток в них обнаруживали частицы комплекса нано-Pt-ДНК *Salmonella Enteritidis*. Среднее число бактериальных клеток, содержащих гидроколлоиды нано-Pt, не изменилось даже после длительной инкубации,

что свидетельствует о том, что полученные комплексы нано-Pt-ДНК *Salmonella Enteritidis* являются стабильными.

В другой работе этой же группы ученых были рассмотрены взаимодействия гидроколлоидов нано-Pt с суспензиями клеток бактерий *Staphylococcus aureus* и дрожжей *Candida albicans* [48]. Было показано, что при добавлении нано-Pt к суспензии *S.aureus* происходит разрушение клеточной стенки и цитоплазматических мембран и содержимое клетки (цитоплазма) вытекает. Также гидроколлоиды нано-Pt вызывают разрушение цитоплазматических мембран у *Candida albicans*, происходит утечка некоторых веществ из клетки. Таким образом, был сделан вывод о том, что коллоиды нано-платины обладают летальным эффектом для *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*. В работе Rezaei-Zarchi [48] показано, что наночастицы оксида платины также обладают бактерицидным действием против *Pseudomonas Stutzeri* и видов *Lactobacillus*.

Gopal с соавторами [49] исследовали бактериальную токсичность наночастиц Pt с различными размерами на *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериотоксичные свойства были изучены многими аналитическими методами, такими как обычный метод подсчета на агаризованной среде, исследование матрицы с лазерной десорбцией / ионизацией масс-спектрометрии (MALDI-MS), методами флуоресцентной микроскопии и флуоресцентно чувствительными методами. Результаты показали, что наночастицы Pt с размерами частиц менее 3 нм имеют ярко выраженные бактериотоксичные свойства. В то время как более высокие размеры частиц (6–8 нм и 16–18 нм) не показывают токсическое действие, а в большинстве случаев стимулируют усиленный рост бактерий. Pelka с соавторами [6] исследовали влияние на ДНК наночастиц Pt размером 20 нм, < 100 нм и > 100 нм. Они сообщили, что наночастицы Pt размером 20 нм показали выраженный эффект на ДНК по сравнению с более крупными размерами частиц. Также известна зависимость токсичности наночастиц платины от времени инкубации *Pseudomonas aeruginosa*. Так, например, в течении 6 ч инкубации бактерий наночастицы показывают наибольшую токсичность.

Возможно, что наночастицы Pt меньшего размера могут взаимодействовать с бактериальными клетками намного легче, чем частицы большего размера. Также возможно, что так как поры бактериальной клеточной мембраны по размеру несколько нанометров, то, следовательно, доступ для небольшого размера сферических наночастиц в бактериальную клетку проще по сравнению с более крупными наночастицами Pt. После того, как эти наночастицы проникают в клетки они могут взаимодействовать с молекулами внутри клетки, особенно с ДНК, что и приводит к разрушению клеток [49].

Konieczny с соавторами [50] определили антимикробные свойства наночастиц Pt в отношении грамотрицательных (*Escherichia coli*) и грамположительных (*Staphylococcus aureus*) бактерий. Оба патогены обрабатывали наночастицами Pt двух концентраций (2 и 20 мкг/мл) двух размеров (5,8 нм и 57 нм). Ингибирование жизнеспособности было значительным в зависимости от концентрации только в случае взаимодействия кишечной палочки с мельчайшими наночастицами. Следует отметить, что значительное ингибирование роста наблюдалось уже при концентрации наночастиц Pt 2 мкг/мл и составило примерно $66,5 \% \pm 10,1 \%$ от контрольных клеток. В случае более крупных наночастиц Pt снижение выживаемости кишечной палочки наблюдалось только при самой высокой концентрации, используемой в нашем исследовании (20 мкг/мл), и было оценено в 70 % от контрольных клеток. Полученные для золотистого стафилококка данные на наночастицах Pt размером 5,8 нм не были значимыми. Большие наночастицы (57 нм) не обладают антимикробными свойствами по отношению к золотистому стафилококку. Полученные данные показали, дифференциацию антимикробного потенциала наночастиц Pt [51].

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Метод определения степени токсичности различных сред к микроорганизмам используется в качестве быстрого и достаточно чувствительного теста для получения ориентировочных данных о токсичности исследуемой среды. Этот тест является также чувствительным при определении влияния химических веществ на микроорганизмы различных групп.

Изучение токсичности наночастиц по отношению к микроорганизмам различных систематических групп проводится методом посева на плотные среды (методом Коха). Сущность метода заключается в посеве определенного объема исследуемой суспензии на плотную среду в чашки Петри и последующем подсчете выросших колоний. Чашечный метод широко используется для определения количества жизнеспособных микроорганизмов в исследуемой среде.

Проведение работ по определению степени токсичности наночастиц и интерпретация результатов соответствуют методике определения токсичности почв по отношению к микроорганизмам, описанной в «Методах микробиологического контроля почвы. Методические рекомендации. 24 декабря 2004 г. ФЦ/4022». В отличие от рекомендуемого метода, где образцы почвы раскладываются в чашку Петри, а сверху заливаются сначала голодным, а затем питательным агаром, суспензия наночастиц вносится непосредственно в питательную среду.

Проведение работ по определению влияния почвы, обработанной раствором наноматериалов, на интегральные показатели биологической активности почв соответствуют методике определения токсичности почв по биологической активности почв, описанной в «Почва, очистка населенных мест, бытовые и промышленные отходы, санитарная охрана почвы. Гигиеническая оценка качества почвы населенных мест. Методические указания МУ 2.1.7.730-99» и в «Методических указаниях по гигиеническому обоснованию ПДК химических веществ в почве» от 05.08.82 N 2609-82».

2.1. Опыт по оценке чувствительности *Pseudomonas fluorescens* и *Trichoderma koningii* к присутствию в среде наночастиц TiO₂

Бактерии *Pseudomonas fluorescens* относятся к царству Procaryota, отделу Gracilicutes, группе – грамотрицательные аэробные палочки и кокки. Колонии полупрозрачные, края ровные, четкие. Могут образовывать желтый пигмент, который

флуоресцирует с зеленоватым оттенком. Клетки бактерий в виде прямых или слегка изогнутых палочек, размером 0,5 x 1,5 – 3,5 мкм. Грамотрицательные. Подвижные за счет нескольких полярных жгутиков. Покоящиеся стадии неизвестны. Хемоорганотрофы. Широко распространены в природе, являются естественными обитателями почвы и воды и поэтому играют огромную роль в круговороте веществ в природе.

Микроскопические почвенные грибы *Trichoderma koningii* относятся к царству Fungi, порядку Hyphomycetales (Moniliales), семейству Moniliaceae. Колонии на агаре Чапека распростерты, пушистые, вначале развивается стерильный белый мицелий, на 5-10 день появляется конидиальное спороношение, окрашенное в светло-зеленый цвет. Конидиеносцы возникают из ветвей воздушного мицелия, распростерто разветвленные, с супротивными или очередными ответвлениями. Конечные веточки-фиалиды конусовидные. Конидии возникают на вершинах фиалид, продолговатые до эллипсоидных, 3,2-4,8 x 1,8– 3,0 мкм, скученные в головки.

Тест-система представлена питательной средой и соответствующей ей тест-культурой. При создании испытательной питательной среды суспензия наночастиц соответствующего разведения вносится в питательную среду, после застывания среды и подсушивания чашек производится посев индикаторного штамма.

Для изучения бактериальных тест-культур использовали питательный агар (готовый рыбный гидролизат с добавлением 1 % пептона), при изучении микроскопических грибов и актиномицетов – среду Чапека. Первоначально готовили концентрированные растворы питательной среды. После стерилизации в готовую стерильную среду (объемом 50 мл) добавляли равный объем суспензии наночастиц соответствующего разведения. Всего использовали 5 разведений. Перед внесением в питательную среду суспензию наночастиц тщательно перемешивали на качалке в течении 30 минут. После внесения суспензии наночастиц в колбу с питательной средой содержимое колбы также тщательно перемешивали. Затем приготовленную испытательную среду разливали по чашкам Петри. Посев исследуемого тест-объекта проводили после застывания питательной среды и подсушивания чашек. На поверхность среды производили посев методом отпечатка культуры индикаторного штамма, суспензированного в физиологическом растворе. Все посевы проводили в 3 параллельные чашки Петри. Контролем в данных исследованиях были питательная среда с внесением суспензии макроформ исследуемых веществ и питательная среда без добавления суспензии наночастиц с последующим посевом на них тест-культур.

Для изучения бактериальной тест-культуры *Pseudomonas fluorescens* использовали питательный агар (готовый рыбный гидролизат с добавлением 1 % пептона) и среду Эшби (для азотобактера).

Посевы инкубируют в термостате при температуре +28 °С в течении 3-5 дней.

Учет результатов производят путем подсчета выросших колоний в точках посева. Процент пророста (Р) высчитывается как количество образовавшихся колоний к количеству посевов. Токсичность определяется по формуле: $T = 100 - P$. Этим методом устанавливается абсолютная токсичность, когда на чашках не вырастает ни одна колония; отсутствие токсичности – на местах всех посевов вырастают колонии и различная степень токсичности – когда прорастает только часть засеянных точек. Кроме того, оценку степени чувствительности бактерий к присутствию в среде наночастиц определяли визуально по морфологии выросших колоний (в сравнении с контролем).

Для изучения тест-культуры грибов и актиномицетов *Trichoderma koningii* использовали среду Чапека. Так как грибы растут в кислой среде, питательный агар Чапека подкисляли 1 Н НСl до рН= 4,0. Посевы инкубируют в термостате при температуре +25 °С в течении 5-10 дней.

Учет результатов производят путем подсчета выросших колоний в точках посева. Процент пророста (Р) высчитывается как количество образовавшихся колоний к количеству посевов. Токсичность определяется по формуле: $T = 100 - P$. Этим методом устанавливается абсолютная токсичность, когда на чашках не вырастает ни одна колония; отсутствие токсичности – на местах всех посевов вырастают колонии и различная степень токсичности – когда прорастает только часть засеянных точек. Кроме того, оценку степени чувствительности грибов и актиномицетов к присутствию в среде наночастиц определяли визуально по морфологии выросших колоний (в сравнении с контролем).

2.2. Опыт по влиянию наночастиц ZnO и Pt на биологическую активность почв

Оценка влияния наноматериалов на интенсивность биохимических процессов почвы включает изучение биологической активности почвы. Основными интегральными показателями биологической активности почвы, важными для почв сельскохозяйственного назначения, являются: общая микробная численность (ОМЧ), динамика азота и нитратов в почве (азотфиксация, нитрификация). Микроорганизмы резко реагируют на различные изменения в окружающей среде, являясь хорошими индикаторами. Так как микроорганизмы играют важную роль в геологических,

гидрологических и экологических циклах, то и любое изменение в структуре микробного сообщества потенциально может влиять на окружающую среду.

Азотфиксация – это способность микроорганизмов усваивать молекулярный азот. Этим свойством обладают многие микроорганизмы, свободно живущие в почве. Виды *Azotobacter* относятся к числу наиболее активных азотфиксаторов.

Нитрификация – окисление аммиака до азотной кислоты, в процессе которого микроорганизмы получают энергию для своей жизнедеятельности. Микроскопически микроорганизмы - нитрификаторы не идентифицируются, а обнаруживаются по изменениям, производимым ими в питательных средах. Для обнаружения нитрификаторов в почве используют среду Виноградского. Нитриты обнаруживаются по красному окрашиванию с испытуемым раствором реактива Грисса (уксуснокислый раствор смеси сульфаниловой кислоты с α -нафтиламином).

В данной методике не используются тест-микроорганизмы. Проводится учет сапрофитных, нитрифицирующих бактерий и азотобактера в почве, обработанной растворами наноматериалов.

Для определения численности микроорганизмов в почве проводят высев методом Коха на мясо-пептонный агар (МПА) или его аналоги. МПА – богатая питательными веществами среда, на которой развиваются микроорганизмы различных систематических и физиологических групп. Посев делают из почвенной суспензии разведений $1:10^4$, $1:10^5$, $1:10^6$. Объем посевного материала – 0,1 мл. Каждое разведение высевают в трехкратной повторности. Инкубируют посевы в течении 3 дней в термостате при 28 °С.

Для обнаружения азотобактера методом почвенных комочков навеску почвы (60—100 г) увлажняют стерильной водопроводной водой до пастообразного состояния и микробиологической петлей или иглой раскладывают комочки правильными рядами (50 комочков на каждую чашку Петри) на среду Эшби следующего состава (г/л): K_2HPO_4 - 0,2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,2; NaCl - 0,2; KH_2PO_4 - 0,1; $CaCO_3$ - 5,0; маннит - 20,0; агар - 20,0; вода дистиллированная. На каждый образец почвы используют три чашки Петри, которые помещают в термостат во влажной камере. Через 4—6 суток подсчитывают количество комочков почвы, обросших слизистыми колониями азотобактера (обязателен микроскопический контроль), и вычисляют процент обрастания.

Для обнаружения нитрифицирующих организмов в почве используют метод накопительной культуры. Опыт проводят на среде Виноградского следующего состава (г/л): $(NH_4)_2SO_4$ – 2,0; K_2HPO_4 – 1,0; $MgSO_4$ – 0,5; $FeSO_4$ – 0,4; NaCl – 2,0, вода водопроводная. Разливают среду в пробирки, высота слоя среды должна быть не более 1,5–2,0 см. В каждую пробирку вносят небольшое количество мела. Среду стерилизуют,

затем засевают почвенной суспензией различных разведений ($1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$, $1:10^6$) по 4 пробирки каждого разведения. Контролем служат пробирки со средой без внесения почвенной суспензии. Инкубация продолжается 14 дней в термостате при 28 °С.

После инкубирования посевов на чашках Петри проводят подсчет выросших колоний и рассчитывают наиболее вероятное число микроорганизмов в 1 г абсолютно сухой почвы при $P_{0,95}$.

Численность нитрифицирующих бактерий в почве определяют методом предельных разведений. Наиболее вероятное количество клеток в единице объема определяют по таблицам Мак-Креди.

Угнетение азотфиксации определяют по проценту комочков, давших рост азотобактера, в сравнении с контролем.

Согласно критериям отнесения отходов к классам опасности, предложенным в "Санитарных правилах по определению класса опасности токсичных отходов производства и потребления. СП 2.1.7.1386-03, определяют четыре типа опасности (чрезвычайно опасные, высоко опасные, умеренно опасные и мало опасные). К микробиологическим критериям, согласно данной методике, относятся проценты подавления роста азотобактера и процессов биологической активности почв. Так, почву можно считать "незагрязненной" по показателям биологической активности при изменениях в микробиологических показателях не более 50 % по сравнению с такими же для контрольных, принятых в качестве чистых незагрязненных почв (таблица 1).

Таблица 1 - Критерии отнесения коллоидов к классам опасности (по СП 2.1.7.1386-03)

	Чрезвычайно опасные	Высоко опасные	Умеренно опасные	Мало опасные
Азотобактер (% подавления)	>90	>75-90	>50-75	25-50
Процессы биологической активности почвы (% подавления)	>75	75-50	50-25	25-5

Также была проведена работа по определению влияние на почвенные микроорганизмы наночастиц, вносимых непосредственно в почву при возделывании сельскохозяйственных культур – огурцов (в условиях теплицы) и пшеницы (делянки на поле). Здесь также проводится учет сапрофитных, нитрифицирующих и денитрифицирующих бактерий в почве, обработанной растворами наноматериалов.

Для микробиологического анализа пробы почвы отбирали стерильными инструментами (нож или шпатель), которые предварительно простерилизовали в сушильном шкафу при температуре 160 °С 120 минут, и помещали в стерильную тару: почвенные кюветы, пластиковые банки или бумажные пакеты.

На каждом экспериментальном участке отбирали 2 варианта пробы: общую почву (из междурядий) и ризосферную (методом Красильникова). Точечные пробы из междурядий отбирали ножом или шпателем в пяти точках методом «конверта» с глубины 1,0 - 5,0 см. Объединённую пробу составляли путем смешивания точечных проб, отобранных на одной пробной площадке. Объединённую пробу необходимого для анализа объёма (150-200 г) помещали в стерильную посуду, маркировали. Объединённую пробу ризосферной почвы также составляли путем смешивания точечных проб (из-под корней разных растений).

Для определения численности микроорганизмов в почве проводили прямой подсчет клеток, содержащихся в почвенной суспензии, приготовленной из образцов почвы. Определение количества жизнеспособных клеток проводили с использованием набора флуоресцентных красителей LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits L-7012 (Molecular Probes, Eugene, Oreg.). Комплект содержит краситель Syto 9, окрашивающий живые клетки, и иодид пропидия (PI), окрашивающий мертвые клетки. Живые клетки (с неповрежденной мембраной) проницаемы для обоих красителей. При промывании клеток препарата краситель Syto 9 остается в клетках с ненарушенными мембранами, окрашивая их в зеленый цвет, и вымывается из клеток с поврежденными мембранами, тогда как PI остается в клетках и с поврежденными мембранами и окрашивает их в красный цвет. Окрашивание почвенной суспензии проводили согласно протоколу. Клетки подсчитывали с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM-710, позволяющего с хорошим разрешением идентифицировать живые бактериальные клетки.

Для определения численности нитрифицирующих и денитрифицирующих микроорганизмов в почве использовали метод предельных разведений. Микроорганизмы – нитрификаторы и денитрификаторы обнаруживаются по изменениям, производимым ими в питательных средах.

Для обнаружения нитрификаторов в исследуемых почвах использовали среду Виноградского. Для обнаружения продуктов нитрификации проводили реакцию с реактивом Грисса (уксуснокислый раствор смеси сульфаниловой кислоты с α -нафтиламином), который при наличии в среде нитритов образует красную окраску. Опыт проводили на элективной минеральной среде Виноградского следующего состава (г/л):

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 2,0$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 1,0$; $\text{MgSO}_4 - 0,5$; $\text{FeSO}_4 - 0,4$; $\text{NaCl} - 2,0$, вода водопроводная. Единственным источником углерода в среде является двуокись углерода, которая входит в состав мела и есть в воздухе. Питательную среду разливали в пробирки, высота слоя среды должна быть не более 1,5 -2,0 см. В каждую пробирку вносили небольшое количество мела. Среду стерилизовали, затем засеивали почвенной суспензией различных разведений ($1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$, $1:10^6$) по 4 пробирки каждого разведения. Контролем служили пробирки со средой без внесения почвенной суспензии. Инкубация продолжалась 10 дней в термостате при 28 °С. О развитии нитрификаторов судили по появлению в среде нитритов, которые определяли по качественной реакции с реактивом Грисса. Появление красного окрашивания при добавлении к среде реактива Грисса свидетельствует о присутствии нитритов.

Для обнаружения денитрифицирующих микроорганизмов в почве использовали простую среду для денитрификаторов следующего состава (г/л): $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0,5$; $\text{MgSO}_4 \cdot (7\text{H}_2\text{O}) - 0,2$; $\text{KNO}_3 - 2,0$; сегнетова соль (К-На виннокислый) - 20,0; вода дистиллированная. Среду разливали в высокие пробирки, не более чем на 2/3 их высоты, в пробирки предварительно помещали поплавки для визуального определения признаков денитрификации – газовыделения. Среду стерилизовали, затем засеивали почвенной суспензией различных разведений ($1:10^4$, $1:10^5$, $1:10^6$, $1:10^7$) по 4 пробирки каждого разведения. Контролем служили пробирки со средой без внесения почвенной суспензии. Инкубация продолжалась 14 дней в термостате при 28 °С. Кроме газообразования о развитии денитрификаторов судили по помутнению среды.

Количество живых клеток в почвенной суспензии определяли по формуле (кл/мл):

$$M = (A \cdot S / V \cdot s) \cdot n, \text{ где}$$

M – число живых клеток в 1 мл почвенной суспензии;

A – среднее число клеток в поле зрения;

S – площадь мазка (в мкм^2);

s – площадь поля зрения (в мкм^2);

V – объем нанесенной суспензии (в мл);

n – разведение.

Для получения почвенной суспензии 10 г почвы разводили в 90 мл стерильной воды, это учитывали при пересчете количества живых клеток в 1 г почвы.

Численность нитрифицирующих и денитрифицирующих бактерий в почве определяли методом предельных разведений, наиболее вероятное количество клеток бактерий в 1 грамме почвы определяли по таблицам Мак-Креди.

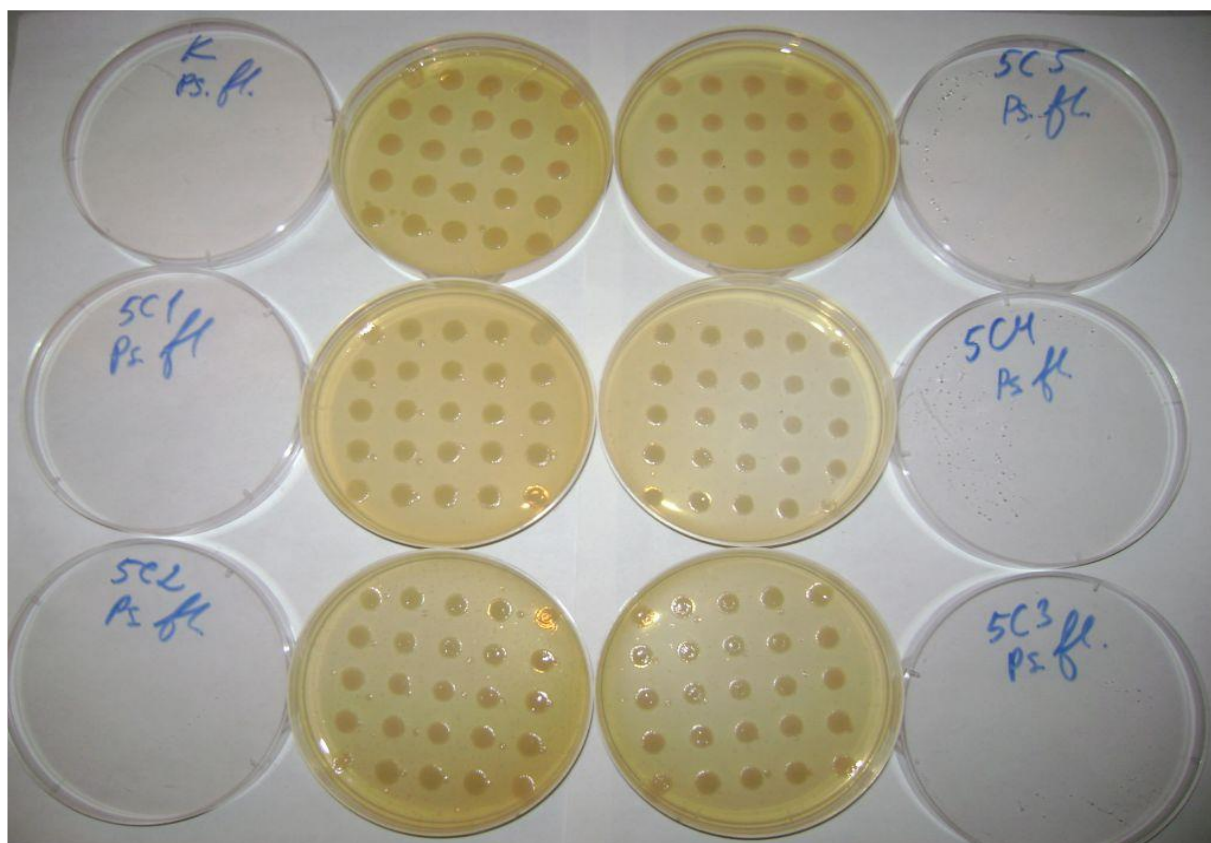
Согласно критериям отнесения отходов к классам опасности, предложенным в "Санитарных правилах по определению класса опасности токсичных отходов производства и потребления. СП 2.1.7.1386-03", определяют четыре типа опасности (чрезвычайно опасные, высоко опасные, умеренно опасные и мало опасные). К микробиологическим критериям, согласно данной методике, относятся проценты подавления процессов биологической активности почв. Так, почву можно считать "незагрязненной" по показателям биологической активности при изменениях в микробиологических показателях не более 50 % по сравнению с такими же для контрольных, принятых в качестве чистых незагрязненных почв (Таблица 1).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Оценка чувствительности *Pseudomonas fluorescens* и *Trichoderma koningii* к присутствию в среде наночастиц TiO_2

Все исследуемые тест-культуры проверили на чувствительность к присутствию в питательной среде наночастиц диоксида титана. Всего было проверено 5 разведений суспензии наночастиц, начиная от 1 мг/л до 0,0001 мг/л.

Все исследуемые тест-культуры бактерий проросли в местах отпечатков во всех испытываемых тест-системах. При просмотре и визуальной оценке проросших колоний тест-культуры *Pseudomonas fluorescens* было отмечено морфологическое отличие бактериальных колоний в опытных чашках Петри от контрольных посевов (рисунок 1).



К- контроль без внесения суспензии наночастиц TiO_2 ; 5C1 – среда с добавлением суспензии наночастиц TiO_2 в концентрации 1 мг/л; 5C2 – среда с добавлением суспензии наночастиц TiO_2 в концентрации 0,1 мг/л; 5C3 – среда с добавлением суспензии наночастиц TiO_2 в концентрации 0,01 мг/л; 5C4 – среда с добавлением суспензии наночастиц TiO_2 в концентрации 0,001 мг/л; 5C5 – среда с добавлением суспензии наночастиц TiO_2 в концентрации 0,0001 мг/л).

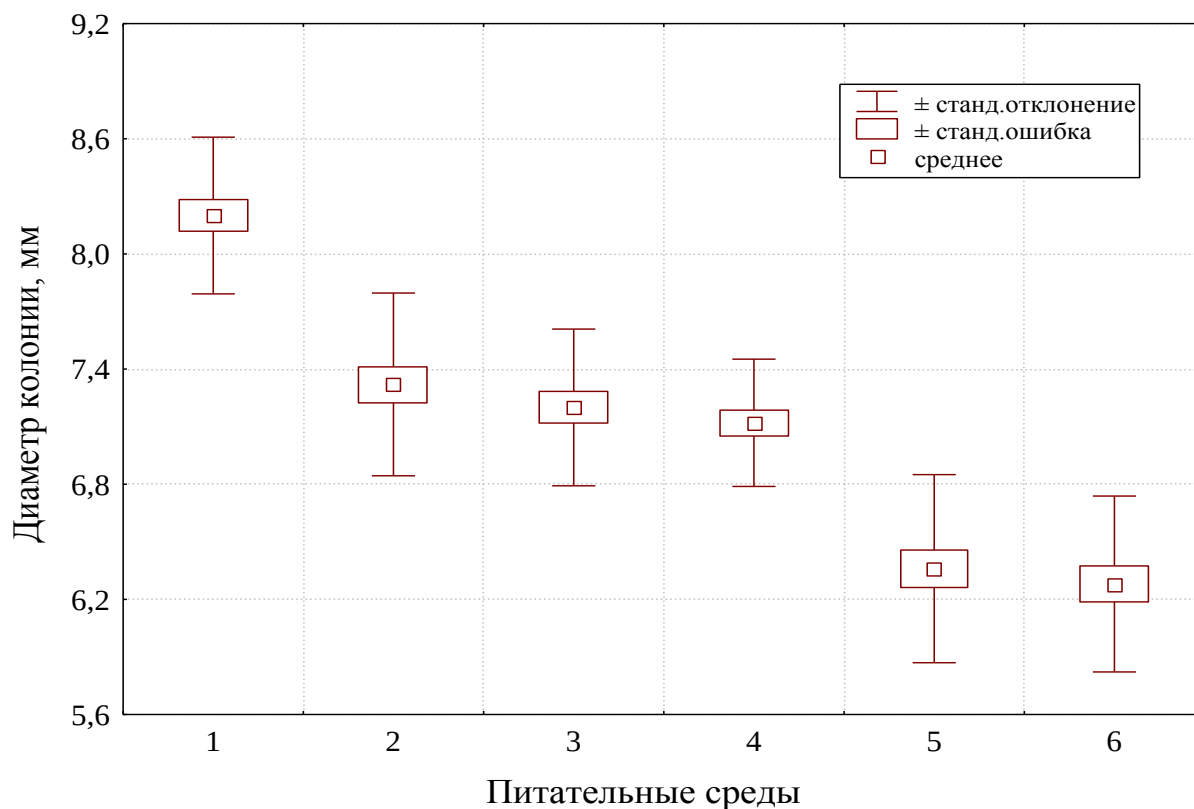
Рисунок 1 – Морфология колоний тест-культуры *Pseudomonas fluorescens* при росте на средах с внесением суспензии наночастиц TiO_2

В таблице 2 представлены результаты посевов тест-культур микроорганизмов *Pseudomonas fluorescens* и *Trichoderma koningii* на тест-системы с внесением суспензии наночастиц оксида титана

Таблица 2– Результаты посевов тест-культур микроорганизмов на тест-системы с внесением суспензии наночастиц оксида титана

Тест-культура	№ пробы *	Время тестирования, час	Среднее количество точек пророста в чашке Петри (n=3)	Отклонение от контроля, %	Морфологические изменения колоний (по сравнению с контролем)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	контроль	72	25	0	
	1	72	25	0	+
	2	72	25	0	+
	3	72	25	0	+
	4	72	25	0	+
	5	72	25	0	+
<i>Trichoderma koningii</i>	контроль	240	25	0	
	1	240	25	0	+
	2	240	25	0	+
	3	240	25	0	+
	4	240	25	0	+
	5	240	25	0	+
Примечание - контроль - контроль без внесения суспензии наночастиц TiO ₂ ; 1 – среда с добавлением суспензии наночастиц TiO ₂ в концентрации 1 мг/л; 2 – среда с добавлением суспензии наночастиц TiO ₂ в концентрации 0,1 мг/л; 3 – среда с добавлением суспензии наночастиц TiO ₂ в концентрации 0,01 мг/л; 4 – среда с добавлением суспензии наночастиц TiO ₂ в концентрации 0,001 мг/л; 5 – среда с добавлением суспензии наночастиц TiO ₂ в концентрации 0,0001 мг/л.					

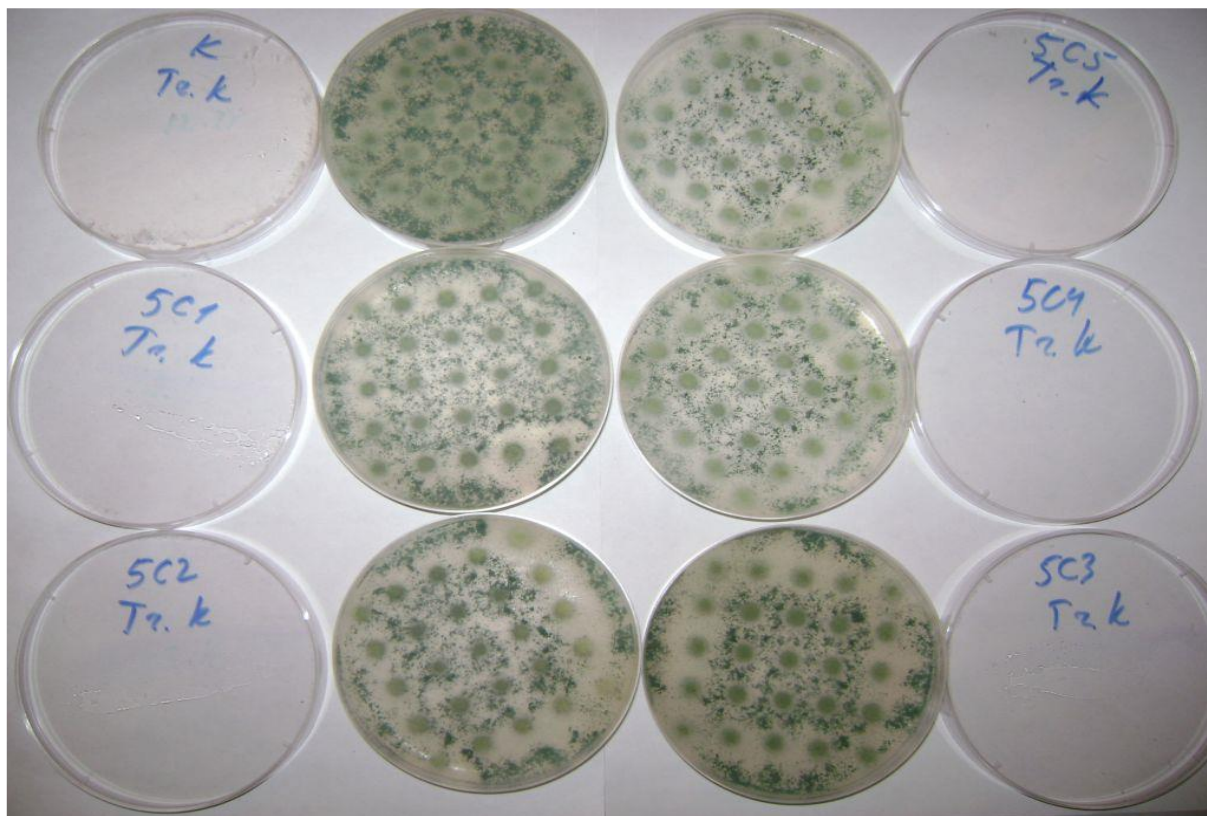
В контроле колонии бежевые, полупрозрачные, с валиком по краю колонии, в опытных чашках колонии с молочным оттенком, край колонии истонченный, без валика. Также есть существенное различие по диаметру колоний. Измерение диаметра колоний в опытных и контрольных чашках показало достоверное различие (рисунок 2). Присутствие наночастиц диоксида кремния простимулировало рост бактерий *Pseudomonas fluorescens*.



1- контроль без внесения суспензии наночастиц TiO_2 ; 2 – среда с добавлением суспензии наночастиц TiO_2 в концентрации 1 мг/л; 3 – среда с добавлением суспензии наночастиц TiO_2 в концентрации 0,1 мг/л; 4 – среда с добавлением суспензии наночастиц TiO_2 в концентрации 0,01 мг/л; 5 – среда с добавлением суспензии наночастиц TiO_2 в концентрации 0,001 мг/л; 6 – среда с добавлением суспензии наночастиц TiO_2 в концентрации 0,0001 мг/л).

Рисунок 2 – Чувствительность тест-культуры *Pseudomonas fluorescens* к присутствию в среде наночастиц TiO_2

Посевы тест-культур микроскопических грибов *Trichoderma koningii* проросли в исследуемых тест-системах. При визуальном просмотре проросших колоний тест-культур было отмечено менее интенсивное конидиальное спороношение по сравнению с контролем (рисунок 3).



K- контроль без внесения суспензии наночастиц TiO_2 ; *5C1* – среда с добавлением суспензии наночастиц TiO_2 в концентрации 1 мг/л; *5C2* – среда с добавлением суспензии наночастиц TiO_2 в концентрации 0,1 мг/л; *5C3* – среда с добавлением суспензии наночастиц TiO_2 в концентрации 0,01 мг/л; *5C4* – среда с добавлением суспензии наночастиц TiO_2 в концентрации 0,001 мг/л; *5C5* – среда с добавлением суспензии наночастиц TiO_2 в концентрации 0,0001 мг/л.

Рисунок 3 - Конидиальное спороношение тест-культуры *Trichoderma koningii* при присутствии в среде суспензии наночастиц TiO_2

3.2. Изучение влияния наночастиц ZnO на биологическую активность почв

Почвенная микробиота остро реагирует на изменения в окружающей среде. В первую очередь происходят изменения численности микроорганизмов в почве, это может быть и подавление и стимуляция численности микроорганизмов, что ведет к нарушению естественного баланса микробного сообщества почвы. В наших исследованиях, в модельном опыте, почву (гумусовый горизонт серой и темно-серой почв) проливали водной дисперсной системой наночастиц в концентрации 20 мг/л. Средний размер nano ZnO Δ_{50} = 20 нм. В полевом опыте (почва, засеянная огурцами и пшеницей), почву проливали водной дисперсной системой наночастиц оксида цинка в концентрации 50 мг/л. Средний размер nano ZnO Δ_{50} = 5 нм.

В лабораторных условиях определение общей микробной численности в изучаемых образцах почв показало, что сразу после обработки почв водной дисперсией наночастиц ZnO происходит снижение количества колониеобразующих единиц (КОЕ) по сравнению с контролем на 45 - 50 % в зависимости от типа почвы. Образцы почвы (массой 200 г) хранились в пакетах при комнатной температуре. Начальные значения массовой влажности контрольный и опытных образцов почвы была примерно одинаковая: для серой почвы – контроль - 160 %, почва, обработанная НЧ ZnO, - 151,7 %, для темно-серой – 95,6 % и 93,8 % соответственно. Через 14 дней был проведен повторный посев образцов. В контрольной почве происходит снижение количества КОЕ, а в почве, обработанной суспензией наночастиц оксида цинка, отмечено увеличение количества КОЕ для изученных образцов почв (таблица 3).

Таблица 3 – Общее микробное число в образцах почвы, обработанной суспензией наночастиц оксида цинка

Образец	Количество микроорганизмов, млн КОЕ/г абс.сухой почвы			
	Серая лесная почва		Темно-серая лесная почва	
	0 дней	14 дней	0 дней	14 дней
Контроль (нативная почва)	70,2 ± 0,006	29,9 ± 0,004	107,8 ± 0,007	31,3 ± 0,004
Почва + наночастицы ZnO	40,3 ± 0,004	52,9 ± 0,005	58,8 ± 0,005	84,4 ± 0,006

В таблице 4 представлены данные по содержанию споровых и пигментных бактерий в контрольных и опытных образцах. Бациллы ведут себя по-разному в зависимости от типа почвы. Так, в серой почве, обработанной наночастицами оксида цинка, при посеве в день обработки почвы, количество споровых грамположительных бактерий на 18 % больше, чем в контрольном образце, а через 2 недели хранения почвы отмечено снижение количества споровых КОЕ в опытном образце и значительное увеличение их в контроле.

В темно-серой почве происходит снижение количества бацилл в день обработки почвы НЧ оксида цинка в сравнении с контролем на 24,0 %, но после хранения в опытном образце отмечено увеличение бацилл более чем в 2 раза от первоначального значения (в

контроле увеличение незначительное) и по сравнению с контролем количество бактерий увеличивается на 36,5 %.

Таблица 4 – Споровые и пигментные бактерии образцах почвы, обработанной суспензией наночастиц оксида цинка

Образец	Группы микроорганизмов, % от КОЕ			
	Споровые		Пигментные	
	0 дней	14 дней	0 дней	14 дней
	Серая лесная почва			
Контроль (нативная почва)	12,34	26,08	28,39	8,69
Почва + наночастицы ZnO	14,58	9,52	4,17	0
	Темно-серая лесная почва			
Контроль (нативная почва)	18,79	21,88	19,39	6,25
Почва + наночастицы ZnO	14,28	29,88	8,79	1,15

Показано снижение пигментных форм бактерий под влиянием наночастиц оксида цинка. Количество пигментных бактерий в опытных образцах серой и темно-серой почв снижается на 85 и 55 % соответственно. После хранения снижение КОЕ происходит и в контроле и в опытных образцах - в серой лесной почве пигментные бактерии не высевались, а в темно-серой происходит снижение их количества по сравнению с контролем на 82 %. Пигменты защищают бактерии от воздействия света и ультрафиолетового облучения. Существует тесная корреляция между пигментацией и образованием вторичных метаболитов, которые могут играть важную роль в жизни почвенных организмов. Такое влияние наночастиц оксида цинка на пигментные бактерии ведет к нарушению почвенного микробоценоза.

Активность азотфиксации используется для ранней диагностики загрязненности почв токсическими веществами. Этот показатель может быть информативен при оценке реакции микробоценоза почвы на внесение растворов наноматериалов. Для обнаружения в почве азотобактера используют метод «комочков обрастания» Виноградского. Данные,

представленные в таблице 5, показывают подавление роста азотобактера в образцах почв, исследованных в день обработки и после 14 дней хранения. Если в первый день зафиксированное подавление роста азотобактера на 35,23 % в серой почве и на 18,75 % в темно-серой, что согласно СП 2.1.7.1386-03, считается малоопасным, то полное угнетение этой группы микроорганизмов после хранения почвы относят ее к классу чрезвычайно опасных. В контрольных образцах азотобактер присутствует.

Таблица 5 – Процент подавления роста азотобактера почв, обработанной суспензией наночастиц оксида цинка

Образец	Процент подавления роста азотобактера в сравнении с контролем	Класс опасности (по СП 2.1.7.1386-03)
0 дней		
Серая	35,23	Мало опасные
Темно-серая	18,75	Мало опасные
14 дней		
Серая	100	Чрезвычайно опасные
Темно-серая	100	Чрезвычайно опасные

В образцах почвы, обработанной суспензией наночастиц оксида цинка, изучены процессы нитрификации. В изученных почвах, обработанной наночастицами оксида цинка, в первый день наблюдения отмечено снижение количества клеток нитрифицирующих микроорганизмов на 46 % в сравнении с контролем. Через 14 дней хранения образцов почвы был повторен посев на определение численности нитрификаторов (таблица 6). Как видно из таблицы, количество нитрификаторов упало в контрольных образцах, в серой почве нитрификаторы выявлены не были, а в темно-серой почве количество нитрификаторов соответствует контролю. Таким образом, в образцах почвы, обработанной НЧ оксида цинка отмечено снижение количества нитрифицирующих

бактерий в сравнении с контролем более чем в 2 раза, что согласно СП 2.1.7.1386-03 относится к высоко опасному влиянию.

В настоящее время существуют противоречивые данные по антибактериальной активности наноZnO. Многими авторами подчеркивается сильная ее зависимость от таких факторов, как размер наночастиц, концентрация наночастиц, строение клеточной мембраны (грамположительные и грамотрицательные бактерии). В работе Collins с соавторами (2012) при анализе микробных сообществ почвы с использованием культурно-зависимых (Biolog escoplates) и независимых методов (FAME анализ и пиросеквенирование) четко указано, что наночастицы ZnO изменили структуру микробного сообщества. Показано снижение доли грамположительных бактерий, что отмечено и в наших исследованиях для серой лесной почвы. В другой работе показано снижение роста бактерий почвы под влиянием наноZnO, но токсичность наноZnO ниже, чем у цинка, вносимого в почву в виде раствора ZnSO₄.

Таблица 6 – Нитрификация в почвах, обработанных наночастицами оксида цинка

Образец	Наиболее вероятное число клеток микроорганизмов в 1 г почвы	Процент подавления нитрификации в сравнении с контролем	Класс опасности (по СП 2.1.7.1386-03)
0 дней			
Контроль (серая почва)	2,5*10 ⁵		
Серая почва + наночастицы ZnO	1,15*10 ⁵	54	Высоко опасные
Контроль (темно-серая почва)	2,5*10 ⁵		
Темно-серая почва + наночастицы ZnO	1,15*10 ⁵	54	Высоко опасные
14 дней			
Контроль (серая почва)	6,0*10 ³		
Серая почва + наночастицы ZnO	0	100	Чрезвычайно опасные
Контроль (темно-серая почва)	6,0*10 ³		

Темно-серая почва + наночастицы ZnO	$6,0 \cdot 10^3$	0	Не опасные
--	------------------	---	------------

Наши исследования показали снижение ОМЧ в первый день обработки почвы суспензией nanoZnO , снижение доли споровых и пигментных бактерий, снижение количества азотобактера и нитрификаторов.

В естественных условиях определение общей микробной численности (ОМЧ) прямым подсчетом клеток методом конфокальной микроскопии после окрашивания набором Live/Dead в образцах почв, обработанных НЧ оксида цинка, показало, что в почвах в опыте с огурцами отмечено снижение ОМЧ (Таблица 7). Причем для почвы междурядий (общая) отмечено снижение почти в 2 раза, в то время как для ризосферной оно незначительное (около 5 %).

ОМЧ в почвах в опыте с пшеницей также показало снижение в обработанных НЧ ZnO по сравнению с необработанными почвами. В обоих вариантах (почва междурядий и ризосферная) зафиксировано снижение почти в 2 раза (Таблица 7).

Таблица 7 – Общее микробное число в почве, обработанной водной дисперсной системой наночастиц оксида цинка

Образец	Количество микроорганизмов, кл/г	
	Возделываемая культура	
	Огурцы	Пшеница
Контроль (нативная общая почва)	$11,1 \cdot 10^9$	$4,1 \cdot 10^9$
Почва (общая) + наночастицы ZnO	$6,5 \cdot 10^9$	$2,2 \cdot 10^9$
Контроль (нативная ризосферная почва)	$5,05 \cdot 10^9$	$1,3 \cdot 10^9$
Почва (ризосферная) + наночастицы ZnO	$4,8 \cdot 10^9$	$0,7 \cdot 10^9$

Для азотного питания растений очень важны группы бактерий, обеспечивающих доступность азота для растений. В таблицах 8 и 9 представлены данные по количеству микроорганизмов – нитрификаторов и денитрификаторов в образцах почвы, засеянных огурцами и пшеницей соответственно.

Таблица 8 – Нитрификация в почве, обработанной водной дисперсной системой наночастиц оксида цинка

Образец	Наиболее вероятное число клеток микроорганизмов в 1 г почвы	Процент подавления/стимуляции нитрификации в сравнении с контролем	Класс опасности (по СП 2.1.7.1386-03)
Огурцы			
Контроль (нативная почва)	$2,5 \cdot 10^3$		
Почва (общая) + наночастицы ZnO	$2,5 \cdot 10^3$	0	Не опасные
Контроль (нативная ризосферная почва)	$2,5 \cdot 10^3$		
Почва (ризосферная) + наночастицы ZnO	$2,5 \cdot 10^3$	0	Не опасные
Пшеница			
Контроль (нативная почва)	$2,0 \cdot 10^2$		
Почва (общая) + наночастицы ZnO	$2,0 \cdot 10^2$	0	Не опасные
Контроль (нативная ризосферная почва)	$6,0 \cdot 10^3$		
Почва (ризосферная) + наночастицы ZnO	$7,0 \cdot 10^5$	> 100	Чрезвычайно опасные

Обработка почв в опытах с огурцами и пшеницей водной дисперсной системой наночастиц оксида цинка, повлияло на нитрифицирующие бактерии ризосферы пшеницы, увеличивая их количество на 2 порядка. Во всех вариантах остальных опыта количество нитрифицирующих бактерий осталось на уровне контроля.

Таблица 9 – Денитрификация в почве, обработанной водной дисперсной системой наночастиц оксида цинка

Образец	Наиболее вероятное число клеток микроорганизмов в 1 г почвы	Процент подавления/стимуляции денитрификации в сравнении с контролем	Класс опасности (по СП 2.1.7.1386-03)
Огурцы			
Контроль (нативная почва)	$2,5 \cdot 10^4$		
Почва (общая) + наночастицы ZnO	$6,0 \cdot 10^4$	> 100	Чрезвычайно опасные
Контроль (нативная ризосферная почва)	$5,0 \cdot 10^4$		
Почва (ризосферная) + наночастицы ZnO	$2,5 \cdot 10^5$	> 100	Чрезвычайно опасные
Пшеница			
Контроль (нативная почва)	$5,0 \cdot 10^4$		
Почва (общая) + наночастицы ZnO	$1,3 \cdot 10^5$	> 100	Чрезвычайно опасные
Контроль (нативная ризосферная почва)	$2,5 \cdot 10^6$		
Почва (ризосферная) + наночастицы ZnO	$7,0 \cdot 10^6$	> 100	Чрезвычайно опасные

Обработка почв водной дисперсной системой наночастиц ZnO повлияла на количество денитрифицирующих бактерий, увеличивая их во всех вариантах. Согласно СП 2.1.7.1386-03 такое отличие от контроля является чрезвычайно опасным.

3.3. Изучение влияния наночастиц Pt на биологическую активность почв

В данных исследованиях, в модельном опыте, почву (гумусовый горизонт серой лесной среднесуглинистой и темно-серой лесной среднесуглинистой почв) проливали водной дисперсной системой наночастиц платины в концентрации 10 мг/л. Содержание наночастиц платины в обработанной почве составило 1 мг/кг в серой почве и 1,34 мг/кг в темно-серой почве. Средний размер наноPt Δ_{50} = 6 нм. В полевых, естественных условиях

почву, засеянную огурцами и пшеницей, проливали водной дисперсной системой наночастиц платины в концентрации 50 мг/л. Средний размер нано Pt $\Delta_{50} = 5$ нм.

В лабораторных условиях была определена общая микробная численность в изучаемых образцах почв. Показано, что микрофлора серой и темно-серой почв по-разному реагирует на присутствие наночастиц платины. Так, после обработки серой почвы водной дисперсией наночастиц платины происходит снижение количества колониеобразующих единиц (КОЕ) (Таблица 10) по сравнению с контролем на 55,6 %. А в темно-серой почве наоборот отмечено увеличение количества КОЕ почти в 5 раз.

Таблица 10 – Общее микробное число в образцах почвы, обработанной суспензией наночастиц платины

Образец	Количество микроорганизмов, млн КОЕ/г абс.сухой почвы			
	Серая		Темно-серая	
	0 дней	14 дней	0 дней	14 дней
Контроль (нативная почва)	70,2 ± 0,006	29,9 ± 0,004	107,8 ± 0,007	31,3 ± 0,004
Почва + наночастицы Pt	31,2 ± 0,004	46,7 ± 0,005	506,2 ± 0,015	56,6 ± 0,005

Через 14 дней хранения образцов почвы при комнатных условиях был проведен повторный посев образцов. В контрольной почве происходит снижение количества КОЕ на 57,4 % в серой почве и на 71,0 % в темно-серой почве (таблица 10). В опытных образцах почвы, обработанной суспензией наночастиц платины, отмечено увеличение количества КОЕ для серой почвы в 1,5 раза и численность микроорганизмов стала выше, чем в контроле. В темно-серой почве в опытном образце отмечено снижение численности в 10 раз по сравнению с измерениями в первый день обработки почвы, но общая микробная численность все равно выше, чем в контроле.

В Таблице 11 представлены данные по содержанию спорных и пигментных бактерий в контрольных и опытных образцах почвы. В опытных образцах при посеве в день обработки почвы, отмечается рост спорных форм на 52,3 % в серой почве и незначительный рост (на 4,9 %) в темно-серой почве по сравнению с контрольными образцами. Через 2 недели хранения почвы зафиксировано значительное увеличение (в 3 раза) количества спорных КОЕ в контроле для серой почвы и небольшое увеличение (на 14,1 %) для темно-серой почвы. В опытных образцах тоже отмечено увеличение

количества споровых бактерий на 16,6 % в серой и на 3,0 % в темно-серой почве, но их количество стало ниже, чем в контроле.

Таблица 11 - Споровые и пигментные бактерии образцах почвы, обработанной суспензией наночастиц платины

Образец	Группы микроорганизмов, % от КОЕ			
	Споровые		Пигментные	
	0 дней	14 дней	0 дней	14 дней
Серая				
Контроль (нативная почва)	8,64	26,08	28,39	8,69
Почва + наночастицы Pt	13,16	15,78	21,05	0
Темно-серая				
Контроль (нативная почва)	18,79	21,88	19,39	6,25
Почва + наночастицы Pt	19,72	20,34	2,65	3,39

Количество пигментных бактерий в опытных образцах серой и темно-серой почв снижается на 25,8 и 86,3 % соответственно. После хранения снижение КОЕ происходит и в контроле и в опытных образцах - в серой почве пигментные бактерии не высевались, а в темно-серой происходит незначительное увеличение их количества, но по сравнению с контролем их количество меньше на 45,8 %.

Данные, представленные в таблице 12, показывают подавление роста азотобактера в образцах почв, исследованных в день обработки и после 14 дней хранения. При изучении роста азотобактера в опытных образцах почв в первый день обработки их водной дисперсией наночастиц платины отмечено значительное подавление роста азотобактера более, чем на 90 % и зафиксировано полное угнетение этой группы микроорганизмов после хранения образцов почвы. Согласно СП 2.1.7.1386-03 такое влияние наночастиц оксида цинка на группу азотфиксаторов относят почву, обработанную наноZnO, к классу чрезвычайно опасных. В контрольных образцах азотобактер присутствует.

Таблица 12 – Процент подавления роста азотобактера почв, обработанной суспензией наночастиц платины

Образец	Процент подавления роста азотобактера в сравнении с контролем	Класс опасности (по СП 2.1.7.1386-03)
0 дней		
Серая	92,53	Чрезвычайно опасные
Темно-серая	96,20	Чрезвычайно опасные
14 дней		
Серая	100	Чрезвычайно опасные
Темно-серая	100	Чрезвычайно опасные

В образцах почвы, обработанной суспензией наночастиц платины, изучены процессы нитрификации. В изученных почвах, обработанной наночастицами платины, в первый день наблюдения количество нитрификаторов такое же, как и в контроле. Через 14 дней хранения образцов почвы был повторен посев на определение численности нитрификаторов (таблица 13). Как видно из таблицы, количество нитрификаторов упало в контрольных образцах, в серой почве нитрификаторов меньше на 90 % по сравнению с контролем, а в темно-серой почве количество нитрификаторов больше в 3 раза.

В настоящее время данных по влиянию наночастиц платины на почвенное микробное сообщество практически нет. Имеются сведения о влиянии на чистые культуры бактерий, в основном, на патогенные микроорганизмы. В некоторых работах показана антимикробная активность наночастиц платины. В работе Konieczny с соавторами указывается на токсичность наночастиц платины для *Escherichia coli* и отсутствие токсического эффекта для *Staphylococcus aureus*. Gopal с соавторами изучал воздействие наночастиц платины разных размеров. Ими отмечено, что токсическим эффектом обладают наночастицы платины малых размеров (1-3 нм), а более крупные частицы (6-18 нм) наоборот оказывают стимулирующий рост бактериальной культуры эффект.

Таблица 13 – Нитрификация в почвах, обработанных наночастицами платины

Образец	Наиболее вероятное число клеток микроорганизмов в 1 г почвы	Процент подавления/стимуляции нитрификации в сравнении с контролем	Класс опасности (по СП 2.1.7.1386-03)
0 дней			
Контроль (серая почва)	$2,5 \cdot 10^5$		
Серая почва + наночастицы Pt	$2,5 \cdot 10^5$	0	Не опасные
Контроль (темно-серая почва)	$2,5 \cdot 10^5$		
Темно-серая почва + наночастицы Pt	$2,5 \cdot 10^5$	0	Не опасные
14 дней			
Контроль (серая почва)	$6,0 \cdot 10^3$		
Серая почва + наночастицы Pt	$0,6 \cdot 10^3$	90	Чрезвычайно опасные
Контроль (темно-серая почва)	$6,0 \cdot 10^3$		
Темно-серая почва + наночастицы Pt	$25 \cdot 10^3$	95,8	Чрезвычайно опасные

В наших исследованиях влияния наночастиц платины на микробное почвенное сообщество неоднозначно. На присутствие в среде НЧ Pt остро реагируют пигментные бактерии и азотобактер. Влияние на нитрифицирующие бактерии появляется после хранения образцов почвы. Причем в серой почве происходит снижение количества нитрификаторов по сравнению с контролем, а в темно-серой, наоборот, увеличение, что в обоих случаях ведет к нарушению баланса микрофлоры почвы и в конечном итоге к нарушениям почвенных процессов.

Неоднозначность влияния изученных наночастиц на различные типы почв можно объяснить разными физико-химическими характеристиками исследованных почвенных горизонтов. Темно-серая почва более плотная, тяжелая, с более низкой агрегатной порозностью (60 % против 89 % у серой почвы), с большим содержанием ила (16,5 % против 13,4 % у серой).

В основном работы по изучению антибактериальной активности проводятся на чистых культурах микроорганизмов. В некоторых работах показано изменение структуры микробного почвенного сообщества при попадании в почву наночастиц оксида цинка. Наши исследования показали снижение ОМЧ в первый день обработки почвы суспензией наноZnO, снижение доли споровых и пигментных бактерий, снижение количества азотобактера и нитрификаторов. Через 14 дней в обработанной почве возрастает ОМЧ по сравнению с контролем, наблюдается полное подавление азотфиксации. Влияние наноPt на микробное почвенное сообщество неоднозначно. На присутствие в среде НЧ Pt остро реагируют пигментные бактерии и азотобактер. Влияние на нитрифицирующие бактерии появляется после хранения образцов почвы. Причем в серой почве происходит снижение количества нитрификаторов по сравнению с контролем, а в темно-серой, наоборот, увеличение, что в обоих случаях ведет к изменению структуры микробного сообщества почвы и в конечном итоге к нарушениям почвенных процессов.

В естественных условиях, в образцах почв, обработанных водной дисперсной системой НЧ платины, определена общая микробная численность (ОМЧ) прямым подсчетом клеток методом конфокальной микроскопии после окрашивания набором Live/Dead. Снижение ОМЧ на 33 % по сравнению с контролем зафиксировано в обработанных НЧ почвах (междурядий и ризосферной) в опыте с огурцами в условиях теплицы (Таблица 14). В полевых условиях (выращивание пшеницы) показано незначительное увеличение ОМЧ для почвы междурядий на 11 %, и небольшое снижение ОМЧ ризосферной почвы на 8 %.

Таблица 14 – Общее микробное число в образцах почвы, обработанной водной дисперсной системой наночастиц платины

Образец	Количество микроорганизмов, кл/г	
	Возделываемая культура	
	Огурцы	Пшеница
Контроль (нативная общая почва)	11,1*10 ⁹	4,1*10 ⁹
Почва (общая) + наночастицы Pt	7,4*10 ⁹	4,6*10 ⁹
Контроль (нативная ризосферная почва)	5,05*10 ⁹	1,3*10 ⁹
Почва (ризосферная) + наночастицы Pt	3,4*10 ⁹	1,2*10 ⁹

В таблице 15 показано наиболее вероятное число клеток нитрифицирующих микроорганизмов в 1 г почвы.

Таблица 15 – Нитрификация в образцах почвы, обработанной водной дисперсной системой наночастиц платины

Образец	Наиболее вероятное число клеток микроорганизмов в 1 г почвы	Процент подавления/стимуляции нитрификации в сравнении с контролем	Класс опасности (по СП 2.1.7.1386-03)
Огурцы			
Контроль (нативная почва)	$2,5 \cdot 10^3$		
Почва (общая) + наночастицы Pt	$6,0 \cdot 10^3$	> 100	Чрезвычайно опасные
Контроль (нативная ризосферная почва)	$2,5 \cdot 10^3$		
Почва (ризосферная) + наночастицы Pt	$6,0 \cdot 10^3$	> 100	Чрезвычайно опасные
Пшеница			
Контроль (нативная почва)	$2,0 \cdot 10^2$		
Почва (общая) + наночастицы Pt	$1,3 \cdot 10^2$	47	Умеренно опасные
Контроль (нативная ризосферная почва)	$6,0 \cdot 10^3$		
Почва (ризосферная) + наночастицы Pt	$6,0 \cdot 10^3$	0	Не опасные

В почве в опыте с огурцами зафиксировано повышение количества нитрификаторов более, чем на 100 % по сравнению с контролем. В почве междурядий в опыте с пшеницей различия не очень значимые, а в ризосферной отличий от контроля нет.

В таблице 16 представлены результаты учета денитрификаторов в опытных и контрольных образцах почвы.

Таблица 16 – Денитрификация в образцах почвы, обработанной водной дисперсной системой наночастиц платины

Образец	Наиболее вероятное число клеток микроорганизмов в 1 г почвы	Процент подавления/стимуляции денитрификации в сравнении с контролем	Класс опасности (по СП 2.1.7.1386-03)
Огурцы			
Контроль (нативная почва)	$2,5 \cdot 10^4$		
Почва (общая) + наночастицы Pt	$6,0 \cdot 10^4$	> 100	Чрезвычайно опасные
Контроль (нативная ризосферная почва)	$5,0 \cdot 10^4$		
Почва (ризосферная) + наночастицы Pt	$6,0 \cdot 10^4$	20	Мало опасные
Пшеница			
Контроль (нативная почва)	$5,0 \cdot 10^4$		
Почва (общая) + наночастицы Pt	$2,5 \cdot 10^6$	> 100	Чрезвычайно опасные
Контроль (нативная ризосферная почва)	$2,5 \cdot 10^6$		
Почва (ризосферная) + наночастицы Pt	$7,0 \cdot 10^6$	> 100	Чрезвычайно опасные

Наибольшие различия в количестве денитрификаторов зафиксированы в почве междурядий в опыте с пшеницей (на 2 порядка), в ризосферной – в опыте больше в 2,5 раза, чем в контроле. В опыте с огурцами в почве междурядий денитрификаторов в 2,5 раза больше, чем в контроле. В ризосферной почве различия между контролем и опытом незначительные.

Особую роль в развитии растений играет баланс азота в почве. Повышение процессов денитрификации и нитрификации приводит к потреблению доступных для растений форм азота, в результате чего может наступить азотное голодание растений, что негативно сказывается на урожайности сельскохозяйственных культур. По результатам наших исследований, в опытах с огурцами и пшеницей в почвах, обработанных водной дисперсной системой наночастиц платины увеличивается количество нитрифицирующих бактерий. При обработке почвы наночастицами оксида цинка количество нитрификаторов не отличается от контроля, за исключением опыта с пшеницей (почва междурядий), где отмечено незначительное снижение их численности. В почве в опытах с пшеницей и

огурцами при обработки ее водными дисперсными системами наночастиц оксида цинка и платины происходит увеличение количества денитрифицирующих бактерий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные по токсическим свойствам некоторых наноматериалов далеко не исчерпывающие. Было показано, что токсичность зависит не только от физической природы, способа получения, размеров, структуры нанокластеров и наночастиц, но от биологической модели, на которой проводятся испытания. Органы-мишени и механизмы развития токсического эффекта разнообразны. Одни наноматериалы благодаря своей физической природе способны индуцировать активные формы кислорода. Другие способны проникать через тканевые барьеры внутрь клеток и взаимодействовать с внутриклеточными компонентами. Третьи – могут нарушать мембранные структуры, делая их проницаемыми. Рассматривая накопленный экспериментальный материал, можно обнаружить, что не всегда и не везде наноматериалы оказывают токсическое или иное повреждающее действие. Так, одни исследователи однозначно обнаружили цитотоксический эффект магнитных частиц на основе оксида железа, другие же, напротив, показали, что они безвредны. Представленные результаты показывают, насколько уникальны и разнообразны по своим свойствам наноматериалы, даже если они состоят из одного и того же химического вещества. Полученные данные являются ориентировочными. Для получения полноценных достоверных данных необходимо проведение дополнительных исследований по изучению кинетических параметров роста тест-культуры (изучение истинной удельной скорости роста без учета скорости отмирания и времени удвоения культуры).

По результатам проведенных исследований можно сделать выводы:

1. Бактерии *Pseudomonas fluorescens* показали чувствительность к присутствию в среде наночастиц TiO_2 . Изменение в диаметре колоний тест-культуры *Pseudomonas fluorescens* зафиксировано в присутствии в питательной среде суспензии наночастиц оксида титана.
2. Чувствительными к присутствию в среде наночастиц оказались грибы рода *Trichoderma*. Во всех исследуемых тест-системах с внесением суспензий различных наночастиц у грибов *Trichoderma koningii* зафиксировано изменение сроков спороношения. Конидиальное спороношение у *Tr.koningii* во всех исследуемых тест-системах менее интенсивное, чем в контроле.
3. Наши исследования показали снижение ОМЧ в первый день обработки почвы суспензией nanoZnO , снижение доли споровых и пигментных бактерий, снижение количества азотобактера и нитрификаторов. Через 14 дней в обработанной почве

возрастает ОМЧ по сравнению с контролем, наблюдается полное подавление азотфиксации.

4. Влияние наноPt на микробное почвенное сообщество неоднозначно. На присутствие в среде НЧ Pt остро реагируют пигментные бактерии и азотобактер. Влияние на нитрифицирующие бактерии появляется после хранения образцов почвы. Причем в серой почве происходит снижение количества нитрификаторов по сравнению с контролем, а в темно-серой, наоборот, увеличение, что в обоих случаях ведет к изменению структуры микробного сообщества почвы и в конечном итоге к нарушениям почвенных процессов.

5. Исследования в полевых условиях показало снижение ОМЧ при внесении в почву водной дисперсной системы НЧ оксида цинка и платины, за исключением варианта с обработкой почвы нано ZnO в опыте с пшеницей (почва междурядий - общая). В опытах с огурцами и пшеницей в почвах, обработанных водной дисперсной системой наночастиц платины увеличивается количество нитрифицирующих бактерий. Повышение процессов нитрификации приводит к потреблению доступных для растений форм азота, в результате чего может наступить азотное голодание растений, что негативно сказывается на урожайности сельскохозяйственных культур.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ильин Л.А., Саноцкий И.В. Методы определения токсичности и опасности химических веществ, 1990. с.440-447.
2. Кардановский В.А. «Наноматериалы: то ли враг, то ли друг?» статья для журнала «Наука и Жизнь» // Электронный ресурс: http://www.nkj.ru/news/6191/?sphrase_id=22217
3. Годымчук А.Ю. Лекции по курсу «Отрасли nanoиндустрии и области применения наноматериалов» // Электронный ресурс: <http://portal.tpu.ru/SHARED/g/GODYMCHUK/Education>.
4. Кобаяси Н. Введение в нанотехнологию. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2007. с.134.
5. Данилов А. «Дуализм наночастиц» // Журнал «Российские нанотехнологии» - 2009. Т.41. №5. с.20-21.
6. Carbon nanotubes render E. coli inactive // Электронный ресурс: <http://nanotechweb.org/articles/news/6/8/14/1>.
7. Онищенко Г.Г., Бикотько Б. Г., Покровский В.И., Потапов А. И. «Концепция токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов» 2007 год. // Электронный ресурс: <http://www.nanonewsnet.ru/blog/nikst/kontseptsiya-toksikologicheskikh-issledovani-nanomaterialov>.
8. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щеглов С.Ю., Хлебцов Н.Г. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение. М.: Наука, 2008. с.319.
9. Коваленко Л.В., Фолманис Г.Э. Биологически активные нанопорошки железа. М.: Наука, 2006. с.124.
10. Кирпичников М.П., Шайтан К.В. Специалисты биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова предложили простой и удобный тест для предварительной оценки токсичности наноматериалов // 2009. Электронный ресурс: <http://newsru.com>.
11. Maye M. M., Lim I. I. S., Luo J., Rab Z., Rabinovich D., Liu T. B., Zhong C. J., Am J. Mediator-template assembly of nanoparticles // Chem. Soc. 2005, Vol. 127, pp. 1519– 1529.
12. Sawosz E., Chwalibog A., Szeliga J., Sawosz F., Grodzik M., Rupiewicz M., Niemiec T., Kacprzyk K. Visualization of gold and platinum nanoparticles interacting with *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes* // International Journal of Nanomedicine 2010;5, pp.631– 637.

13. Chwalibog A., Sawosz E., Hotowy A., Szeliga J., Mitura S., Mitura K., Grodzik M., Orłowski P., Sokolowska A. Visualization of interaction between inorganic nanoparticles and bacteria or fungi // *International Journal of Nanomedicine* 2010:5, pp.1085–1094.
14. Rezaei-Zarchi S. Bactericidal Properties of Carbohydrate-Stabilized Platinum Oxide Nanoparticles // *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 74, 2011, p.616-620.
15. Gopal J., Hasan N., Manikandan M., Wu H.-F. Bacterial toxicity/compatibility of platinum nanospheres, nanocuboids and nanoflowers // *Sci. Rep.* 3, 2013, 1260; DOI:10.1038/srep01260.
16. Pelka J., Gehrke H., Esselen M., Turk M., Crone M., Brase S., Muller T., Blank H., Send W., Zibat V., Brenner P., Schneider R., Gerthsen D, Marko D. Cellular uptake of platinum nanoparticles in human colon carcinoma cells and their impact on cellular redox systems and DNA integrity // *Chem Res. Tox.* 22, 2009, 649–659.
17. Konieczny P., Goralczyk A.G., Szmyd R., Skalniak L., Koziel J., Filon F.L., Crosera M., Cierniak A., Zuba-Surma E.K., Borowczyk J., Laczna E., Drukala J., Pyza E., Semik D., Woznicka O., Klein A., Jura J. Effects triggered by platinum nanoparticles on primary keratinocytes // *International Journal of Nanomedicine* 2013:8 3963–3975.
18. Collins D., Luxton T., Kumar N., Shah S., Walker V.K., Shah V. Assessing the Impact of Copper and Zinc Oxide Nanoparticles on Soil: A Field Study // *PLoS ONE*. 2012.- V.7(8).- e42663. doi:10.1371/journal.pone.0042663.
19. Ge Y., Schimel J. P., Holden P.A. Identification of Soil Bacteria Susceptible to TiO₂ and ZnO // *Nanoparticles Applied and Environmental Microbiology*. September 2012, Volume 78, Number 18, p. 6749–6758.
20. Rousk J., Ackermann K., Curling S.F., Jones D. L. Comparative Toxicity of Nanoparticulate CuO and ZnO to Soil Bacterial Communities // *PLoS ONE*.- 2012.- V.7 (3).- e34197. doi:10.1371/journal.pone.0034197.
21. Ge Y., Schimel J. P., Holden P. A. Evidence for Negative Effects of TiO₂ and ZnO Nanoparticles on Soil Bacterial Communities // *Environmental science technology* 2011.55:1659-1664.
22. Du W., Sun Y., Ji R., Zhu J., Wu J., Guo H. TiO₂ and ZnO nanoparticles negatively affect wheat growth and soil enzyme activities in agricultural soil // *Journal of Environmental Monitoring*. 2011,13:822-828.
23. Liu H.L., Yang T.K. Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus helveticus* by ZnO and TiO₂ activated with ultraviolet light // *Process Biochem.* 2003.39:475–481.

24. Коротяев А.И., Бабичев С.А., Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. Учебник.- СПб: «Специальная литература», 1998.- 592 с.
25. Микробиология: учебное пособие для ссузов/ Шильникова В.К., ААВанькова, ГВ годова.- М.:Дрофа, 2006.- 268с.
26. Adams LK, Lyon DY, Alvarez PJJ. 2006. Comparative ecotoxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Res.* 40:3527–3532.
27. Ohira T., Yamamoto O., Iida Y., Nakagawa Z. Antibacterial activity of ZnO powder with crystallographic orientation // *J. Mater Sci Mater Med.*- 2008.-V.19.- pp.1407–1412.
28. Liu Y, He L, Mustapha A, Li H, Hu ZQ, Lin M. 2009. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7. *J Appl Microbiol.* 107:1193–1201.
29. Safekordi A.K., Attar H., Binaeian E. Study on toxicity of manufactured nanoparticles to bacteria *Vibrio fischeri* using homemade luminometer // 2nd International Conference on Chemical, Ecology and Environmental Sciences (ICCEES'2012) Singapore April 28-29, 2012, 60-65
30. Raghupati RK, Koodali RT, Manna AC. 2011. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. *Langmuir.* 27:4020–4028.
31. Xie Y., He Y., Irwin P.L., Jin T., Shi X. Antibacterial activity and mechanism of zinc oxide nanoparticles on *Campylobacter jejuni* // *Appl Environ Microbiol.*- 2011.- V.77.- pp. 2325–2331.
32. Chitra, K. and *Annadurai, G. Antimicrobial activity of wet chemically engineered spherical shaped ZnO nanoparticles on food borne pathogen // *International Food Research Journal* 20(1): 59-64 (2013)
33. Jones N., Ray B., Koodali R.T., Manna A.C. Antibacterial activity of ZnO nanoparticles suspensions on a broad spectrum of microorganisms // *FEMS Microbiol Lett.*- 2008.- V.279.- pp.71–76.
34. Yamamoto O. 2001. Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. *Int J Inorg Mater.* 3:643–646.
35. Padmavathy N, Vijayaraghavan R. 2008. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles – an antibacterial study. *Sci Technol Adv Mater.* 9:035004.
36. Jalal R, Goharshadi EK, Abareshi M, Moosavi M, Yousefi A, Nancarrow P. 2010. ZnO nanofluids: green synthesis, characterization, and antibacterial activity. *Mater Chem Phys.* 121:198–201.

37. Wahab R., Mishra A., Yun S.I., Hwang I.H., Mussarat J., Al-Khedhairy A.A., Kim Y.S., Shin H.S. Fabrication, growth mechanism and antibacterial activity of ZnO micro-spheres prepared via solution process // *Biomass Bioenergy*.- 2012.- V.39.- pp.227–236.
38. Yamamoto O, Komatsu M, Sawai J, Nakagawa Z. 2004. Effect of lattice constant of zinc oxide on antibacterial characteristics. *J Mater Sci Mater Med*. 15:847–851.
39. Wang X., Yang F., Yang W., Yang X. A study on the antibacterial activity of one-dimensional ZnO nanowire arrays: Effects of the orientation and plane surface // *Chem. Commun.*- 2007.- V.43.- pp.4419–4421.
40. Zhou D., Keller A.A. Role of morphology in the aggregation kinetics of ZnO nanoparticles // *Water Res.*- 2010.- V.44.- pp. 2948–2956.
41. Stankovic A, Dimitrijevic S, Uskokovic D. 2013. Influence of size scale and morphology on antibacterial properties of ZnO powders hydrothermally synthesized using different surface stabilizing agents. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 102:21–28.
42. Lu-E Shi, Zhen-Hua Li, Wei Zheng, Yi-Fan Zhao, Yong-Fang Jin & Zhen-Xing Tang Synthesis, antibacterial activity, antibacterial mechanism and food applications of ZnO nanoparticles: a review , *Food Additives & Contaminants: Part A* (2014): Synthesis, antibacterial activity, antibacterial mechanism and food applications of ZnO nanoparticles: a review, *Food Additives & Contaminants: Part A*, DOI: 10.1080/19440049.2013.865147
43. Ohira T, Yamamoto O. 2012. Correlation between antibacterial activity and crystallite size on ceramics. *Chem Eng Sci*. 68:355–361.
44. Kim SW, An YJ. 2012. Effect of ZnO and TiO₂ nanoparticles preilluminated with UVA and UVB light on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 95:243–253.
45. Jiang W, Saxena A, Song B, Ward BB, Beveridge TJ, Myneni SCB. 2004. Elucidation of functional groups on Gram-positive and Gram-negative bacterial surfaces using infrared spectroscopy. *Langmuir*. 20:11433–11442.
46. Applerot G, Perkas N, Amirian G, Girshevitz O, Gedanken A. 2009. Coating of glass with ZnO via ultrasonic irradiation and a study of its antibacterial properties. *Appl Surf Sci*. 256: S3–S8.
47. Gordon T, Perlstein B, Houbara O, Felner I, Banin E, Margel S. 2011. Synthesis and characterization of zinc/iron oxide composite nanoparticles and their antibacterial properties. *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects*. 374:1–8.
48. Manna A.C. 2012. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles. In: Cioffi N, Rai M, editors. *Nano-antimicrobials: progress and prospects*. Berlin: Springer Press; p. 151–180.

49. Zhang L, Jiang Y, Ding Y, Povey M, York D. 2007. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). *J Nanopart Res.* 9:479–489.
50. Zhang L, Ding Y, Povey M, York D. 2008. ZnO nanofluids – a potential antibacterial agent. *Prog Nat Sci.* 18:939–944.
51. Почва, очистка населенных мест, бытовые и промышленные отходы, санитарная охрана почвы. Гигиеническая оценка качества почвы населенных мест. Методические указания МУ 2.1.7.730-99.
52. Методические указания по гигиеническому обоснованию ПДК химических веществ в почве" от 05.08.82 N 2609-82.
53. Практикум по микробиологии / Под ред. проф. Нетрусова А.И.. М.: АДЕМА, 2005. – 608 с.
54. Санитарные правила по определению класса опасности токсичных отходов производства и потребления. СП 2.1.7.1386-03.

Уважаемый пользователь! Обращаем ваше внимание, что система «Антиплагиат» отвечает на вопрос, является ли тот или иной фрагмент текста заимствованным или нет. Ответ на вопрос, является ли заимствованный фрагмент именно плагиатом, а не законной цитатой, система оставляет на ваше усмотрение.

Отчет о проверке № 1

дата загрузки: 06.06.2016 17:50:02
пользователь: kerb93@mail.ru / ID: 3284926
отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат»
на сайте <http://www.antiplagiat.ru>

Информация о документе

№ документа: 3
Имя исходного файла: Влияние наночастиц на почвенные микроорганизмы.docx
Размер текста: 2604 кБ
Тип документа: Не указано
Символов в тексте: 108704
Слов в тексте: 13285
Число предложений: 583

Информация об отчете

Дата: Отчет от 06.06.2016 17:50:02 - Последний готовый отчет
Комментарии: не указано
Оценка оригинальности: 76.34%
Заимствования: 23.66%
Цитирование: 0%



Оригинальность: 76.34%
Заимствования: 23.66%
Цитирование: 0%

Источники

Доля в тексте	Источник	Ссылка	Дата	Найдено в
11.65%	[1] Токсичность наноматериалов: доказательства и предположения	http://knowledge.allbest.ru	раньше 2011 года	Модуль поиска Интернет
11.65%	[2] Токсичность наноматериалов: доказательства и предположения. Реферат. Читать текст online -	http://bibliofond.ru	15.06.2014	Модуль поиска Интернет
7.76%	[3] Р. А. Исламов, Е. А. Северова, Н. М. Поминова, Ю. Д. Денисов	http://rudocs.exdat.com	24.06.2015	Модуль поиска Интернет

