

## ДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ $Al_2O_3$ НА ПОЧВЕННЫЙ МИКРОБИОЦЕНОЗ, СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ И МИКРОФЛОРУ КИШЕЧНИКА КРАСНОГО КАЛИФОРНИЙСКОГО ЧЕРВЯ (*Eisenia foetida*)\*

Е.В. ЯУШЕВА<sup>1</sup>, Е.А. СИЗОВА<sup>1, 2</sup>, И.А. ГАВРИШ<sup>2</sup>, С.В. ЛЕБЕДЕВ<sup>2</sup>,  
Ф.Г. КАЮМОВ<sup>2</sup>

Обсуждение возможности применения наноматериалов в агротехнологиях ограничивается тем, что число работ по комплексной оценке биологических рисков при использовании наногербицидов и нанодобриений и изучению воздействия наноматериалов, в частности наночастиц (НЧ) металлов, на почвобионтов невелико. Мы сравнили влияние наночастиц  $Al_2O_3$  на микрофлору почвы и кишечника красного калифорнийского червя (*Eisenia foetida*), адаптационные способности этого почвобионта и особенности вермикомпостирования. Предварительный анализ биологической активности НЧ  $Al_2O_3$  in vitro проводили в тесте ингибирования бактериальной биолюминесценции. Из особей используемого биоиндикаторного вида, имеющих одинаковую массу, сформировали пять групп (в каждой  $n = 10$ ). При культивировании в I, II, III и IV группах в субстрат добавляли НЧ  $Al_2O_3$  в дозах соответственно 50, 100, 300, 3000 мг/кг; V группа служила контролем (НЧ в почву не вносили). На 14-е сут определяли антиоксидантную активность каталазы (КТ), супероксиддисмутазы (СОД) и оценивали численность микрофлоры кишечника червей, а также численность микробов в почве. Для определения общей численности микроорганизмов проводили посев на мясо-пептонный агар. Микроорганизмы, использующие минеральные формы азота, выделяли на крахмал-аммиачном агаре (КАА), микроскопические грибы — на среде Чапека, азотфиксаторы — на среде Эшби, целлюлозолитические микроорганизмы — на среде Гетчинсона. При максимальной дозировке вносимых в почву наночастиц оксида алюминия отмечалось увеличение смертности червей (до 20 %). В результате воздействия исследуемых наночастиц происходил рост активности СОД и КТ. При повышении содержания НЧ  $Al_2O_3$  с 50 до 3000 мг/кг наблюдалось снижение общего числа микроорганизмов в почве: без вермикомпостирования — на 61,7-67,6 %, с вермикомпостированием — на 55,6-61,3 %. Количество грибов в почве в I, II, III и IV группах снизилось соответственно на 42,8; 52,4; 61,9 и 76,2 % относительно контроля; численность азотфиксирующих бактерий — на 64,3; 77,9; 78,6 и 85,7 %, число бактерий, культивируемых на КАА, — на 22,7; 38,6; 84,1 и 86,4 %. В I группе число целлюлозолитических бактерий в почве увеличилось на 6,9 %. Во II, III и IV группах, напротив, отмечали снижение их количества (на 16,7; 12,5 и 25,0 %). В кишечнике *E. foetida* с ростом содержания НЧ  $Al_2O_3$  в грунте с 50 до 3000 г/кг также происходило снижение общего числа микроорганизмов — на 9,7-43,2 %. Численность грибов уменьшилась в I, II, III и IV группах соответственно на 18,0; 20,0; 39,0 и 40,0 % относительно контроля, количество азотфиксирующих бактерий — на 16,0; 60,0; 78,8 и 80,0 %. Число целлюлозолитических бактерий в кишечнике *E. foetida* увеличивалось под действием минимальных дозровок наночастиц (на 16,0 %), тогда как во II, III и IV группах оно снижалось (на 8,0; 32,0 и 40,0 %). Численность бактерий, культивируемых на КАА, уменьшалась в кишечнике особей из I, II, III и IV групп — соответственно на 13,3; 46,7; 60,0 и 73,3 %. Таким образом, имело место дозозависимое действие наночастиц и постепенное развитие бактерицидного эффекта в отношении почвенной и кишечной микрофлоры при возрастании количества НЧ  $Al_2O_3$  в почве. Обнаруженное негативное влияние НЧ  $Al_2O_3$  на почвенный биоценоз проявилось в его обеднении, что ведет к деградации почв и снижению их плодородия. Полученные данные подтверждают необходимость комплексной оценки биотоксичности НЧ в разных средах обитания. По показателям антиоксидантной системы установлены адаптационные способности *E. foetida* на фоне внесения в почву НЧ  $Al_2O_3$ .

**Ключевые слова:** наночастицы, *Eisenia foetida*, каталаза, супероксиддисмутазы, микроорганизмы.

В последние годы накоплено достаточное количество работ, обосновывающих перспективы применения наноматериалов в микроэлектронике (1), энергетике (2), химической (3), пищевой (4), фармацевтической (5), медицинской промышленности (6-8). Наночастицы (НЧ) металлов имеют важное прикладное значение в сельском хозяйстве (в частности, в растениеводстве и для повышения плодородия почв), где их можно использовать

\* Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-36-00023).

как наногербициды (9), нанопестициды (10), в качестве стимуляторов роста растений (11) и нанодобровений (12).

Среди разнообразных наноматериалов обращают на себя внимание наночастицы алюминия и его оксидов. Известно около 250 минералов, содержащих алюминий и используемых в различных областях, в том числе в агросекторе, возможность применения которых в наноформе активно изучается в настоящее время (13, 14). Однако существует лишь ограниченное число работ по комплексной оценке биологических рисков, связанных с наночастицами алюминия (15-19).

Один из биоиндикаторных видов при определении потенциальной токсичности химических веществ в почвах (20, 21) — красный калифорнийский червь (*Eisenia foetida*). Черви играют важную роль в круговороте веществ и формировании структуры почвы, улучшая деградацию органических субстратов, перемешивая слои почвы и усиливая аэрацию (22, 23).

В представленном исследовании, используя красное калифорнийского червя в качестве тест-объекта, мы впервые продемонстрировали дозозависимое действие наночастиц оксида алюминия, развитие бактерицидного эффекта в отношении почвенной микрофлоры и микробиоценоза кишечника *E. foetida* по мере возрастания содержания наночастиц  $Al_2O_3$  в почве, а также проявление адаптационных реакций у *E. foetida*.

Целью нашей работы было изучение влияния наночастиц  $Al_2O_3$  на почвенный микробиоценоз, вермикомпостирование и состояние антиоксидантной системы и микрофлоры кишечника у красного калифорнийского червя.

**Методика.** В исследовании использовали препарат наночастиц оксида алюминия (НЧ  $Al_2O_3$ , ООО «Передовые порошковые технологии», Россия), полученных методом электрического взрыва проводника в атмосфере аргона. Размер наночастиц — 54 нм, Z-потенциал —  $30 \pm 0,1$  мВ. В состав порошка наночастиц входили:  $Al_2O_3$  (95 %), сорбированный азот, углеводороды (3 %), вода (2 %). Материаловедческая аттестация препаратов включала электронную сканирующую и просвечивающую микроскопию на приборах JSM 7401F и JEM-2000FX («JEOL», Япония). Рентгенофазовый анализ выполняли на дифрактометре ДРОН-7 (НПО «Буревестник», Россия). Дзет-потенциал частиц определяли на анализаторе Photocor Compact-Z («Фотокор», Россия).

Предварительную оценку биологической активности НЧ  $Al_2O_3$  in vitro проводили в тесте ингибирования бактериальной биолюминесценции. Пробы суспензий наночастиц готовили в диапазоне концентраций 0,00625-4,0 М, обрабатывали ультразвуком в течение 30 мин. Использовали генно-инженерный люминесцирующий штамм *Echerichia coli* K12 TG1, конститутивно экспрессирующий гены *luxCDABE* морского микроорганизма *Photobacterium leiognathi* 54D10 (лиофилизированный препарат Эколюм, НВО «Иммунотех», Россия). Непосредственно перед началом опытов *E. coli* K12 TG1 восстанавливали охлажденной дистиллированной водой, выдерживали при 2-4 °С в течение 30 мин, после чего доводили температуру бактериальной суспензии до 15-25 °С. Тест ингибирования бактериальной биолюминесценции проводили при помощи микропланшетного анализатора Infinite PROF200 («Tecan Group, Ltd», Швейцария), динамически регистрирующего интенсивность свечения полученных смесей в течение 180 мин с интервалом 5 мин. Результаты влияния наноматериалов на интенсивность бактериальной биолюминесценции (I) оценивали по формуле:

$$I = \frac{I_{K0 \text{ мин}} \times I_{Oл \text{ мин}}}{I_{Kл \text{ мин}} \times I_{O0 \text{ мин}}},$$

где  $I_k$  и  $I_0$  — интенсивность свечения контрольных и опытных проб на 0-й и  $n$ -й мин измерения.

Токсичность исследовали по OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (ОЭСД, 1984, 2004) на лабораторных культурах дождевых червей (красный калифорнийский гибрид) *Eisenia foetida* Andrei Bouche. Все отобранные особи были половозрелыми. В качестве субстрата использовали искусственную почву (70 % кварцевого песка, 20 % глины, 10 % торфа). Из особей одинаковой массы сформировали группы (по  $n = 10$ ). При культивировании в I, II, III и IV группах в почву добавляли НЧ  $Al_2O_3$  в дозах соответственно 50, 100, 300, 3000 мг/кг; V группа служила контролем (без НЧ). НЧ вносили в субстрат перед тем, как поместить в него червей, перемешивали с помощью бытового миксера и доводили до влажности около 85 %. Одновременно инкубировали почвогрунт с НЧ  $Al_2O_3$  в тех же дозировках без вермикомпостирования. Эксперимент проводился в 3 повторностях.

Антиоксидантную активность каталазы (КТ, КФ 1.11.1.6) и супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) у червей определяли на 14-е сут эксперимента на автоматическом биохимическом анализаторе CS-T240 («Dirui Industrial Co., Ltd», Китай) с использованием коммерческих биохимических наборов Randox («Randox», США).

Влияние НЧ на микрофлору кишечника червей и почвенную микрофлору оценивали на 14-е сут культивирования с наночастицами. Для очищения кишечника червей выдерживали в пластиковом контейнере на влажной фильтровальной бумаге в течение 1 сут, затем вскрывали стерильным скальпелем, отделяли кишечник и помещали в стерильную пробирку. Пробы почвы отбирали в стерильные пробирки. Микробиологические исследования образцов осуществляли в 1-е сут после отбора. Для определения общей численности микроорганизмов проводили посев на мясо-пептонный агар (МПА). Микроорганизмы, использующие минеральные формы азота, выделяли на крахмал-аммиачном агаре (КАА), микроскопические грибы — на среде Чапека, азотфиксаторы — на среде Эшби, целлюлозолитические микроорганизмы — на среде Гетчинсона (24, 25). В среду с КАА добавляли нистатин (40 мкг/мл) для предотвращения роста грибов, в среду Чапека — пенициллин (50 мкг/мл) для предотвращения бактериального роста. Повторность посева 3-кратная.

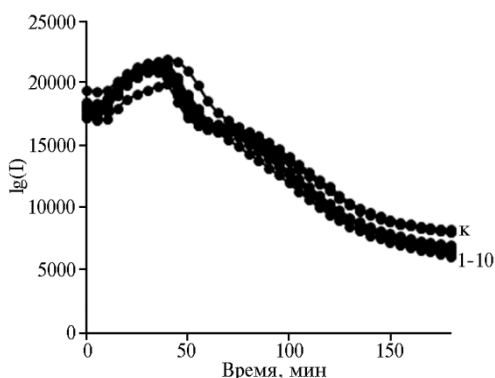


Рис. 1. Динамика свечения (I) *Echerichia coli* K12 TG1 с клонированными генами *luxCDABE* *Photobacterium leiognathi* 54D10 при контакте с наночастицами  $Al_2O_3$  в разных концентрациях: 1 — 4,0 М, 2 — 2,0 М, 3 — 1,0 М, 4 — 0,5 М, 5 — 0,25 М, 6 — 0,1 М, 7 — 0,05 М, 8 — 0,025 М, 9 — 0,0125 М, 10 — 0,00625 М, к — контроль.

Статистический анализ данных проводили с использованием программного пакета Statistica 10.0 («StatSoft Inc.», США). Представлены средние арифметические ( $M$ ) со стандартной ошибкой среднего ( $m$ ).

**Результаты.** Контакт *E. coli* K12 TG1 с возрастающими концентрациями (0,00625–4,0 М) НЧ  $Al_2O_3$  не вызывал подавления свечения бактерий в течение 60 мин, что позволило охарактеризовать НЧ  $Al_2O_3$  как нетоксичные (рис. 1). Через 180 мин биолюминесценция снижалась на 20–30 % относительно контрольных значений, что характеризовало исследуемые НЧ как слаботоксичные в отношении живых клеток. Ранее сообщалось об отсутствии цитотоксиче-

ского и генотоксического влияния наночастиц соединений алюминия на живую клетку в экспериментах *in vitro* (26, 27). Снижение свечения бактерий при пролонгировании контакта до 180 мин предполагает наличие хронического токсического эффекта НЧ, требующего времени для развития. Подобную хроническую биотоксичность демонстрируют наночастицы других металлов (28-30).

Для оценки биотоксичности НЧ  $Al_2O_3$  в отношении *E. foetida* исследовали активность ферментов антиоксидантной защиты. Низкие и средние дозы (50-300 мг/кг) наночастиц вызвали манифестную индукцию активности каталазы с максимальными показателями при 300 мг/кг. Дальнейший рост нагрузки наночастицами на почвогрунт (до 3000 мг/кг) приводил к ингибированию КТ. Аналогичный результат получили Н.У. Liang с соавт. (31). В то же время только при внесении НЧ  $Al_2O_3$  в количестве 3000 мг/кг величина, на которую активность КТ увеличивалась по сравнению с контролем, существенно отличалась от того же показателя в остальных группах. Для СОД приращение активности в опыте по сравнению с контролем было примерно одинаковым при разном содержании НЧ  $Al_2O_3$ , то есть дозозависимого эффекта мы практически не наблюдали (рис. 2).

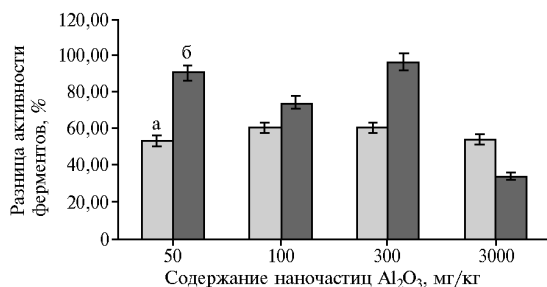


Рис. 2. Разница между активностью супероксиддисмутазы (а) и каталазы (б) у *Eisenia foetida* в контроле и опыте после 14 сут культивирования в искусственной почве с разным содержанием наночастиц  $Al_2O_3$ .

Известно, что соединения алюминия способны активировать экспрессию генов СОД и КТ и, как следствие, сами ферменты (32). Неконтролируемое повышение концентрации активных форм окислителей под действием токсического агента в клетках способствовало усилению функций защитных механизмов, что служит важным элементом реакции организма на присутствие токсических до-

зировок вещества в окружающей среде (33).

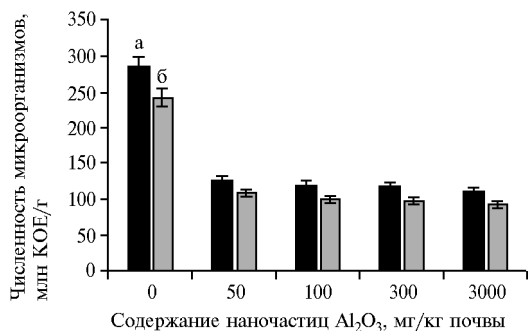
В исследованиях W. Sun с соавт. (34) активность СОД у дождевых червей увеличивалась при умеренном экологическом стрессе и уменьшалась при тяжелой экологической напряженности. То есть НЧ алюминия обладают пролонгированным эффектом, и процесс релаксации системы (возврат к нормальному состоянию) может занять определенное время после исключения токсиканта. Действуя как первичная система антиоксидантной защиты, КТ и СОД катализируют преобразование активных форм кислорода в менее активные или инертные (35, 36). В наших опытах, как и в случае с КТ, влияние НЧ  $Al_2O_3$  на СОД у *E. foetida* сопровождалось увеличением активности при повышении содержания  $Al_2O_3$  с 0 до 3000 мг/кг.

На фоне снижения активности ферментов (доза 3000 мг/кг) увеличение смертности тест-объекта достигало 20 % по сравнению со 100 % выживаемостью в других группах.

Способность компонентов почвы вступать во взаимодействие с НЧ металлов, связывать их и уменьшать биодоступность нивелирует токсический эффект НЧ в отношении *E. foetida*. Растворенные или твердые частицы некоторых органических веществ могут агломерировать и сорбировать на поверхности НЧ в составе почвенной матрицы и тем самым снижать их биоактивность (37, 38).

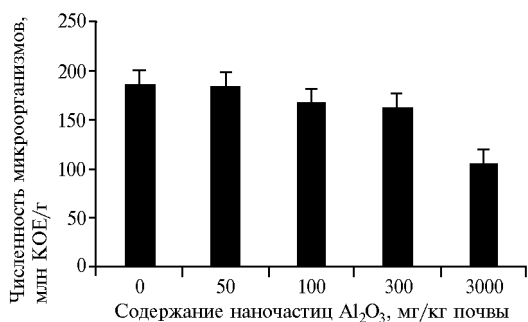
Результаты количественного учета микроорганизмов почвы и ки-

щечника червей показали, что через 14 сут инкубации при возрастающих количествах НЧ  $Al_2O_3$  численность микроорганизмов изменялась как в самой почве, так и в кишечнике.



**Рис. 3.** Общая численность микроорганизмов в почвогрунте после 14 сут инкубации с наночастицами  $Al_2O_3$  в разных дозировках без вермикомпостирования (а) и при его наличии (б).

действием барьерных и адаптационно-приспособительных механизмов у этого почвобионта. Дозозависимое снижение количества почвенной микрофлоры, обусловленное изменением метаболических процессов в клетке, характерно и для других видов наночастиц (39).



**Рис. 4.** Общая численность микроорганизмов в кишечнике *Eisenia foetida* после 14 сут культивирования с наночастицами  $Al_2O_3$  в разных дозировках.

на несколько порядков ниже.

При инкубации с НЧ  $Al_2O_3$  численность всех групп микроорганизмов изменялась. Количество грибов в почве в I, II, III и IV группах снизилось соответственно на 42,8; 52,4; 61,9 и 76,2 % относительно контроля, в кишечнике *E. foetida* — на 18,0 и 20,0 % в I и II группах, на 39,0 и 40,0 % в III и IV группах (табл. 2). То есть с возрастанием содержания НЧ  $Al_2O_3$  численность микроорганизмов неуклонно уменьшалась, что указывает на бактерицидный эффект в отношении почвенной и кишечной микрофлоры. Наблюдалось снижение резистентности грибов к действию НЧ, в особенности при исследовании микробиоценоза кишечника *E. foetida*. Аналогичные результаты по воздействию на микроскопические грибы известны для наночастиц железа (40). Почвенные грибы, как правило, более устойчивы к тяжелым металлам, чем бактерии (41).

Численность азотфиксирующих бактерий была незначительной в контрольных образцах и под действием НЧ  $Al_2O_3$  снижалась в почве в I, II, III и IV группах соответственно на 64,3; 77,9; 78,6 и 85,7%, в кишечни-

При увеличении дозы НЧ  $Al_2O_3$  с 50 до 3000 мг/кг отмечалось последовательное снижение общей численности микроорганизмов в почве без вермикомпостирования на 61,7-67,6 %, с вермикомпостированием — на 55,6-61,3 %, в кишечнике *E. foetida* — на 9,7-43,2 % (рис. 3, 4). При этом минимальная дозировка (50 мг/кг) НЧ  $Al_2O_3$  снижала общую численность почвенных микроорганизмов, но не влияла на численность микробиоценоза кишечника *E. foetida*, что было обусловлено

Наблюдались различия в токсическом эффекте НЧ  $Al_2O_3$  в отношении микроорганизмов *in vitro* и *in vivo*: при сопоставимых дозах бактерицидные свойства *in vivo* проявлялись, *in vitro* — отсутствовали. Развитие токсического эффекта определялось фактором времени и особенностями среды культивирования.

В контрольных образцах почвы с вермикомпостированием и в кишечнике *E. foetida* количественный анализ выявил доминирование бактерий, тогда как численность микроскопических грибов была

ке *E. foetida* — на 16,0; 60,0; 78,8 и 80,0 %. Количество целлюлозолитических бактерий увеличивалось в почве и кишечнике *E. foetida* при минимальных дозировках наночастиц соответственно на 6,9 и 16,0 %. В то же время происходило снижение числа этих бактерий во II группе на 16,7 и 8,0 %, в III — на 12,5 и 32,0 %, в IV — на 25,0 и 40,0 %.

## 2. Численность разных микроорганизмов в почве и кишечнике *Eisenia foetida* при вермикомпостировании через 14 сут после внесения наночастиц $Al_2O_3$

Группа	Микроскопические грибы, тыс. КОЕ/г	Бактерии		
		целлюлозоразрушающие, млн КОЕ/г	утилизирующие минеральный азот, млн КОЕ/г	азотфиксаторы, млн КОЕ/г
П о ч в а				
Контроль	21,0±3,20	72,0±9,70	44,0±6,50	14,0±4,20
I	12,0±2,60	77,0±4,30	34,0±2,10	5,0±0,70
II	10,0±2,10	60,0±6,40	27,0±3,10	3,1±0,20
III	8,0±0,65	63,0±8,20	7,0±0,80	3,0±0,13
IV	5,0±0,40	54,0±2,50	6,0±0,60	2,0±0,10
К и ш е ч н и к				
Контроль	5,0±1,60	25,0±1,60	15,0±0,30	4,1±0,80
I	4,1±1,20	29,0±2,40	13,0±1,20	2,4±0,40
II	4,0±0,45	23,0±1,02	8,0±0,50	2,0±0,20
III	3,1±0,10	17,0±2,20	6,0±0,20	1,1±0,30
IV	3,0±0,20	15,0±1,50	4,0±0,90	0,8±0,04

Согласно данным литературы, НЧ металлов в малых дозах способны стимулировать размножение отдельных групп бактерий, тогда как в высоких — оказывают бактерицидный и бактериостатический эффект, вызывая нарушение целостности клеточной мембраны и изменения в работе внутриклеточных систем (42). Также известно, что степень влияния некоторых НЧ на жизнеспособность азотфиксирующих бактерий и колонизацию ими субстратов определяется зарядом НЧ (43). Численность микроорганизмов, использующих минеральные формы азота, в особенности актиномицетов, служит важным показателем, поскольку некоторые актиномицеты — это типичные симбионты беспозвоночных, в том числе дождевых червей, участвующих в преобразовании питательных компонентов почвы (44).

Анализ микрофлоры почвы и кишечника *E. foetida* через 14 сут инкубации показал снижение числа бактерий, культивируемых на КАА, под действием НЧ  $Al_2O_3$ : в почве в I, II, III и IV группах — соответственно на 22,7; 38,6; 84,1 и 86,4 %, в кишечнике червей — на 13,3; 46,7; 60,0 и 73,3 %. В результате наблюдалась общая тенденция к снижению численности микроорганизмов в почве и кишечнике под действием НЧ  $Al_2O_3$  по мере увеличения дозировки наночастиц. Исключение составили минимальные вносимые дозы препаратов НЧ: в этом случае происходило увеличение численности целлюлозоразрушающих бактерий.

Таким образом, в модельном эксперименте подтверждено негативное влияние нанопрепаратов  $Al_2O_3$  на почвенный биоценоз, проявляющееся в его обеднении, что сопровождается деградацией и снижением плодородия. Установлены адаптационные способности красного калифорнийского червя (*Eisenia foetida*) по показателям антиоксидантной системы на фоне внесения в почву наночастиц  $Al_2O_3$ . Показан положительный эффект применения вермикомпостирования в целях снижения токсического действия наночастиц на почву. В целом полученные результаты подтверждают необходимость комплексной оценки биотоксичности наночастиц в разных средах обитания.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Yeо J., Kim G., Hong S., Kim M.S., Kim D., Lee J., Ko S.H. Flexible supercapac-

- itor fabrication by room temperature rapid laser processing of roll-to-roll printed metal nanoparticle ink for wearable electronics application. *Journal of Power Sources*, 2014, 246: 562-568 (doi: 10.1016/j.jpowsour.2013.08.012).
2. Shahravan A., Desai T., Matsoukas T. Passivation of aluminum nanoparticles by plasma-enhanced chemical vapor deposition for energetic nanomaterials. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2014, 10(6): 7942-7947 (doi: 10.1021/am5012707).
  3. Luska K.L., Julis J., Stavitski E., Zakharov D.N., Adams A., Leitner W. Bifunctional nanoparticle—SILP catalysts (NPs@SILP) for the selective deoxygenation of biomass substrates. *Chemical Science*, 2014, 12(5): 4895-4905 (doi: 10.1039/C4SC02033B).
  4. Machado S., Grosso J.P., Nouws H.P.A., Albergaria J.T., Delerue-Matos C. Utilization of food industry wastes for the production of zero-valent iron nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 2014, 496: 233-240 (doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.07.058).
  5. Ju C., Mo R., Xue J., Zhang L., Zhao Z., Xue L., Zhang C. Sequential intra-intercellular nanoparticle delivery system for deep tumor penetration. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, 53: 6253-6258 (doi: 10.1002/anie.201311227).
  6. Ansari M.A., Khan H.M., Khan A.A., Sultan A., Azam A. Characterization of clinical strains of MSSA, MRSA and MRSE isolated from skin and soft tissue infections and the antibacterial activity of ZnO nanoparticles. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 28(4): 1605-1613 (doi: 10.1007/s11274-011-0966-1).
  7. Pramanik A., Laha D., Bhattacharya D., Pramanik P., Karmanikar P. A novel study of antibacterial activity of copper iodide nanoparticle mediated by DNA and membrane damage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2012, 96: 50-55 (doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.03.021).
  8. Rai M., Ingle A.P., Birla S., Yadav A., Santos C.A.D. Strategic role of selected noble metal nanoparticles in medicine. *Critical Reviews in Microbiology*, 2016, 42(5): 696-719 (doi: 10.3109/1040841x.2015.1018131).
  9. Manimaran M. A review on nanotechnology and its implications in agriculture and food industry. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2015, 5(7): 13-15.
  10. Mishra S., Singh H.B. Biosynthesized silver nanoparticles as a nanoweapon against phytopathogens: exploring their scope and potential in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, 99(3): 1097-1107 (doi: 10.1007/s00253-014-6296-0).
  11. Li X., Yang Y., Gao B., Zhang M. Stimulation of peanut seedling development and growth by zero-valent iron nanoparticles at low concentrations. *PLoS ONE*, 2015, 10(4): 1-12 (doi: 10.1371/journal.pone.0122884).
  12. Новицкая Н.В., Джемесюк А.В. Урожайность сои в зависимости от элементов технологии на черноземах типичных лесостепи Украины. *Вестник Алтайского государственного аграрного университета*, 2015, 127(5): 127.
  13. Зинченко В.А. Химическая защита растений: средства, технология и экологическая безопасность. М., 2005.
  14. Шугалей И.В., Гарабаджиу А.В., Илюшин М.А., Судариков А.М. Некоторые аспекты влияния алюминия и его соединений на живые организмы. *Экологическая химия*, 2012, 21(3): 172-186.
  15. Лушаева И.В., Моргалев С.Н. Изучение воздействия наночастиц TiO<sub>2</sub> и Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> на бактерии *Pseudomonas fluorescens* и *Bacillus mucilaginosus*. *Вестник Томского государственного университета. Биология*, 2009, 8(4): 97-103.
  16. Heckmann L.-H., Besenbacher F., Janeck J., Hovgaard M.B., Sutherland D.S., Autrup H. Limit-test toxicity screening of selected inorganic nanoparticles to the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology*, 2011, 20: 226-233 (doi: 10.1007/s10646-010-0574-0).
  17. Sadiq I.M., Pakrashi S., Chandrasekaran N., Mukherjee A. Studies on toxicity of aluminum oxide (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles to microalgae species: *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. *J. Nanopart. Res.*, 2011, 13: 3287-3299 (doi: 10.1007/s11051-011-0243-0).
  18. Azmat H., Javed M., Jabeen G. Acute toxicity of aluminium to the fish (*Catla catla*, *Labeo rohita* and *Cirrhina mrigala*). *Pak. Vet. J.*, 2012, 32(1): 85-87.
  19. Silva S. Aluminium toxicity targets in plants. *Journal of Botany*, 2012, 2012: Article ID 219462 (doi: 10.1155/2012/219462).
  20. Dovic M., Lestan D. *Eisenia fetida* avoidance behavior as a tool for assessing the efficiency of remediation of Pb, Zn and Cd polluted soil. *Environ. Pollut.*, 2010, 158(8): 2766-2772 (doi: 10.1016/j.envpol.2010.04.015).
  21. Saez G., Aye M., Meo M., Aimé A., Bestel I., Barthélémy P., Giorgio C. Genotoxic and oxidative responses in coelomocytes of *Eisenia fetida* and *Hediste diversicolor* exposed to lipid-coated CdSe/ZnS quantum dots and CdCl<sub>2</sub>. *Environ. Toxicol.*, 2015, 30(8): 918-926 (doi: 10.1002/tox.21966).
  22. Edwards C.A., Bohlen P.J. *Biology and ecology of earthworms*. V. 3. Springer Science &

Business Media, 1996.

23. Vlčková K., Hofman J. A comparison of POPs bioaccumulation in *Eisenia fetida* in natural and artificial soils and the effects of aging. *Environ. Pollut.*, 2012, 160: 49-56 (doi: 10.1016/j.envpol.2011.08.049).
24. Методы почвенной микробиологии и биохимии /Под ред. Д.Г. Звягинцева. М., 1991.
25. Захарова Н.Г., Алимова Ф.К., Егоров С.Ю. Микробиологический мониторинг почв. Казань, 2005.
26. Fajardo C., Sacca M.L., Costa G., Nande M., Martin M. Impact of Ag and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles on soil organisms: in vitro and soil experiments. *Science of The Total Environment*, 2014, 473-474: 254-261 (doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.12.043).
27. Sadiq R., Khan Q.M., Mobeen A., Hashmat A.J. In vitro toxicological assessment of iron oxide, aluminum oxide and copper nanoparticles in prokaryotic and eukaryotic cell types. *Drug. Chem. Toxicol.*, 2015, 38(2): 152-161 (doi: 10.3109/01480545.2014.919584).
28. Tilston E.L., Collins C.D., Mitchell G.R., Princivalle J., Shaw L.J. Nanoscale zerovalent iron alters soil bacterial community structure and inhibits chloroaromatic biodegradation potential in Aroclor 1242-contaminated soil. *Environ. Pollut.*, 2013, 173: 38-46 (doi: 10.1016/j.envpol.2012.09.018).
29. Ko K.S., Kong I.C. Toxic effects of nanoparticles on bioluminescence activity, seed germination, and gene mutation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, 98(7): 3295-3303 (doi: 10.1007/s00253-013-5404-x).
30. Ismail R.A., Sulaiman G.M., Abdulrahman S.A., Marzoog T.R. Antibacterial activity of magnetic iron oxide nanoparticles synthesized by laser ablation in liquid. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, 2015, 53: 286-297 (doi: 10.1016/j.msec.2015.04.047).
31. Liang H.Y., Li Y.S., Sun J. Effect of aluminum ion on activities of important antioxidant enzymes from earthworms, *Eisenia andrei*. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science)*, 2007, 25: 551-555.
32. Richards K.D., Schott E.J., Sharma Y.K., Davis K.R., Gardner R.C. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 2016, 116: 409-418 (doi: 10.1104/pp.116.1.409).
33. Yoon C., Koppula S., Yoo S., Yum M., Kim J., Lee J., Song M. *Rhus javanica* Linn protects against hydrogen peroxide-induced toxicity in human Chang liver cells via attenuation of oxidative stress and apoptosis signaling. *Mol. Med. Rep.*, 2016, 13(1): 1019-1025 (doi: 10.3892/mmr.2015.4603).
34. Sun W., Tai T.Y., Lin Y.S. Effect of monosultap on protein content. SOD and AChE activity of *Eisenia foetida* under two different temperatures. *J. Agro-Environ. Sci.*, 2007, 26: 1816-1821.
35. Kunwar A., Priyadarsini K.I. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *Journal of Medical and Allied Sciences*, 2011, 1(2): 53-60.
36. Shinde A., Ganu J., Naik P. Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress: a review. *Journal of Dental and Allied Sciences*, 2012, 1(2): 63-66.
37. Ghosh S., Mashayekhi H., Pan B., Bhowmik P., Xing B. Colloidal behavior of aluminum oxide nanoparticles as affected by pH and natural organic matter. *Langmuir*, 2008, 24(21): 12385-12391 (doi: 10.1021/la802015f).
38. Tourinho P.S., van Gestel C.A., Lofts S., Svendsen C., Soares A.M., Loureiro S. Metal-based nanoparticles in soil: fate, behavior, and effects on soil invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2012, 31(8): 1679-1692 (doi: 10.1002/etc.1880).
39. Fang T., Watson J., Goodman J., Dimkpa C.O., Martineau N., Das S., McLean J.E., Britt D.W., Anderson A.J. Does doping with aluminum alter the effects of ZnO nanoparticles on the metabolism of soil pseudomonads? *Microbiol. Res.*, 2013, 168(2): 91-98 (doi: 10.1016/j.micres.2012.09.001).
40. Pawlett M., Ritz K., Dorey R.A., Rocks S., Ramsden J., Harris J.A. The impact of zero-valent iron nanoparticles upon soil microbial communities is context dependent. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2013, 2: 1041-1049 (doi: 10.1007/s11356-012-1196-2).
41. Мынбаева Б.Н. Популяционная структура микрофлоры почв г. Алматы при загрязнении их тяжелыми металлами. *Вестник Башкирского университета*, 2012, 3: 1282-1284.
42. Li H., Chen Q., Zhao J., Urmila K. Enhancing the antimicrobial activity of natural extraction using the synthetic ultrasmall metal nanoparticles. *Scientific Reports*, 2015, 5: Article number 11033 (doi: 10.1038/srep11033).
43. Burke D.J., Pietrasiak N., Situ S.F., Abenojar E.C., Porche M., Kraj P., Lakliang Y., Samia A.C. Iron oxide and titanium dioxide nanoparticle effects on plant performance and root associated microbes. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, 16(10): 23630-23650 (doi: 10.3390/ijms161023630).
44. Бызов Б.А., Нечитайло Т.Ю., Бумажкин Б.К., Кураков А.В., Голышин П.Н., Звягинцев Д.Г. Культивируемые микроорганизмы из пищеварительного



<sup>1</sup>ФГБНУ Всероссийский НИИ мясного скотоводства,  
460000 Россия, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29,  
e-mail: Sizova.L78@yandex.ru, vniims.or@mail.ru, vasilena56@mail.ru;  
<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Оренбургский государственный  
университет,  
460018 Россия, г. Оренбург, просп. Победы, 13,  
e-mail: gavrish.irina.ogu@gmail.com, lsv74@list.ru

Получила в редакцию  
14 июня 2016 года

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2017, V. 52, № 1, pp. 191-199

## EFFECT OF Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NANOPARTICLES ON SOIL MICROBIOCENOSIS, ANTIOXIDANT STATUS AND INTESTINAL MICROFLORA OF RED CALIFORNIAN WORM (*Eisenia foetida*)

E.V. Yausheva<sup>1</sup>, E.A. Sizova<sup>1, 2</sup>, I.A. Gavrish<sup>2</sup>, S.V. Lebedev<sup>2</sup>, F.G. Kayumov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>All-Russian Research Institute of Beef Cattle Breeding, Federal Agency of Scientific Organizations, 29, ul. 9 Yanvarya, Orenburg, 460000 Russia, e-mail Sizova.L78@yandex.ru, vniims.or@mail.ru, vasilena56@mail.ru;  
<sup>2</sup>Orenburg State University, 13, prosp. Pobedy, Orenburg, 460018 Russia, e-mail gavrish.irina.ogu@gmail.com, lsv74@list.ru

ORCID:

Sizova E.A. orcid.org/0000-0002-5125-5981

Gavrish I.A. orcid.org/0000-0002-9377-7673

Yausheva E.V. orcid.org/0000-0002-1589-2211

Kayumov F.G. orcid.org/0000-0001-9241-9228

Lebedev S.V. orcid.org/0000-0001-9485-7010

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported by Russian Science Foundation (grant № 14-36-00023)

Received June 14, 2016

doi: 10.15389/agrobiol.2017.1.191eng

### Abstract

With the accumulation of experimental data it is evident that nanomaterials, which are widely used in human activity, look promising for agronomy. However, available publications on a comprehensive assessment of biological risks arising from nanoherbicides, nanofertilizers, etc., in particular on how the metal nanoparticles affect geobionts, are very limited. In the model experiments with California red worms *Eisenia foetida* as test organisms we studied the influence of aluminum oxide nanoparticles on soil biocenosis and their biodegradation. We found an increase in mortality of worms up to 20 % at the maximum dosage of aluminum oxide nanoparticles introduced into the soil. Assay of antioxidant defense enzyme activity in the *E. foetida* revealed an increased superoxide dismutase and catalase level as influenced by the studied nanoparticles. The positive effect of their vermicomposting was shown. At increasing content of aluminum oxide nanoparticles (the nanoparticle dosage of 50, 100, 300, and 3000 mg/kg in the groups 1, 2, 3, and 4, respectively), the 61.7-67.6 % reduction in soil microorganism counts was found without vermicomposting vs. 55.6-61.3 % under vermicomposting. The number of microorganisms in the soil decreased in the groups 1, 2, 3 and 4 by 42.8, 52.4, 61.9 and 76.2 % for fungi, by 64.3, 77.9, 78.6 and 85.7 % for nitrogen-fixing bacteria, and by 22.7, 38.6, 84.1 and 86.4 % for bacteria cultured on starch-and-ammonia agar. The number of cellulolytic bacteria increased by 6.9 % in the group 1 and decreased by 16.7, 12.5 and 25.0 % in the groups 2, 3 and 4, respectively. A similar trend was observed under the influence of aluminum oxide nanoparticles on the *E. foetida* intestinal microflora. As the soil content of aluminum oxide nanoparticles increased from 50 to 3000 g/kg, the total number of microorganisms in the *E. foetida* intestine decreased by 9.7 to 43.2 %. In this, fungi decreased in the groups 1, 2, 3 and 4 by 18.0, 20.0, 39.0 and 40.0 % as compared to control. The number of nitrogen-fixing bacteria was insignificant in the control samples and decreased in the *E. foetida* intestine in the groups 1, 2, 3 and 4 by 16.0, 60.0, 78.8 and 80.0 %. The cellulolytic bacteria counts increased in the intestine of *E. foetida* (by 16.0 %) at minimum nanoparticle dosages, whereas in the groups 2, 3 and 4 this index was lower by 8.0, 32.0, 25.0 and 40.0 %. The number of bacteria cultured on starch-and-ammonia agar decreased in the *E. foetida* intestine in groups 1, 2, 3 and 4 by 13.3, 46.7, 60.0 and 73.3 %. Therefore, our data indicate dose-dependent effects of aluminum oxide nanoparticles and gradual development of their toxicity toward soil and intestinal microflora at increasing levels in the soil. The negative impact of the aluminum oxide nanoparticles on soil biocenosis was shown that was manifested in its depletion, leading to soil degradation and decreased fertility. We confirmed the necessity for complex assessment of nanoparticle biotoxicity in a variety of habitats. The antioxidant system activity in the presence of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles is indicative of *E. foetida* adaptability to stress caused by these agents.

Keywords: nanoparticles, *Eisenia foetida*, catalase, superoxide dismutase, microorganisms.