



## БИОЛОГИЯ

УДК 57.084.01

### ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ИОННОГО И КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА ДЛЯ МИКРОВОДОРОСЛИ *DUNALIELLA SALINA* В МИКРОПЛАНШЕТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЕ

Д. С. Чумаков, А. А. Голубев, С. А. Коннова, Л. А. Дыкман, В. А. Богатырев

Чумаков Даниил Сергеевич, аспирант кафедры биохимии и биофизики биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского. E-mail: laik2012@yandex.ru

Голубев Александр Андреевич, аспирант лаборатории иммунохимии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (Саратов). E-mail: zet111b@gmail.com

Коннова Светлана Анатольевна, заведующий кафедрой биохимии и биофизики, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, профессор, доктор биологических наук. E-mail: Konnovasa@yandex.ru

Дыкман Лев Абрамович, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (Саратов), доктор биологических наук. E-mail: dykman\_l@ibppm.ru

Богатырев Владимир Александрович, ведущий научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (Саратов), доктор биологических наук. E-mail: bogatyrev\_v@ibppm.ru

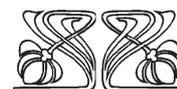
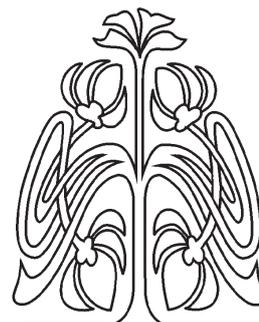
В настоящей работе проведено исследование токсичности ионного и коллоидного золота для солоноводной микроводоросли *Dunaliella salina*. Охарактеризовано влияние некоторых физико-химических параметров суспензий наночастиц на биологическую эффективность их действия. В качестве тест-функции использовалось содержание хлорофилла, определяемое *in vivo* спектрофотометрическим способом. Показано, что размер золотых наночастиц является важным параметром, определяющим их цитотоксичность.

**Ключевые слова:** токсикологическое тестирование, *Dunaliella salina*, золотые наночастицы.

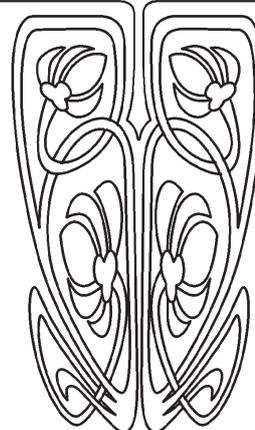
DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-3-305-311

Интерес к золотым наночастицам, обусловленный их уникальными физико-химическими свойствами, проявляется в широком применении данных структур в биомедицинских исследованиях [1], а также в различных отраслях промышленности. По оценке некоторых авторов [2], объем производства золотых наноматериалов в год уже составляет порядка 3 тонн, и намечается тенденция к значительному увеличению этой цифры в ближайшее время. В связи с этим важной задачей является оценка их биосовместимости и последствий воздействия на экосистемы.

При оценке влияния коллоидного золота на водные экосистемы большое внимание следует уделять микроводорослям, поскольку они являются первичными продуцентами и составляют основу трофической структуры водных биоценозов [3]. Однако к настоящему



НАУЧНЫЙ  
ОТДЕЛ





моменту опубликовано лишь несколько работ экотоксикологической направленности на данную тему. Исследованы токсические эффекты различных видов золотых наночастиц по отношению к пресноводным и солоноводным микроводорослям и проведена их токсикометрическая оценка [4–6]. Исследованы мутантные штаммы микроводоросли *Chlamidomonas reinhardtii*, у которых отсутствует клеточная стенка для оценки влияния данной структуры на чувствительность культуры к частицам, функционализированным дендримерами [7]. В публикации [8] показана возможность переноса цитратных золотых наночастиц в пищевой цепи от микроводорослей *Dunaliella salina* к моллюску *Mytilus gallo provincialis* и их биоаккумуляции. При постановке токсикологических тестов исследователи использовали различные инокуляционные дозы микроводорослей при посеве: от  $10^4$  [6] до  $30 \times 10^6$  [4] мл<sup>-1</sup>. Это затрудняет сравнение результатов экспериментов, описанных в разных публикациях между собой, поскольку увеличение посевной дозы, как правило, снижает чувствительность культуры к токсиканту [9].

Важное значение имеет исследование влияния размера частиц на их цитотоксичность в отношении микроводорослей. Данный параметр многими авторами рассматривается как один из ключевых факторов, определяющих биологическое действие коллоидного золота [10, 11]. С уменьшением размеров наночастиц увеличивается соотношение поверхностных и внутренних атомов. Поскольку химической активностью обладают только атомы поверхностного слоя, сколько-нибудь заметной цитотоксичности следует ожидать у частиц с соизмеримым количеством поверхностных и внутренних атомов. При параметре кристаллической решетки золота  $a = 0,47$  нм такими свойствами обладают наночастицы с размерами  $< 5$  нм. Параметр  $a$  представляет собой среднюю длину ребер элементарной кристаллической ячейки золота.

Интересным и весьма перспективным тест-объектом для экотоксикологических исследований является солоноводная микроводоросль *D. salina*. Представители данного вида являются основными и зачастую единственными автотрофными продуцентами в экосистемах гипергалинных водоемов, а также обладают биотехнологической ценностью [12]. Наряду с этим токсиколого-диагностическую значимость данного вида обуславливает устойчивость микроводорослей ко многим неблагоприятным факторам окружающей среды, уникальность строения (отсутствие плотной клеточной стенки [13]) и высокая скорость роста в культурах. В наших предыдущих работах было

показано, что флуоресцентно-микроскопическая оценка соотношения мертвых и живых клеток и фотометрическая характеристика изменения скорости роста *D. salina* позволяют оценить токсичность поллютантов различной химической природы [14, 15].

Целью настоящей работы являлась оценка уровня цитотоксичности различных препаратов ионного и коллоидного золота по отношению к *D. salina* и выявление роли некоторых физико-химических факторов (размер частиц, влияние дисперсионной среды), ее определяющих.

### Материалы и методы

#### Поддержание культуры микроводорослей

Культура микроводорослей *D. salina* Teod. IP-PASD-294 была получена из коллекции ИФР РАН. Для наращивания растительной биомассы использовали культуральную среду Ben-Amotz [16], включающую в свой состав набор компонентов в следующих концентрациях: NaCl 1,5 М; NaHCO<sub>3</sub> 50 мМ; KNO<sub>3</sub> 25 мМ; MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O 5 мМ; CaCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O 0,3 мМ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 мМ; ЭДТА 30 мкМ; FeCl<sub>3</sub> 2 мкМ; MnSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O 7 мкМ; CuCl<sub>2</sub> 1 мкМ; ZnSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O 1 мкМ; CoSO<sub>4</sub> 1 мкМ; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 1 мкМ; pH 8. Непосредственно перед инокуляцией раствор фильтровали через фильтр (0,22 мкм) Millipore (США).

Использовали трёхдневную культуру, находящуюся в начале стационарной стадии роста. Для экспериментов применяли частично синхронизированную культуру, полученную путем, как минимум, трех последовательных пересевов в 6 луночных планшетах (Biofilm, Китай).

#### Получение препаратов золота

Цитратные золотые наночастицы с размерами около 15 нм в диаметре (КЗ-15) получали по методу Френса [17], восстановлением HAuCl<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, США) с помощью цитрата натрия (Fluka, Швейцария) при кипячении. Полученные частицы функционализировали поливинилпирролидоном (ПВП). Исходный золь, содержащий 57,9 мг Au/л, концентрировали центрифугированием (15000 г, 10 минут) и редиспергированием осадка в супернатанте (10% от исходного объема жидкости).

Фосфиновое коллоидное золото (ФКЗ) с размерами частиц порядка 1-2 нм получали по методу Даффа [18] восстановлением HAuCl<sub>4</sub> хлоридом тетраакисгидроксиметилфосфония (Fluka, Швейцария) в щелочной среде (конечная концентрация 2 г Au/л). В качестве стабилизатора также использовали ПВП. Для отделения частиц дисперсной фазы от дисперсионной среды часть полученной суспензии фильтровали через центрифужный ультрафильтр Amicon (Millipore, США)



с порогом исключения по молекулярной массе 5 кДа посредством центрифугирования (7500 g, 15 минут). Концентрат частиц редиспергировали в водном растворе ПВП 20 мг/мл. Для получения более грубодисперсного золя к 1 мл суспензии ФКЗ добавляли 50 мкл 0,25 М лимонной кислоты и прогревали при 107 °С в течение 30 минут в герметично завинчивающейся пробирке Эппендорф.

Характеристику полученных нанопрепаратов осуществляли методами трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), абсорбционной спектроскопии и динамического рассеяния света.

#### Дизайн токсикологического эксперимента

Эксперименты проводили в культивационных 96-луночных планшетах с плоским дном (Biofilm, Китай). Первоначально в лунки вносили токсиканты, разведенные средой Ven-Amotz, в объеме 100 мкл в триплицированных концентрационных рядах. Тесты осуществляли при 7 концентрациях  $\text{HAuCl}_4$ , цитратного КЗ-15 и ФКЗ (10; 20; 30; 40; 60; 80; 100 мг Au/л). Также оценивали цитотоксичность отмытых фосфиновых золотых наночастиц, их дисперсионной среды и нанопрепаратов, полученных при нагреве суспензии ФКЗ в присутствии лимонной кислоты.

В каждую из лунок вносили по 100 мкл суспензии микроводорослей таким образом, чтобы при инокуляции концентрация клеток была порядка  $10^6$  кл  $\times$  мл<sup>-1</sup>. Далее планшеты инкубировали при постоянном освещении люминесцентными лампами дневного света, создающими поток 80–100 мкмоль фотонов  $\times$  м<sup>-2</sup>  $\times$  с<sup>-1</sup> и температуре  $23 \pm 2$  °С. Стандартное время экспозиции составляло 48 часов. В качестве тест-функции регистрировали содержание хлорофилла, которое оценивали фотометрическим измерением поглощения суспензий культур *D. salina*. Адекватность фотометрической оценки *in vivo* проверяли фотометрическим измерением поглощения хлорофилла в спиртовых экстрактах тех же культур. На основании измерений высоты пика поглощения хлорофилла в красной области рассчитывали полуэффективную концентрацию токсиканта ( $\text{EC}_{50_{48}}$ ) как 50%-ное содержание хлорофилла от контроля, выращенного в тех же условиях без поллютанта. Каждый токсикологический тест был воспроизведен три раза.

#### Экстракция хлорофилла

Экстракцию проводили на спин-колонках, изготовленных из 0,7 мл ПЦР пробирок (SSI, США). Суспензии клеток (200 мкл) количественно переносили на колонки и осаждали центрифугированием 50 г в течение 5 минут. Остаток среды «выжимали» кратковременным центрифугированием 10000 г в течение 30 с. Фильтраты удаляли и в каждую сепарационную пробирку добавляли по

100 мкл 80%-ного этанола. Операцию повторяли 3 раза при тех же режимах центрифугирования. Экстракты переносили обратно в лунки и хранили в темноте до измерения.

#### Фотометрические измерения и обработка данных

Все измерения проводили на планшетном спектрофотометре Spark 10 M (Tecan, Швейцария) в режиме регистрации спектров экстинкции 400–800 нм с шагом 1 нм в цикле 3 измерений с интервалом 3 минуты после 7-минутной темновой адаптационной паузы. Для вычисления поглощения хлорофилла *in vivo* в суспензиях культур *D. salina* использовали высоту пика 680 нм, скорректированную на величину неселективного ослабления по значениям ближайших локальных минимумов 640 и 740 нм. Значения данных контрольных точек усредняли по пяти соседним длинам волн и трем временам измерений. Расчет величины поглощения осуществляли по формуле:  $A_{680} = (E_{680} - E_{740}) - (E_{640} - E_{740}) \times 0,6$ . Высоту пика поглощения хлорофилла в экстрактах культур микроводорослей рассчитывали по формуле:  $A_{665} = E_{665} - E_{725}$ . В каждой экспериментальной пробе рассчитывали величину эффективности действия токсиканта по формуле:  $\text{Eff} = (1 - (A_{680}C / A_{680}C_0)) \times 100$ , где  $A_{680}(C)$  – значение поглощения хлорофилла в экспериментальной пробе,  $A_{680}(C_0)$  – значение поглощения хлорофилла в контрольной пробе. На основании данных значений методом линейной интерполяции в окрестностях  $\text{Eff} = 50$  рассчитывали  $\text{EC}_{50_{48}}$ .

Статистический анализ полученных данных проведен с использованием пакета прикладных компьютерных программ Microsoft excel 2007. Полученные данные представлены в виде средней арифметической и её стандартного отклонения ( $M \pm SD$ ). О достоверности межгрупповых различий судили по параметрическому критерию Стьюдента (*t*-тест) для количественных показателей с нормальным распределением. Проверка статистических гипотез осуществлялась при критическом уровне значимости  $p < 0,05$ .

#### Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлена диаграмма, отражающая фотометрическую оценку эффективности действия препаратов ионного и коллоидного золота на культуры *D. salina* при 48-часовой экспозиции.

Эффективность действия токсиканта фактически представляет собой изменение содержания хлорофилла в экспериментальной пробе по сравнению с контрольной. Положительное значение данной величины отражает снижение содержания

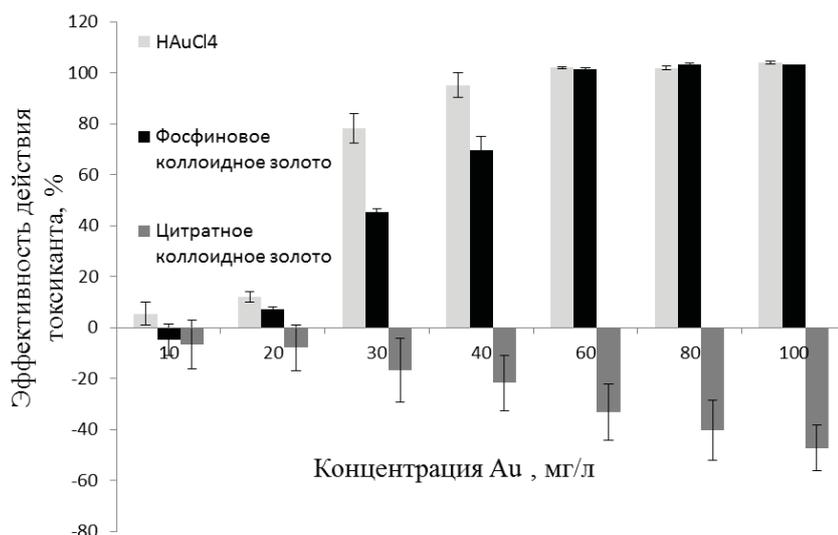


Рис. 1. Фотометрическая оценка эффективности действия препаратов ионного и коллоидного золота на культуры *D. salina* при 48-часовой экспозиции

хлорофилла в экспериментальных пробах, а отрицательное – увеличение. Препараты  $\text{HAuCl}_4$  и ФКЗ проявляли сходную цитотоксичность по отношению к культурам *D. salina*. Ионное золото оказывало несколько более выраженный токсический эффект по сравнению с ФКЗ при концентрациях 30 и 40 мг Au/л. Рассчитанные значения  $\text{EC}_{50}$  составляют  $25,8 \pm 0,3$  мг Au/л для золотохлористоводородной кислоты и  $32,2 \pm 1,1$  мг Au/л для фосфиновых золотых частиц. Препараты КЗ-15 не обладали токсичностью вплоть до концентраций 100 мг Au/л. Полученные результаты в принципе соответствуют отмеченной в ряде работ тенденции, заключающейся в том, что для фито- и зоопланктона ионы металлов значительно более токсичны, чем металлические наночастицы размерного диапазона 10–100 нм [2, 19]. К настоящему моменту отсутствуют работы, посвященные оценке биосовместимости ультрамалых золотых наночастиц с микроводорослями. В исследовании Рап с соавторами [10] на примере четырех линий животных клеток показано, что по данным МТТ-теста значение ингибирующей концентрации  $\text{IC}_{50}$  для 1,4 нм фосфиновых золотых частиц составило 30–56  $\mu\text{M}$  для различных типов клеток. При этом 15 нм коллоидное золото не оказывало цитотоксического эффекта даже при концентрациях, превышающих указанные в 100 раз.

Цитратные золотые наночастицы при всех концентрациях оказывали стимулирующее воздействие на культуры микроводорослей, проявляя эффект гормезиса. Аналогичное наблюдение для стабилизированных ПВП золотых наночастиц по отношению к микроводоросли

*Raphidocelis subcapitata* отмечается в работе [6]. Измерения *in vivo* примерно на 10–20 % превышают степень выраженности гормонального эффекта в пробах с концентрациями КЗ-15 выше 40 мг Au/л по сравнению с оценкой содержания хлорофилла в экстрактах тех же культур. Это, по всей видимости, связано с оптической интерференцией в спектральной области 678–682 нм, обусловленной агрегацией золотых наночастиц. Значения поглощения хлорофилла в суспензиях и экстрактах культур, экспонированных с ФКЗ, достоверно не отличаются.

На рис. 2 представлена сравнительная характеристика токсических эффектов фосфиновых нанокластеров и их дисперсионной среды. Фракции частиц и супернатанта, полученные после ультрафильтрации, разбавляли одинаковым образом и экспонировали с культурами *D. salina* в течение 48 часов. При всех разведениях, исключая самое малое, отмытые частицы и их дисперсионная среда проявляли схожую токсичность для микроводорослей. Потенциальными источниками цитотоксичности в дисперсионной среде могут являться ионы золота, а также некоторые интермедиаты (формальдегид, метанол), образующиеся при синтезе частиц [18]. Стоит отметить, что эффективность действия дисперсионной среды на микроводоросли зависит от того, когда был синтезирован используемый в эксперименте препарат ФКЗ. На рис. 2 представлены результаты эксперимента с препаратом, срок хранения которого составлял 2–3 дня. С увеличением продолжительности хранения золь цитотоксичность дисперсионной среды снижалась.

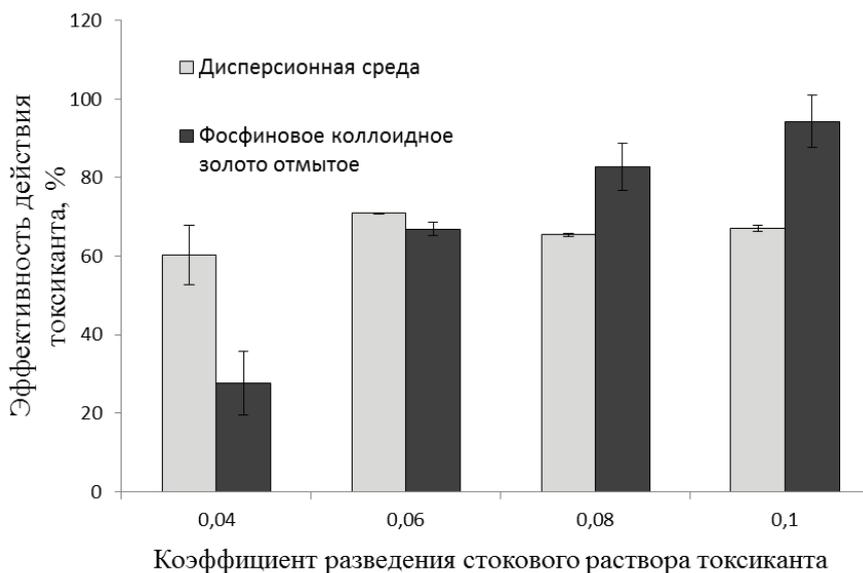
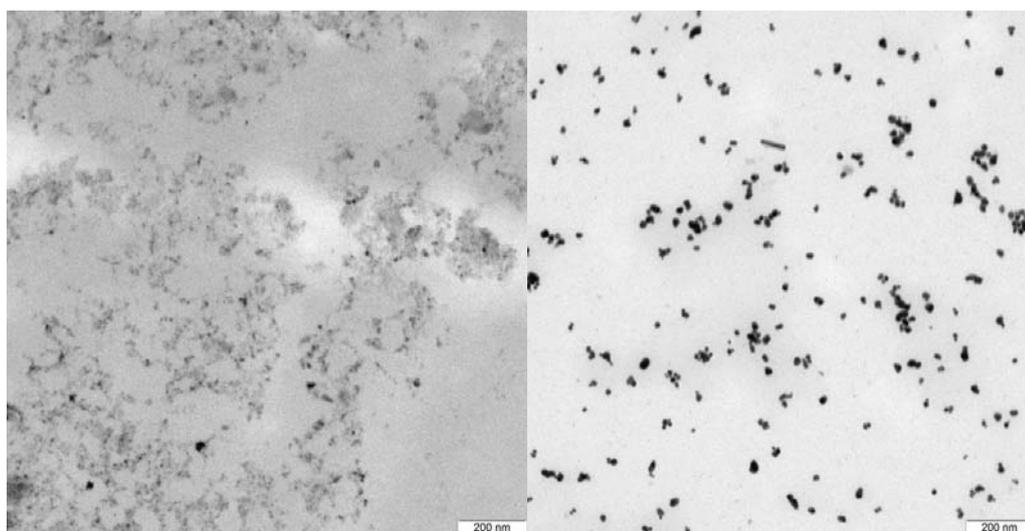


Рис. 2. Оценка эффективности действия препарата отмывтых фосфиновых золотых наночастиц и их дисперсионной среды на культуры *D. salina* при 48-часовой экспозиции

Для дальнейшего исследования влияния размера частиц на проявляемую ими токсичность препарат отмывтого от дисперсионной среды ФКЗ прогревали в течение 30 минут при 107 °С в присутствии лимонной кислоты. По данным ТЭМ, средний диаметр частиц при такой манипуляции увеличивался до 17–22 нм (рис. 3). Как показано на рис. 4, подобное увеличение размера частиц практически полно-

стью нивелировало их токсический эффект. С целью дифференциации размерного эффекта от возможной антидотной активности лимонной кислоты оценивали цитотоксичность препарата ФКЗ, выдержанного в присутствии того же количества лимонной кислоты без нагрева. Эффективность действия данного препарата существенно не отличалась от исходного ФКЗ при всех концентрациях.



*a*

*б*

Рис. 3. ТЭМ-изображения препаратов фосфинового коллоидного золота: *a* – препарат частиц отмывтых от дисперсионной среды; *б* – препарат, полученный в результате нагрева суспензии частиц при 107 °С в присутствии лимонной кислоты

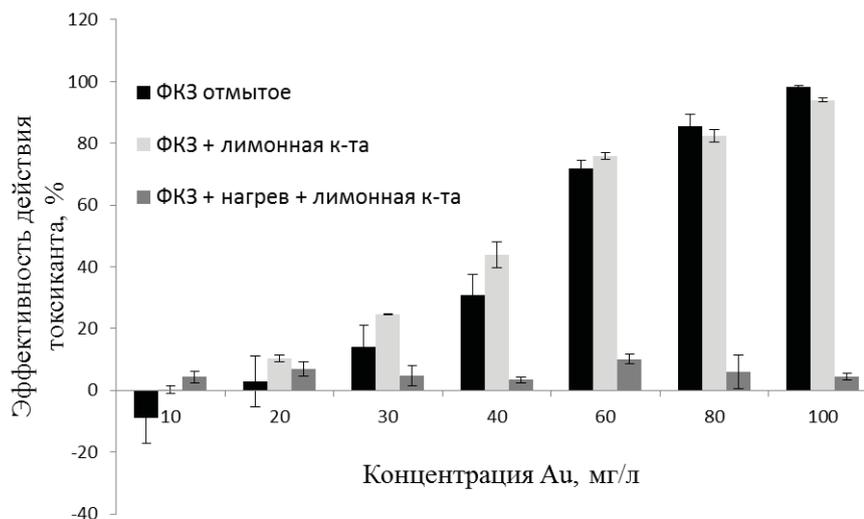


Рис. 4. Оценка эффективности действия различных препаратов фосфинового коллоидного золота на культуры *D. salina* при 48-часовой экспозиции

Таким образом, в нашей работе продемонстрировано, что токсические эффекты золотохлористоводородной кислоты и фосфинового коллоидного золота для микроводоросли *D. salina* существенно не отличаются и значительно превосходят таковые цитратных золотых наночастиц. Показано также, что дисперсионная среда и отмытый от нее препарат ФКЗ обладают сходной токсичностью при одинаковых разведениях. Установлено, что размер частиц является важным параметром, определяющим цитотоксичность коллоидного золота.

Выражаем благодарность научному сотруднику лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН канд. хим. наук А. М. Бурову за помощь в выполнении электронно-микроскопических исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 16-04-00520).

#### Список литературы

1. Dykman L., Khlebtsov N. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives // Chem. Soc. Rev. 2012. Vol. 41, № 6. P. 2256–2282.
2. Moreno-Garrido I., Perez S., Blasco J. Toxicity of silver and gold nanoparticles on marine microalgae // Mar. Environ. Res. 2015. Vol. 111. P. 60–73.
3. Baker T. J., Tyler C. R., Galloway T. S. Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms // Environ. Pollut. 2014. Vol. 156. P. 257–271.
4. Renault S., Baudrimont M., Mesmer-Dudons N., Gonzalez P., Mornet S., Brisson A. Impacts of gold nanoparticle exposure on two freshwater species: a phytoplanktonic alga (*Scenedesmus subspicatus*) and a benthic bivalve (*Corbicula fluminea*) // Gold Bulletin. 2008. Vol. 41, № 2. P. 116–126.
5. Hoecke K. van, De Schamphelaere K. A., Ali Z., Zhang F., Elsaesser A., Rivera-Gil P., Parak W. J., Smagghe G., Howard C. V., Janssen C. R. Ecotoxicity and uptake of polymer coated gold nanoparticles // Nanotoxicology. 2013. Vol. 7, № 1. P. 37–47.
6. Dedkova K., Bures Z., Palarcik J., Vlcek M., Kukutschova J. Acute toxicity of gold nanoparticles to freshwater green algae // Proc. of NanoCon. 2014. URL: <http://nanocon2014.tanger.cz/files/proceedings/20/reports/3286.pdf> (дата обращения: 18.04.2017).
7. Perreault F., Bogdan N., Morin M., Claverie J., Popovic R. Interaction of gold nanoglycodendrimers with algal cells (*Chlamydomonas reinhardtii*) and their effect on physiological processes // Nanotoxicology. 2012. Vol. 6, № 2. P. 109–120.
8. Larginho M., Correia D., Diniz M. S., Baptista P. V. Evidence of one-way flow bioaccumulation of gold nanoparticles across two trophic levels // J. Nanopart. Res. 2014. Vol. 16. P. 2549–2560.
9. Franklin N. M., Stauber J. L., Apte S. C., Lim R. P. Effect of initial cell density on the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays // Environ. Toxicol. Chem. 2002. Vol. 21, № 4. P. 742–751.
10. Pan Y., Neuss S., Leifert A., Fischler M., Wen F., Simon U., Schmid G., Brandau W., Jahnke-Dechent W. Size dependent cytotoxicity of gold nanoparticles // Small. 2007. Vol. 3, № 11. P. 1941–1949.
11. Khlebtsov N., Dykman L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies // Chem. Soc. Rev. 2011. Vol. 40, № 3. P. 1647–1671.
12. Oren A. The ecology of *Dunaliella* in high-salt environments // J. Biol. Res. 2014. Vol. 21, № 1. P. 23–31.
13. Масюк Н. П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliellateod.* и перспективы его практического использования. Киев: Наук. думка, 1973. 245 с.
14. Богатырев В. А., Голубев А. А., Селиванов Н. Ю., При-



- лепский А. Ю., Букина О. Г., Пылаев Т. Е., Bibikova O. A., Дыкман Л. А., Хлебцов Н. Г. Лабораторная тест-система оценки токсичности наноматериалов для микроводоросли *Dunaliella salina* // Рос. нанотехнологии. 2015. Т. 10, № 1–2. С. 92–99.
15. Golubev A. A., Prilepskii A. Y., Dykman L. A., Khlebtsov N. G., Bogatyrev V. A. Colorimetric evaluation of the viability of the microalga *Dunaliella salina* as a test tool for nanomaterial toxicity // *Toxicol. Sci.* 2016. Vol. 151, № 1. P. 115–125.
16. Shaish A., Mavron A., Ben-Amotz A. Effect of inhibitors on the formation of stereoisomers in the biosynthesis of  $\beta$ -carotene in *Dunaliella bardawil* // *Plant Cell Physiol.* 1990. Vol. 31, № 5. P. 689–696.
17. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // *Nature Phys. Sci.* 1973. Vol. 241. P. 20–22.
18. Duff D. G., Baiker A., Edwards P. P. A new hydrosol of gold clusters. 1. Formation and particle size variation // *Langmuir.* 1993. Vol. 9. P. 2301–2309.
19. Botha T. L., James T. E., Wepener V. Comparative aquatic toxicity of gold nanoparticles and ionic gold using a species sensitivity distribution approach // *J. of Nanomaterials.* 2015. Vol. 2015. P. 16–32.

#### Cytotoxicity Evaluation of Ionic and Colloidal Gold on the Microalga *Dunaliella Salina* in Microplate Test System

D. S. Chumakov, A. A. Golubev, S. A. Konnova,  
L. A. Dykman, V. A. Bogatyrev

Daniil S. Chumakov, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, laik2012@yandex.ru

Alexandr A. Golubev, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Prospekt Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, zet111b@gmail.com

Svetlana A. Konnova, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, Konnovasa@yandex.ru

Lev A. Dykman, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Prospekt Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, dykman\_l@ibppm.ru

Vladimir A. Bogatyrev, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Prospekt Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, bogatyrev\_v@ibppm.ru

Gold nanoparticles are intensively studied in biomedicine. Evaluation of their biocompatibility is highly important. In aquatic systems, microalgae, being the primary producers, are the base of the trophic webs. They are the first target for most of the pollutants present in the medium. To study the toxicity of ionic and colloidal gold on the saltwater microalga *Dunaliella salina*. To describe several physicochemical characteristics of nanomaterials that affect their toxicological efficiency. Cytotoxicity of  $\text{HAuCl}_4$ , 15 nm citrate gold nanoparticles and 1–2 nm phosphine-stabilized gold nanoclusters was assessed. Chlorophyll content as a test-function was used. Spectrophotometric method for chlorophyll determination *in vivo* in suspensions of *D. salina* cultures was applied. Calculated EC50 48h value of ionic gold was  $25,8 \pm 0,3$  mg Au/L. EC50 value of phosphine-stabilized gold nanoclusters was  $32,2 \pm 1,1$  mg Au/L. It was not possible to calculate EC50 for citrate gold nanoparticles, as they were non-toxic at all concentrations used. Toxic effect of phosphine-stabilized gold nanoclusters disappeared after heating the suspension ( $107^\circ\text{C}$ ; 30 min) in the presence of citric acid. It was shown that gold nanoparticles size is an important parameter underlying their cytotoxicity.

**Key words:** toxicology testing, *Dunaliella salina*, gold nanoparticles.

**Acknowledgements:** This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 16-04-00520).

#### Образец для цитирования:

Чумаков Д. С., Голубев А. А., Коннова С. А., Дыкман Л. А., Богатырев В. А. Оценка цитотоксичности ионного и коллоидного золота для микроводоросли *Dunaliella Salina* в микропланшетной тест-системе // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2017. Т. 17, вып. 3. С. 305–311. DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-3-305-311.

#### Cite this article as:

Chumakov D. S., Golubev A. A., Konnova S. A., Dykman L. A., Bogatyrev V. A. Cytotoxicity Evaluation of Ionic and Colloidal Gold on the Microalga *Dunaliella salina* in Microplate Test System. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2017, vol. 17, iss. 3, pp. 305–311 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-3-305-311.