УДК 581.17+58.01/07

Є.О. КОНОТОП, М.С. КОВАЛЕНКО, В.З. УЛИНЕЦЬ,
А.О. МЕЛЕШКО, Л.М. БАЦМАНОВА, Н.Ю. ТАРАН

Навчально-науковий центр «Інститут біології», Київський національний університет імені Тараса Шевченка
E-mail: golovatyuk.yevgeniya@gmail.com

# ДОСЛІДЖЕННЯ ФІТОТОКСИЧНОСТІ КОЛОЇДНИХ РОЗЧИНІВ МЕТАЛОВМІСНИХ НАНОЧАСТИНОК

*За допомогою стандартної тест-системи Allium cepa (L.) досліджено фітотоксичність колоїдних розчинів металовмісних наночастинок – Ag, Cu, Fe, Zn, Mn. Токсичність дослідних розчинів на рівні організму оцінювали за показником приросту біомаси коренів цибулі, а цитотоксичність – за проліферативною активністю клітин кореневої меристеми. Встановлено, що колоїдні розчини деяких металовмісних наночастинок гальмують ріст коренів Allium cepa (L.), що може бути наслідком їхньої здатності проникати всередину клітини і взаємодіяти з її компонентами, пригнічуючи мітоз. Згідно з отриманими результатами цитотоксичність дослідних розчинів зменшується в наступному порядку: Cu≥Zn>Ag≥Fe. Розчин, в якому є наночастинки з вмістом Mn, сприяв збільшенню приросту коренів.*

***Ключові слова:*** *Allium-тест, колоїдні розчини металовмісних наночастинок, цитотоксичність.*

**Вступ.** Нанотехнології – галузь, яка швидко розвивається й істотно впливає на економіку, суспільство, навколишнє середовище. Сьогодні дослідження в цій галузі зосереджені переважно на застосуванні їх в електроніці, енергетиці, медицині, природничих науках [1]. Отриманий досвід у цих сферах діяльності сприяє впровадженню змін в технології сільського господарства. Розвиток нанопристроїв та наноматеріалів дає поштовх для їхнього застосування у біотехнології рослин та агровиробництві. Наприклад, створення препаратів наночастинок металів та їхніх оксидів застосовують у захисті рослин і техніці «точного» землеробства [2]. Внаслідок цього є неминучим вивільнення істотної кількості наночастинок в навколишнє середовище. Потенційний вплив нанооб'єктів на біоту екосистем потребує ретельного вивчення. Частинки нанорозмірів виявляють специфічну токсичність і зазвичай є шкідливішими порівняно з матеріалами більшого розміру [3]. Є дані стосовно того, що наночастинки типу фулеренів, вуглецевих нанотрубок і оксидів металів токсичні для клітин людини, гризунів та мікроорганізмів [4, 5]. Проте даних про потенційну токсичність наночастинок щодо вищих рослин досі недостатньо, оскільки в науковій літературі повідомлялося як про позитивний, так і негативний їхній влив [6, 7].

Рослини як незамінний компонент будь-якої екосистеми відіграють вирішальну роль у накопиченні та подальшому обігу наночастинок у ланцюгах живлення. Саме тому для визначення токсичності різноманітних матеріалів, зокрема і наночастинок металів, широко використовують рослинні тест-об'єкти [8–10]. Поміж них провідне місце займає *Allium*-тест, показники якого (приріст коренів, проліферативна активність клітин меристеми, зміна плоїдності ядер, поява хромосомних аберацій, обмінів між сестринськими хроматидами) широко використовують для оцінки токсичності різноманітних речовин вже з 20-х років XX століття [11]. Фітотоксичність металовмісних наночастинок ще недостатньо вивчена, особливо з огляду на механізми їх поглинання та дії в організмі рослини. Крім того, за результатами наших попередніх досліджень з'ясовано, що металовмісні наночастинки здатні проникати в рослину [12]. Тому метою даної роботи було дослідити токсичність колоїдних розчинів металовмісних (Ag, Fe, Mn, Cu, Zn) наночастинок на клітинному та рівні цілісного організму за допомогою стандартної тест-системи *Allium cepa* (L.).

**Матеріали і методи.** У роботі досліджували фітотоксичність колоїдних розчинів металовмісних наночастинок. Розчини розроблені кафедрою технології конструкційних матеріалів і матеріалознавства Національного університету біоресурсів і природокористування України й отримані за допомогою диспергування

© Є.О. КОНОТОП, М.С. КОВАЛЕНКО, В.З. УЛИНЕЦЬ, А.О. МЕЛЕШКО, Л.М. БАЦМАНОВА, Н.Ю. ТАРАН, 2014

**Рис. 1.** Клітини меристеми коренів *Allium cepa* (L.) у різні фази мітозу. Зб. 400

**Характеристика колоїдних розчинів металовмісних наночастинок**

| Метал | Концентрація наночастинок у маточному розчині, мг/л | Середній діаметр наночастинок, нм | Фазовий склад наночастинок |
|---|---|---|---|
| Ag | 150 | 30–50 | Ag, $Ag_2O$ |
| Cu | 200 | 100–150 | Cu, CuO, $Cu_2O$ |
| Fe | 300 | 20–30 | Fe, $Fe_2O_3$, $Fe_3O_4$ |
| Zn | 150 | 30–50 | Zn, ZnO |
| Mn | 150 | 20–30 | Mn, $Mn_3O_4$, $Mn_2O_7$ |

гранул заліза, міді, мангану, цинку та срібла імпульсами електричного струму амплітудою 100–2000 А у воді [13]. У роботі використовували розчини, розведені в 100 разів. Характеристика колоїдних розчинів наведена в таблиці.

Фітотоксичність розчинів металовмісних наночастинок вивчали за допомогою стандартної рослинної тест-системи *Allium cepa* (L.) [14]. Для цього на розчинах наночастинок впродовж 4 днів культивували по 10 каліброваних за масою цибулин сорту Халцедон. Контрольні рослини вирощували на дистильованій воді. По закінченні часу експозиції вираховували індекс толерантності (ІТ, %) за ростовою реакцією коренів цибулі [15]

$$\text{ІТ} = \frac{\text{Маса (довжина) коренів дослідного варіанта}}{\text{Маса (довжина) коренів контрольного варіанта}} \cdot 100\ \%.$$

Для розрахунку ІТ брали до уваги середні значення маси та довжини коренів усіх цибулин – загалом 13–18 коренів з кожної цибулини. Цитотоксичність дослідних розчинів оцінювали за проліферативною активністю клітин меристеми коренів. Для цього обчислювали мітотичний індекс (МІ, %), в якому на загальну кількість клітин (3000) враховували клітини в стані поділу

$$\text{МІ} = \frac{\text{П} + \text{М} + \text{А} + \text{Т}}{\text{І} + \text{П} + \text{М} + \text{А} + \text{Т}} \cdot 100\ \%,$$

де П, М, А, Т, І – кількість клітин у про-, мета-, ана-, тело- та інтерфазі [16].

Зафіксовані у розчині Кларка ($C_2H_5OH$ : $CH_3COOH$ = 3 : 1) корені цибулі після мацерації у 45%-й оцтовій кислоті фарбували ацетокарміном [17]. Із апікальних частин коренів готували тимчасові давлені препарати, які аналізували під світловим мікроскопом при збільшенні об'єктива ×40, окуляра ×10 (рис. 1).

Біологічна повторність кожного експерименту трикратна. Аналітична повторність цитологічних вимірювань – 4–5-кратна. Математичну обробку даних проводили методом дисперсійного аналізу [18]. Дані вважали достовірними за критерієм Ст'юдента при рівні значущості $P < 0,05$ – $P < 0,001$.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Останнім часом з'являється все більше публікацій стосовно взаємодії металовмісних наночастинок із рослинним організмом, причому можна знайти свідчення як позитивного, так і негативного їхнього впливу на ріст і розвиток різних видів рослин [19, 20]. Це свідчить про дискусійність проблеми оцінки потенційної фітотоксичності наноматеріалів та підкреслює необхідність всебічного її вивчення.

Коренева система рослини першою вступає у взаємодію з численними речовинами, що знаходяться в навколишньому середовищі – воді чи ґрунті. Спостереження за особливостями кореневої системи цибулі *Allium cepa* (L.) підтвердило, що ця рослина є найбільш чутливою до різноманітних забруднювачів довкілля [14]. Результати наших досліджень свідчать, що додавання у середовище культивування колоїдних розчинів наночастинок з вмістом мангану, заліза та міді впливало на приріст біомаси коренів цибулі, причому розчин наночастинок з

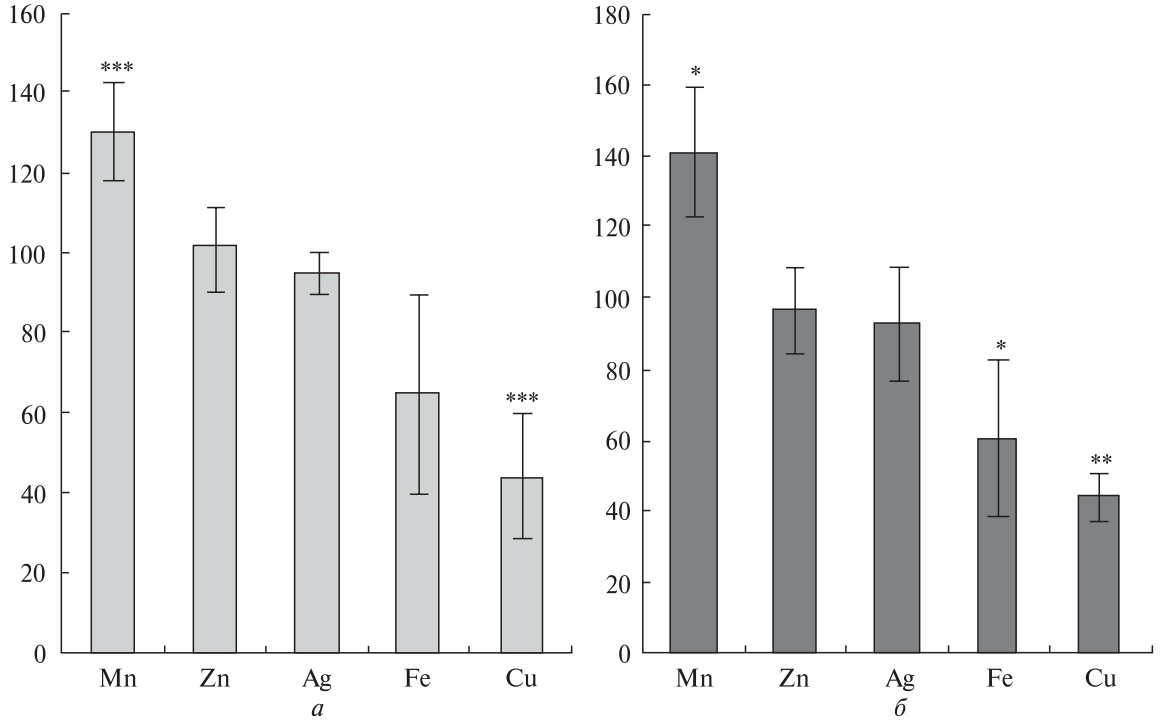


**Рис. 2.** Індекс толерантності *Allium cepa* (L.) (по вертикалі) за умов культивування на колоїдних розчинах металовмісних наночастинок. ІТ (%) розрахований: *а* – за довжиною; *б* – за масою коренів цибулі. Контроль складає 100 %. Тут і далі: * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001

вмістом мангану сприяв приросту коренів (їх біомаса збільшувалася на 30 % порівняно з контролем), а розчини з наночастинками, що містили залізо та мідь, навпаки, пригнічували їхній ріст на 46 та 77 % відповідно (рис. 2).

Ростова реакція коренів цибулі за умов дії розчинів наночастинок з вмістом цинку та срібла достовірно не змінювалася і була на рівні контрольних значень. ІТ за довжиною та масою коренів виявилися рівноцінними і показали аналогічні результати для всіх дослідних розчинів (виключення становив колоїдний розчин наночастинок із вмістом заліза), що узгоджується з поняттям росту як інтегрального показника фізіологічного стану рослини. Тобто за ІТ на рівні цілісного організму фізіологічну реакцію рослин на дію наночастинок мангану можна оцінити як позитивну, цинку та срібла – нейтральну, заліза й міді – негативну. Brunner et al. [21] припускають, що причиною токсичності наночастинок металів та їхніх оксидів може бути розчинення вивільнених іонів металів із наночастинок до або після проникнення їх всередину клітини. Проте за результатами *Allium*-тесту у дослідженнях Kumari et al. [10] для наночастинок оксидів металів була показана вища фітотоксичність, ніж для розчинених іонів тих самих металів. Гальмування росту коренів може відбуватися внаслідок не тільки хімічної токсичності наночастинок, а й їхнього фізичного впливу на транспортні шляхи клітини. Наприклад, пригнічення апопластного та симпластного транспорту може відбуватися завдяки блокуванню міжклітинного простору або плазмодесм, оскільки під час перенесення наночастинки мають властивість утворювати агрегати, що сприяє збільшенню їхніх розмірів [22]. Отже, на основі даних, отриманих на рівні організму, достовірно фітотоксичним виявився колоїдний розчин Cu-вмісних наночастинок, тоді як розчин Mn-вмісних наночастинок, навпаки, сприяв збільшенню біомаси коренів (на 30 та 40 % за довжиною та масою відповідно).

Для забезпечення повнішої інформації щодо фітотоксичності дослідних розчинів провели мікроскопічне дослідження клітин меристеми

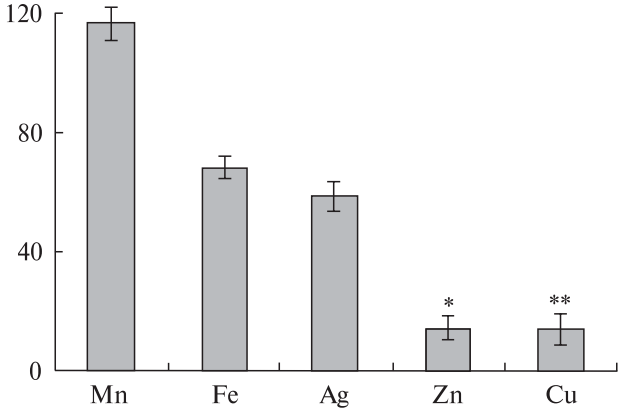


**Рис. 3.** Проліферативна активність клітин меристеми коренів цибулі (по вертикалі – MI, %) під дією колоїдних розчинів металовмісних наночастинок. Контроль становить 100 %

коренів цибулі. Дія колоїдних розчинів металовмісних наночастинок за показником мітотичного індексу показана на рис. 3.

Пригнічення проліферативної активності клітин меристеми коренів цибулі порівняно з контролем спостерігали за умов впливу всіх, за виключенням Mn-вмісних, дослідних розчинів наночастинок, проте за умов дії розчину наночастинок з вмістом мангану показник MI *Allium*-тесту достовірно не відрізнявся від контролю. Пригнічення MI вказує на потенційну цитотоксичну дію металовмісних наночастинок, зокрема міді, цинку, срібла та заліза. Порушення нормального перебігу клітинного циклу відбувається внаслідок блокування мітозу під час інтерфази через пригнічення синтезу ДНК та білків, або ж зміни тривалості мітотичного циклу, а саме збільшення часу перебування клітини в синтетичній фазі [10, 23]. У науковій літературі серед проявів цитотоксичної дії найбільш досліджених наночастинок металів та їхніх оксидів (оксиди цинку та срібла) найчастіше згадують злипання хромосом під час анафази та телофази мітозу, що відбувається, ймовірно, за рахунок деградації/деполімеризації хромосомної ДНК [9]. Пригнічення проліферативної активності клітин меристеми коренів цибулі на 32 та 42 % виявили за умов впливу розчинів Fe- та Ag-вмісних наночастинок відповідно. В літературі є дані щодо токсичної дії розчинів металовмісних наночастинок. Зокрема, зазначено низьку токсичність колоїдних розчинів з наночастинками оксиду заліза за показником індексу проростання для рослин салату, огірків, томатів та шпинату, тоді як фізіологічні та кластогенні порушення у клітин *Allium cepa* (L.) (злипання, поламки хромосом, порушення метафази, дезинтеграція клітинної стінки) спостерігали тільки за умов високої концентрації в розчині наночастинок срібла (100 ppm) [9, 24].

Найсуттєвіше пригнічення MI (на 86 %) в *Allium*-тесті за результатами даної роботи показано для дослідного розчину наночастинок з вмістом міді, що раніше спостерігали й на інших видах рослин. Наприклад, Lee et al. [25] за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа підтвердили здатність наночастинок із вмістом міді проходити крізь клітинну мембрану як у однодольних, так і дводольних рослин.

Отже, з огляду на результати аналізу проліферативної активності клітин меристеми коренів *Allium cepa* (L.) досліджувані колоїдні розчини металовмісних наночастинок за потенційною цитотоксичністю слід розташувати наступним чином: Cu ≥ Zn > Ag ≥ Fe, тоді як розчин Mn-вмісних наночастинок достовірно не впливав на показник MI. Відмінності у токсичності розчинів наночастинок з вмістом заліза та цинку, які зазначені при врахуванні показників приросту біомаси коренів та мітотичної активності їхніх клітин, можна пояснити компенсаторними механізмами, а саме росту коренів розтягненням в умовах пригнічення швидкості поділу клітин [26].

**Висновки.** Результати наших досліджень показали, що колоїдні розчини деяких металовмісних наночастинок гальмують ріст коренів *Allium cepa* (L.). Це може бути наслідком їхньої здатності проникати всередину рослини і взаємодіяти з її внутрішньоклітинними компонентами, що і призводить до пригнічення поділу клітин. Цитотоксичність досліджуваних розчинів зменшується в ряду Cu ≥ Zn > Ag ≥ Fe і не була показана для розчинів Mn-вмісних наночастинок. Отже, механізми фітотоксичності металовмісних наночастинок залишаються мало вивченими, хоча, безсумнівно, вони тісно пов'язані з хімічним складом, структурою, розмірами наночастинок та площею їхньої поверхні [20]. Надалі дана проблема потребує детальніших досліджень.

*Роботу виконано за фінансової підтримки Державного агентства з питань науки, інновацій та інформатизації України (за договором № ДЗ/493-2011 від 29 вересня 2011 р.).*

*Ye.O. Konotop, M.S. Kovalenko, V.Z. Ulynets, A.O. Meleshko, L.M. Batsmanova, N.Yu. Taran*

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine
E-mail: golovatyuk.yevgeniya@gmail.com

## PHYTOTOXICITY OF COLLOIDAL SOLUTIONS OF METAL-CONTAINING NANOPARTICLES

Phytotoxicity of colloidal solutions of metal-containing nanoparticles (Ag, Cu, Fe, Zn, Mn) has been investigated using a standard *Allium cepa* (L.) test system. Toxicity of experimental solutions at the organism level was evaluated in terms of biomass growth of onion roots, and cytotoxicity was estimated by the mitotic index of root meristem cells. The colloidal solutions of metal nanoparticles inhibited the growth of *Allium cepa* (L.) roots due to their ability to penetrate into cells and interact with their components, and thus to inhibit mitosis. According to our results cytotoxicity of test solutions decreases in the following order: Cu ≥ Zn > Ag ≥ Fe. Solution of Mn-containing nanoparticles revealed physiological activity according to root growth reaction.

*Е.А. Конотоп, М.С. Коваленко, В.З. Улинец, А.А. Мелешко, Л.М. Бацманова, Н.Ю. Таран*

## ИССЛЕДОВАНИЕ ФИТОТОКСИЧНОСТИ КОЛЛОИДНЫХ РАСТВОРОВ МЕТАЛЛОСОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦ

С помощью стандартной тест-системы *Allium cepa* (L.) исследовали фитотоксичность коллоидных растворов металлосодержащих наночастиц – Ag, Cu, Fe, Zn, Mn. На организменном уровне токсичность исследуемых растворов оценивали по показателю прироста биомассы корней лука, а цитотоксичность – по пролиферативной активности клеток корневой меристемы. Выявлено, что коллоидные растворы металлосодержащих наночастиц тормозят рост корней *Allium cepa* (L.) вследствие их способности проникать внутрь клетки, взаимодействовать с ее компонентами и таким образом угнетать митоз. Согласно полученным результатам цитотоксичность исследуемых растворов убывает в следующем ряду: Cu ≥ Zn > Ag ≥ Fe. Раствор, содержащий наночастицы Mn, оказался физиологически активным по показателю прироста корней.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Caruthers S.D., Wickline S.A., Lanza G.M.* Nanotechnological applications in medicine // Curr. Opin. Biotechnol. – 2007. – **18**. – P. 26–30.
2. *Scrinis G., Lyons K.* The emerging nano-corporate paradigm: nanotechnology and the transformation of nature, food and agri-food systems // Int. J. Sociol. Food Agric. – 2007. – **15**. – P. 22–44.
3. *Donaldson K., Stone V., MacNee W.* The toxicology of ultrafine particles // Particulate matter properties and effects upon health / Eds A.L. Maynard, C.V. Howards. – Oxford : Bios, 1999. – P. 115.
4. *Jia G., Wang H., Yan L. et al.* Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene // Environ. Sci. Technol. – 2005. – **39**, № 5. – P.1378.
5. *Soto K.F., Carrasco A., Powell T.G. et al.* Comparative in vitro cytotoxicity assessment of some manufactured nanoparticulate materials characterized by transmission electron microscopy // J. Nanopart. Res. – 2005. – **7**. – P. 145.
6. *Kahru A., Dubourguier H.C., Blinova I. et al.* Biotests and biosensor for ecotoxicology of metal oxide nanoparticles: a minireview // Sensors. – 2008. – **8**. – P. 5153–5170.
7. *Ruffini Castiglione M., Cremonini R.* Nanoparticles and higher plants // Caryologia. – 2009. – **62**. – P. 161–165.
8. *Gubbins E.J., Batty L.C., Lead J.R.* Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* (L.) // Environ. Pollut. – 2011. – **159**, № 6. – P. 1551–1559.
9. *Kumari M., Mukherjee A., Chandrasekaran N.* Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa* // Sci. Total Environ. – 2009. – **407**. – P. 5243–5246.
10. *Kumari M., Sudheer Khan S., Pakrashi S. et al.* Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa* // J. Haz. Mat. – 2011. – **190**. – P. 613–621.
11. *Grant W.F.* Chromosome aberration assays in *Allium* // Mutat. Res. – 1982. – **99**, № 3. – P. 273–291.
12. *Таран Н.Ю., Бацманова Л.М., Лопатько К.Г. та ін.* Вплив неіонного колоїдного розчину наночасток біогенних металів на вміст елементів металів у рослинних тканинах // Фізика живого. – 2011. – **19**, № 2. – С. 9–11.
13. *Лопатько К.Г., Афтанділянц Є.Г., Каленська С.М., Тонха О.Л.* Спосіб отримання неіонного колоїдного розчину металів. – Патент на винахід № 38459 від 12.01.2009 // Бюл. – 2009. – № 1.
14. *Fiskesjo G.* The *Allium*-test as a standard in environmental monitoring // Hereditas. – 1985. – **102**. – С. 99–112.
15. *Wilkins D.A.* The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root length // New Phytol. – 1978. – **80**. – P. 623–633.
16. *Fiskesjo G. Allium*-test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters // Plants for environmental studies / Eds W. Wang, J.W. Gorsuch, J.S.

Hughes. – New York : CRC Lewis Publ., 1997. – P. 308.
17. *Паушева З.П.* Практикум по цитологии растений. – М.: Агропромиздат, 1988. – 271 с.
18. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
19. *Lin D., Xing B.* Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth // Environ. Pollut. – 2007. – **150**. – P. 243–250.
20. *Lin D., Xing B.* Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles // Environ. Sci. Technol. – 2008. – **42**. – P. 5580–5585.
21. *Brunner T.J., Wick P., Manser P. et al.* In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility // Environ. Sci. Technol. – 2006. – **40**. – P. 4374–4381.
22. *Nair R., Varghese S.H., Nair B.G. et al.* Nanoparticulate material delivery to plants // Plant Sci. – 2010. – **179**. – P. 154–163.
23. *McLeod R.D.* Some effects of 2,4,5-trichlorophenoxy acetic acid on the mitotic cycle of lateral root apical meristems of *V. faba* // Chromosoma. – 1969. – **27**. – P. 227.
24. *Garcia A., Espinosa R., Delgado L et al.* Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests // Desalination. – 2011. – **269**. – P. 136–141.
25. *Lee W.-M., An Y.-J., Yoon H., Kweon H.-S.* Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to terrestrial plants *Phaseolus radiatus* (mung bean) and *Triticum aestivum* (wheat); plant agar test for water-insoluble nanoparticles // Environ. Toxicol. Chem. – 2008. – **27**. – P. 1915–1921.
26. *Ктиторова И.Н., Скобелева О.В., Агальцов К.Г.* Информативность биофизических параметров при выяснении причин торможения роста корней в стрессовых условиях // Физиология растений. – 2011. – **58**, № 6. – С. 1–9.

Надійшла 27.07.12