

ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ИОНОВ, НАНО- И МИКРОЧАСТИЦ ЖЕЛЕЗА И МЕДИ В ТЕСТЕ ПРОРАСТАНИЯ СЕМЯН *TRITICUM AESTIVUM*

В тесте прорастания семян *Triticum aestivum* оценена биологическая активность эквимольярных концентраций ионов, нано- и микрочастиц Cu и Fe. Показано, что характеризуемый величинами EC_{50} уровень фитотоксичности в наибольшей степени выражен у соединений меди по сравнению с соединениями железа, а также возрастает в ряду "микрочастицы > наночастицы > ионы". Установлена наиболее выраженная реакция корневой системы проростков пшеницы на воздействии исследуемых токсикантов.

Ключевые слова: железо, медь, наночастицы, фитотоксичность.

Наночастицы металлов в настоящее время становятся важным продуктом инновационной науки и техники с широкими перспективами использования в промышленности, сельском хозяйстве и медицине [1]. Сказанное уже в ближайшей перспективе позволяет ожидать резкого увеличения объемов производства наночастиц титана, цинка, церия, алюминия, вольфрама, кобальта, никеля, алюминия, серебра, золота, железа и меди, призванных привести к существенному техническому прогрессу и преобразованию целых областей современной экономики. Одновременно это формирует риски поступления значительных количеств наноматериалов в окружающую среду с накоплением в абиотических средах и компонентах биоты [2], тем самым определяя актуальность задачи прогнозирования и оценки эффектов наночастиц металлов в живых системах с разработкой соответствующих стандартов безопасности.

Одним из возможных путей решения данной задачи является использование методов биотестирования, в отличие от физико-химического анализа позволяющих получать представления об обобщенной (интегральной) реакции живых систем на действие неблагоприятных факторов, а также характеризовать направленность и скорость происходящих изменений [3]. При этом введенные в действие национальные нормативы по медико-биологической оценке безопасности наноматериалов [4] в качестве одного из рекомендуемых объектов для биотестирования называют семена высших растений, изменение всхожести и морфологических признаков которых, появление аномалий в развитии и другие признаки представляются информативными параметрами, позволяющими оценить эффекты наночастиц в почвенно-растительных биоценозах.

Адекватность подобного подхода подтверждена результатами исследования влияния наночастиц Al_2O_3 , Fe_3O_4 и ZnO на развитие *Arabidopsis thaliana* [5], данными о фитотоксичности наночастиц алюминия и цинка в отношении семян кукурузы

(*Zea mays*), редиса (*Raphanus sativus*), рапса (*Brassica napus napus*) и огурца (*Cucumis sativus*) [6], а также эффектами наночастиц Ag, Cu и ZnO на прорастание семян и изменение биомассы тыквы (*Cucurbita pepo*) [7, 8]. При этом полученные данные позволили комплексно оценить степень токсического действия того или иного наноматериала на использованные тест-объекты и определить диапазоны его биологически безопасных концентраций.

В этой связи задачей настоящего исследования явилось сравнительное изучение биологической активности наночастиц Fe и Cu с ионами и микрочастицами данных металлов в тесте прорастания семян пшеницы *Triticum aestivum*, рекомендуемом для заявленных целей действующим национальным нормативом [4].

При проведении исследования использованы наночастицы Fe и Cu, полученные методом высокотемпературной конденсации на установке «Ми-Тен» [9] и любезно предоставленные д.б.н. Н.Н. Глушенко (Институт энергетических проблем химической физики РАН, Россия). Предварительное изучение морфологии данных частиц на сканирующем электронном микроскопе JSM 7401F («JEOL», Япония) характеризовало их как сферические образования размером 80 ± 15 нм и 103 ± 2 нм соответственно [10, 11]. В свою очередь использование методов рентгеновской дифрактометрии и мессбауровской спектроскопии позволило идентифицировать на поверхности наночастиц оксидную пленку из Fe_3O_4 , β - Fe_2O_3 и γ - Fe_2O_3 или CuO, составляющую 15% и 4% от их массы [12]. В качестве сравниваемых соединений использованы соли $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ и $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ категории ч.д.а. («Ленреактив», Россия), а также коммерчески доступные образы сферических микрочастиц железа («Aldrich», Германия) и меди («Alfa Aesar», Германия) с частотой 99,5% и размерами 10 мкм и 40 мкм соответственно. Для создания растворов солей или суспензий нано- и микрочастиц их навески в количестве, соответствующем 0,1 М, по-

мещали в стеклянные емкости, куда вносили по 10 мл химически чистой дистиллированной воды, после чего интенсивно диспергировали путем обработки ультразвуком частотой 35 кГц в источнике ванного типа «Сапфир ТТЦ» (ЗАО ПКФ «Сапфир», Россия) в течение 30 мин.

Объектом воздействия ионов, нано- и микрочастиц Cu и Fe являлись семена яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* сорт «Учитель», соответствующие 1 классу, не обработанные протравителями и удостоверенные соответствующими документами. Предназначенные для проращивания семена предварительно прогревали при температуре 30-40°C в течение 5-7 суток в термостате.

В качестве субстрата для биотестирования использовали кварцевый песок, который промывали и просеивали на ситах для получения фракции 0,5-2,0 мм. С целью удаления примесных элементов песок замачивали в 10% растворе HCl в течение 24 ч, после чего 20-кратно промывали дистиллированной водой до достижения нейтрального значения pH, контролируемого с использованием анализатора жидкости «Эксперт-001» (ООО «Эконикс-эксперт», Россия). Песок повторно высушивали и просеивали, после чего прокачивали в сушильном шкафу при температуре 130°C в течение 1 часа.

Непосредственно перед проведением исследований готовили 4-кратные разведения растворов солей или суспензий нано- и микрочастиц в дистиллированной воде с концентрациями от 0,1 М до 0,00039 М, которыми увлажняли образцы песка до полной влагоемкости, заранее определенной по ГОСТ 12038-84. В качестве контролей использовали образцы песка, увлажненные тем же количеством дистиллированной воды. По 30 семян на каждый анализируемый образец помещали на поверхность песка, после чего заглубляли на их толщину так, чтобы поверхность семян была на одном уровне с поверхностью субстрата. Подготовленные подобным образом опытные и контрольные пробы помещали в термостат на проращивание в отсутствие освещенности при темпе-

ратуре +20±2°C и влажности воздуха 80±5%. Через 14 суток инкубации семена извлекали и оценивали их всхожесть, а также длину сформировавшихся корней и побегов, рассчитывая средние значения для каждой пробы.

Все эксперименты выполнены не менее чем в трех повторностях и обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета компьютерных программ «Statistica» V8 («StatSoft Inc.», США). При расчете эффективных концентраций исследуемых соединений (EC_{50}), вызывающих 50% снижение анализируемых параметров использована специализированная программа «LD₅₀ (ver. 0.2)» (НПП «Наука Плюс», Россия).

Полученные результаты позволили продемонстрировать выраженные зависимости регистрируемых проявлений фитотоксичности Fe и Cu от природы исследуемых металлов, их действующих форм и концентраций.

Так инкубация семян *Triticum aestivum* в контакте с ионами железа в концентрации 0,1 М полностью подавляла их пророст, а в концентрации 0,025 М снижала частоту прорастания до 13,3±6,8% против 98,3±2,6% в контроле ($P<0,001$), в то время как дальнейшее уменьшение до 0,0625 М и ниже полностью снимало указанный эффект. Еще более выраженные изменения могли быть констатированы при анализе размерных характеристик побегов и корней проростков. В частности, концентрация ионов железа 0,025 М полностью блокировала развитие корневой системы, одновременно почти десятикратно сокращая длину побега: до 7,0±1,1 мм против 66,3±4,6 мм в контроле ($P<0,05$). В свою очередь концентрация ионов железа 0,0625 М снижала длину корней до 16,0±0,1 мм против 221,4±21,3 мм, а длину побега в два раза по сравнению с соответствующим контролем: до 38,6±2,5 мм ($P<0,05$). Соответственно, рассчитанные на данной основе значения EC_{50} , характеризующие описанные проявления фитотоксичности ионов железа (таблица 1), свидетельствовали об увеличении выраженности эффекта в ряду «всхожесть

Таблица 1. Значения токсикологического параметра EC_{50} (М), определенные при оценке влияния различных форм Fe и Cu на проращивание семян *Triticum aestivum*

Металлы и их исследуемые формы		Исследуемые параметры		
		Всхожесть семян	Длина побега	Длина корня
Fe	ионы	0,017	0,0063	0,0033
	наночастицы	>0,1	>0,1	>0,1
	микрочастицы	>0,1	>0,1	>0,1
Cu	ионы	0,004	0,0035	0,0002
	наночастицы	>0,1	>0,1	0,0017
	микрочастицы	>0,1	>0,1	0,0067

КОНТРОЛЬ CuSO_4 Си-наночастицы Си-микрочастицы



Рисунок 1. Эффекты ионов-, нано- и микрочастиц меди в концентрации 0,1М на морфологию проростков семян *Triticum aestivum*

семян (0,017М) > длина побега (0,0063М) > длина корня (0,0033М)».

На этом фоне использование идентичных концентраций нано- и микрочастиц Fe достоверно не сказывалось на частоте прорастания семян, в подобных случаях составившей 90,0-93,3% и 96,7-100,0% соответственно. Аналогичный результат получен и при исследовании размерных характеристик побегов и корней, в используемом диапазоне концентраций даже имеющих некоторую тенденцию к увеличению. Сказанное позволило охарактеризовать тестируемые образцы как нефитотоксичные, что нашло свое отражение при расчете соответствующих величин EC_{50} (таблица), а также хорошо согласовывалось с известными данными по этому вопросу. В частности, выявленная при обработке нано- и микрочастицами Fe умеренная стимуляция параметров прорастания *Triticum aestivum* подтверждает целесообразность проведения предпосевной обработки семян данными соединениями, в оптимальных дозах дающей от 5 до 30% повышения урожайности и улучшения товарного вида растительной продукции [13].

Проведение аналогичных исследований с использованием ионов, нано- и микрочастиц Си свидетельствовало о проявлении ими более высокого уровня фитотоксичности (рисунок 1).

При этом вновь наибольшая активность регистрировалась у ионной формы данного металла (таблица), выражено подавляющего частоту всхожести семян *Triticum aestivum* ($EC_{50}=0,004\text{M}$), а также достоверно уменьшающего длину формирующихся побегов ($EC_{50}=0,0035\text{M}$) и корней ($EC_{50}=0,0002\text{M}$), что в 2-4-16 раз превышало величины подобной активности у ионов железа (см. выше). В свою очередь нано- и микрочастицы Си, не оказавшие достоверного влияния на частоту прорастания семян и длину побегов (последние из которых при использовании микрочастиц имели тенденцию к увеличению), также выражено подавляли формирование корневой системы, что характеризовалось соответствующими значениями $EC_{50}=0,0017\text{M}$ и $0,0067\text{M}$ (таблица). Таким образом, полученные результаты, с одной стороны, позволили подтвердить закономерность увеличения фитотоксического эффекта металлов в ряду «всхожесть семян > длина побега > длина корня», а с другой – при анализе последнего параметра констатировать рост подобной активности соединений меди в ряду «микрочастицы > наночастицы > ионы».

Полученные результаты хорошо корреспондируются с недавними наблюдениями группы исследователей из университета Нью-Хейвена (Коннектикут, США) [7, 8], также указывающими на выраженную фитотоксичность наночастиц Си, сопоставимую с таковой у соединений Ag. Одновременно накапливается все больше экспериментальных данных о том, что основной «мишенью» для наночастиц металлов является именно корневая система растений, что диктует интерес к выявлению механизмов подобной фитотоксичности, в том числе с акцентом на исследование митотических процессов в меристеме, определяющих рост корня в длину. С другой стороны, следует отметить существенное совпадение полученных результатов с результатами ранее проведенного нами исследования биологической активности ионов, нано- и микрочастиц Си и Fe в тесте ингибирования бактериальной биолюминесценции [14]. Сказанное определяет возможность использования данных о тонких механизмах токсичности названных соединений, получаемых с использованием бактериальных моделей, для объяснения характера их действия в отношении высших растений. Решению обозначенных задач будут посвящены наши дальнейшие исследования.

15.09.2011

Список литературы:

1. Рынок нано: от нанотехнологий – к нанопродуктам / под ред. Г.Л. Азоева. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2011. – 319 с.
2. Gottschalk F., Sonderer T., Scholz R.W., Nowack B. Modeled environmental concentrations of engineering nanoparticles (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions // Environ. Sci. Technol. – 2009. – V.43. – P. 9216-9222.
3. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование / под ред. О.П. Мелехова, Е.И. Сарapultычева. – М.: Издательский центр «Академия». – 2010. – 288 с.

4. Методические указания 1.2.2635-10 // Медико – биологическая оценка безопасности наноматериалов. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2010. – 123 с.
5. Lee C.W., Mahendra S., Zodrow K. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana* // Environ. Toxicol. Chem. – 2010. – V.29. – №3. – P. 669-675.
6. Lin D. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth // Environ. Pollut. – 2007. – V.150. – №2. – P. 243-250.
7. Stampoulis D., Saion K., White S., White J. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants // Environ. Sci. Technol. – 2009. – V.43. – №24. – P. 9473–9479.
8. Musante C., White J.C. Toxicity of silver and copper to *Cucurbita pepo*: differential effects of nano and bulk-size particles // Environ. Toxicol. – 2010. – DOI 10.1002/tox.20667.
9. Ген М.Я., Миллер А.В. Авторское свидетельство СССР №814432. Бюллетень изобретений. – 1981. – № 11. – С. 25.
10. Арсентьева И.П., Зотова Е.С., Фолманис Г.Э. и др. Аттестация наночастиц металлов, используемых в качестве биологически активных препаратов // Нанотехника. – 2007. – №10. – С. 72-77.
11. Арсентьева И.П., Байтукалов Т.А., Глушенко Н.Н., Зотова Е.С., Сидорова Е.П., Богословская О.А., Дзидзигури Э.Л. Аттестация и применение в медицине наночастиц меди и магния // Материаловедение. – 2007. – №4. – С. 54-57.
12. Арсентьева И.П., Зотова Е.С., Фолманис Г.Э. и др. Аттестация и применение наночастиц металлов в качестве биологически активных препаратов // Нанотехника. Спец. Выпуск. Нанотехнологии-медицине. – 2007. – №2 (10). – С. 72-77.
13. Коваленко Л.В., Фолманис Г.Э. Биологически активные нанопорошки железа. – М.: Наука. – 2006. – 124 с.
14. Дерябин Д.Г., Алешина Е.С., Дерябина Т.Д., Ефремова Л.В. Биологическая активность ионов, нано- и микрочастиц Cu и Fe в тесте ингибирования бактериальной биолюминесценции // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2011. – №6. – С. 31-36.

Сведения об авторе: **Дерябина Татьяна Дмитриевна**, аспирант Института биоэлементологии
Оренбургского государственного университета
Оренбург, пр. Победы, д. 13, корп. 16, ауд. 306, e-mail: DeriabinaTatiana@yandex.ru

UDC 58.084.1; 546.72 + 546.56

Deryabina T.D.

Orenburg state university, e-mail: DeriabinaTatiana@yandex.ru

THE STUDY OF IONS, NANO- AND MICRO-SIZED CU AND FE PARTICLES BIOSAFETY IN TRITICUM AESTIVUM SEEDS GERMINATION TEST

In *Triticum aestivum* seeds germination test the influence of equimolar concentrations of ions, nano- and micro-sized Cu and Fe particles has been investigated. The EC50 phytotoxicity level is much more exhibited on copper compared to the iron and dramatically increased at row line "microparticles > nanoparticles > ions". The most expressed reaction of wheat sprouts root system to influence of investigated toxicants is established.

Key words: iron, copper, nanoparticles, phytotoxicity