

УДК 57.084/57.026.8/57.044

О. П. Ольхович, Н. Ю. Таран

**ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ДЕЙСТВИЯ
НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ НА РОСТОВЫЕ
ПРОЦЕССЫ ПЛЕЙСТОФИТОВ¹**

Исследовано влияние коллоидных растворов наночастиц металлов на морфологию, рост, размножение и цитофизиологические процессы высших водных растений — плейстофитов (*Limnobium stoloniferum* и *Lemna minor*). Показано стимулирующее действие наночастиц Mn, Fe + Mn и ингибирующее — Zn, Cu, Fe, Zn + Cu и Ag. Проведена сравнительная оценка влияния наночастиц и ионов металлов на примере Cu и Zn.

Ключевые слова: наночастицы металлов, высшие водные растения, плейстофиты, рост, цитофизиология.

Нанотехнологии являются стратегическим направлением экономического развития большинства ведущих стран, о чем свидетельствуют объёмы финансирования этой отрасли. К сожалению, стремительное развитие нанотехнологий существенно опережает оценку воздействия нанопроductов на окружающую среду. В связи с этим очень важным вопросом представляется достижение баланса между насущной необходимостью обеспечения прогресса в производстве и внедрении новых продуктов нанотехнологий и безусловным обеспечением их безопасности использования. Именно поэтому вопросы, связанные с поведением наноматериалов и их влиянием на живые организмы и экосистемы, требуют самого пристального внимания и серьёзных исследований. Считается, что применение наночастиц в растениеводстве может значительно уменьшить количество металлов, попадающее в природные экосистемы, и снизить техногенную нагрузку на них. Вместе с тем получены данные о токсичности наночастиц металлов для живых организмов, которая может зависеть от способа измельчения, размера частиц, химической природы, растворимости в воде, концентрации и других факторов [2, 7, 8]. Известно, что наночастицы цинка, меди и серебра токсичны [6], в отличие от других металлов, оказывающих исключительно положительный эффект.

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного агентства по вопросам науки, инноваций и информатизации Украины (договор № ДЗ/493-2011 от 29 сентября 2011 г.).

© О. П. Ольхович, Н. Ю. Таран, 2014

Негативному воздействию наночастиц подвержены и водные организмы. Имеются данные, что оно снижает продуктивность гидробионтов, вызывает различные физиологические изменения, нарушения поведения и повышенную смертность [9]. Результаты исследования фитотоксичности наночастиц металлов неоднозначны [6—8], информация о механизмах их проникновения, аккумуляции и трансформации в органах и клетках растений отсутствует. Таким образом, попадание наночастиц металлов в природные водные экосистемы может вызывать разнонаправленные эффекты: с одной стороны — развитие водных растений и изменение видовой структуры фито- и зооценозов, с другой — общее снижение продуктивности или же её повышение у отдельных стойких видов, что приводит к изменению состава доминантов и эдификаторов и нарушению равновесия. Экологическая оценка влияния коллоидных растворов наночастиц металлов на плейстофиты представляет особый интерес, поскольку эти растения обитают на поверхности воды и взаимодействуют одновременно с водной и воздушной средой.

Целью работы было сравнить влияние наночастиц и ионов металлов на рост, морфологические характеристики, продуктивность, развитие и внутриклеточные процессы плейстофитов, а также оценить их потенциальную опасность для водных фитоценозов.

Материал и методика исследований. Объектами исследований были два вида плавающих на поверхности воды растений (неукореняющихся плейстофитов): ряска малая (*Lemna minor* L.) — растение с овальными листецами диаметром 1,5—2,5 мм (сем. Lemnaceae) и лимнобиум побегоносный (*Limnobium stoloniferum* (GFW Meyer) Grisebach) — растение с округлыми глянцевыми листьями диаметром 2—3 см (сем. Hydrocharitaceae). Культуры были выращены в аквакомплексе ННЦ «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко. Растения культивировали в аквариумах объёмом 40—60 л на отстоянной водопроводной воде при оптимальных условиях: освещение (верхнее) 6000 лк, температура воды 18—22°C, pH 5—8.

В модельных экспериментах растения экспонировали в течение 14 сут в сосудах объёмом 0,5 л, заполненных отстоянной водопроводной водой с добавлением неионных коллоидных растворов наночастиц металлов, их бинарных композиций или ионов в контролируемых условиях (освещение 5000 лк 10 ч/сут, температура воды 22—27°C, температура воздуха 20—25°C).

В исследованиях использованы коллоидные растворы наночастиц металлов, разработанные кафедрой технологии конструкционных материалов и материаловедения Национального университета биоресурсов и природопользования Украины, и полученные диспергированием гранул железа, меди, марганца, цинка и серебра импульсами электрического тока с амплитудой 100—2000 А в воде [3]. Диапазон размеров полученных частиц был достаточно узким, максимальный размер не превышал 100 нм. Концентрации наночастиц металлов в маточных растворах были следующими: Mn — 151 мг/дм³, Fe — 132, Cu — 75 и Zn — 89 мг/дм³. Для экспериментов маточ-

ные растворы наночастиц разводили водой в соотношении 1 : 100. В композициях доза каждого металла была уменьшена в два раза. Концентрация цинка и меди в ионной форме составляла 1 (соответственно 0,01 и 0,001 мг/дм³), 10 и 100 ПДК_{рыбхоз}.

Схема эксперимента включала: 1) контроль (отстоянная водопроводная вода), 2) наночастицы отдельных металлов (Mn, Fe, Zn, Cu, Ag), 3) бинарные композиции (Fe + Mn, Cu + Zn), 4) ионы Zn²⁺ (ZnSO₄) и Cu²⁺ (CuSO₄).

Количество листецов (общее, новообразовавшихся, отмерших) у *L. minor* подсчитывали на 3-и, 6-е и 9-е сутки, поскольку в норме оно удваивается каждые трое суток. У *L. stoloniferum* массу растений, количество листьев, корней, особей и новообразовавшихся дочерних растений определяли на 1-е, 7-е и 14-е сутки.

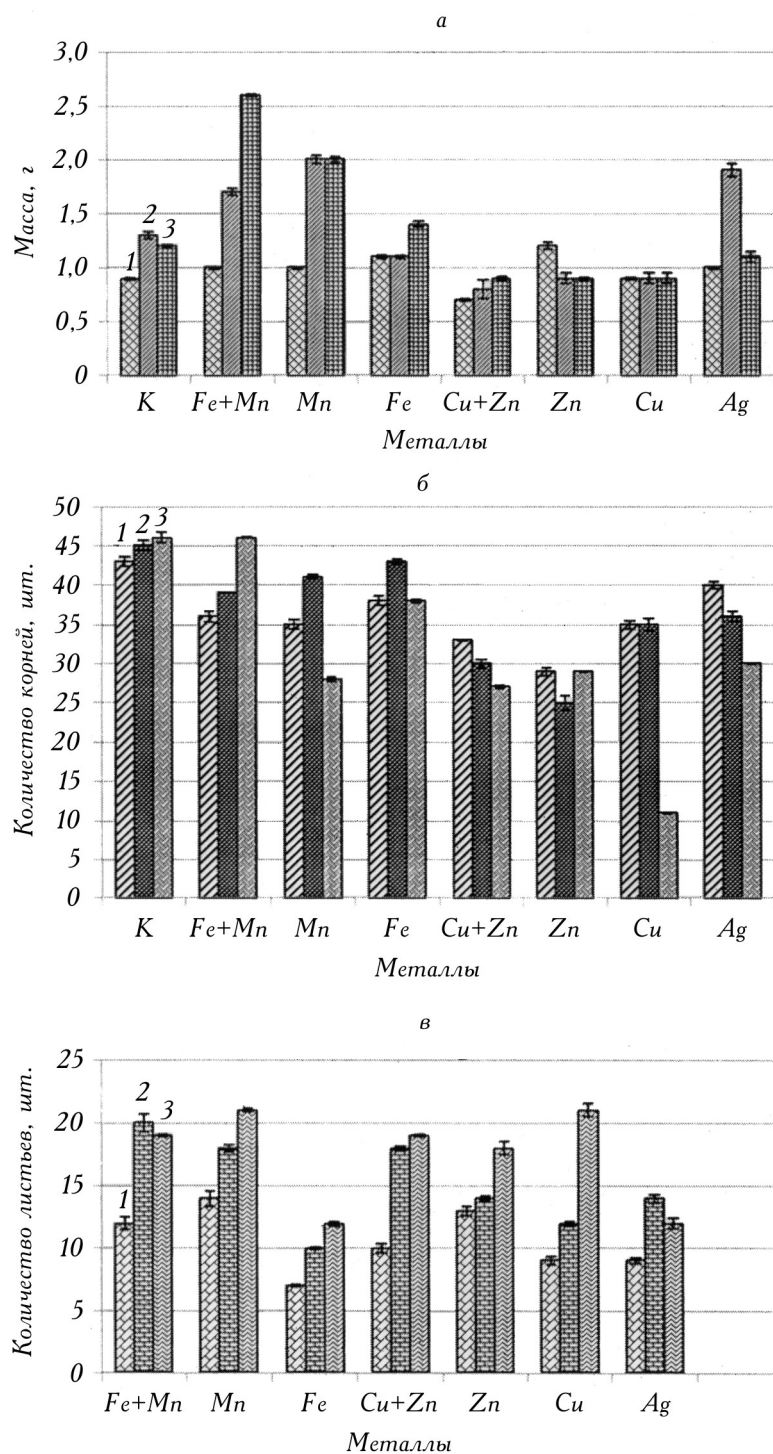
Изменение интенсивности окрашивания клеток и степень отложения красителя в гранулы в клетках корней *L. stoloniferum* устанавливали с помощью витального красителя — нейтрального красного (0,01%-й водный раствор) [4]. Экспозиция в растворах наночастиц и ионов металлов равнялась одним суткам, в растворах красителей — одному часу. Препараты анализировали с использованием светового микроскопа марки МБИ-15. Математическую обработку данных проводили методом дисперсионного анализа [1].

Результаты исследований и их обсуждение

Полученные результаты показали, что наночастицы отдельных металлов и их бинарных композиций оказывали как стимулирующее, так и сильно ингибирующее влияние на водные растения (рис. 1).

На 7-е сутки эксперимента все растения *L. stoloniferum* имели нормальные размеры, ярко-зелёный цвет, блестящую глянцевую поверхность листьев, хорошо развитую корневую систему бледно-зелёного цвета. Масса растений в контроле и во всех опытных вариантах возросла. Под воздействием Mn масса и количество корней достоверно увеличились, возросло общее количество особей, корни были нормальными, достаточно длинными и разветвлёнными. Образовались новые дочерние растения, которые нормально развивались и имели ярко-зелёный цвет листьев. Таким образом, негативно-го влияния Mn на 7-е сутки эксперимента не было. Под действием наночастиц Fe масса растений уменьшилась, листья были интенсивно зелёного цвета, корни в нормальном состоянии и имели такие же размеры, как в контрольном варианте, однако количество листьев и корней по сравнению с контролем уменьшилось.

Под воздействием композиции Fe + Mn взрослые особи развивались нормально, дочерние растения сохраняли ярко-зелёную окраску, корни визуально стали более тонкими, хотя их количество увеличилось. В то же время возросла масса исходных растений, увеличилось количество листьев, а также количество розеток за счет дочерних особей. Таким образом, наночастицы Mn и Fe + Mn стимулировали рост растений, а Fe — ингибировали.



1. Масса (а), количество корней (б) и количество листьев (в) *Linnobium stoloniferum* под воздействием наночастиц металлов. Здесь и на рис. 2: 1 — 1-е, 2 — 7-е, 3 — 14-е сутки.

Под действием Cu листья и корни исходных растений частично отмирали, листья дочерних растений обесцвечивались. Композиция Cu + Zn также вызывала негативные эффекты. Уже на 7-е сутки новые корни не образовывались, а количество старых, в связи с отмиранием, уменьшилось на 9%, а на 14-е сутки их стало на 18% меньше, чем на первые.

Под воздействием Ag листья исходных растений оставались светло-зелёного цвета, а дочерние обесцвечивались и у них постепенно отмирали корни. Масса растений, изначально увеличившаяся на 7-е сутки почти вдвое, на 14-е уменьшилась до исходного значения, количество корней постепенно уменьшалось: на 7-е сутки на 10, а на 14-е — на 25% по сравнению с исходными показателями (см. рис. 1).

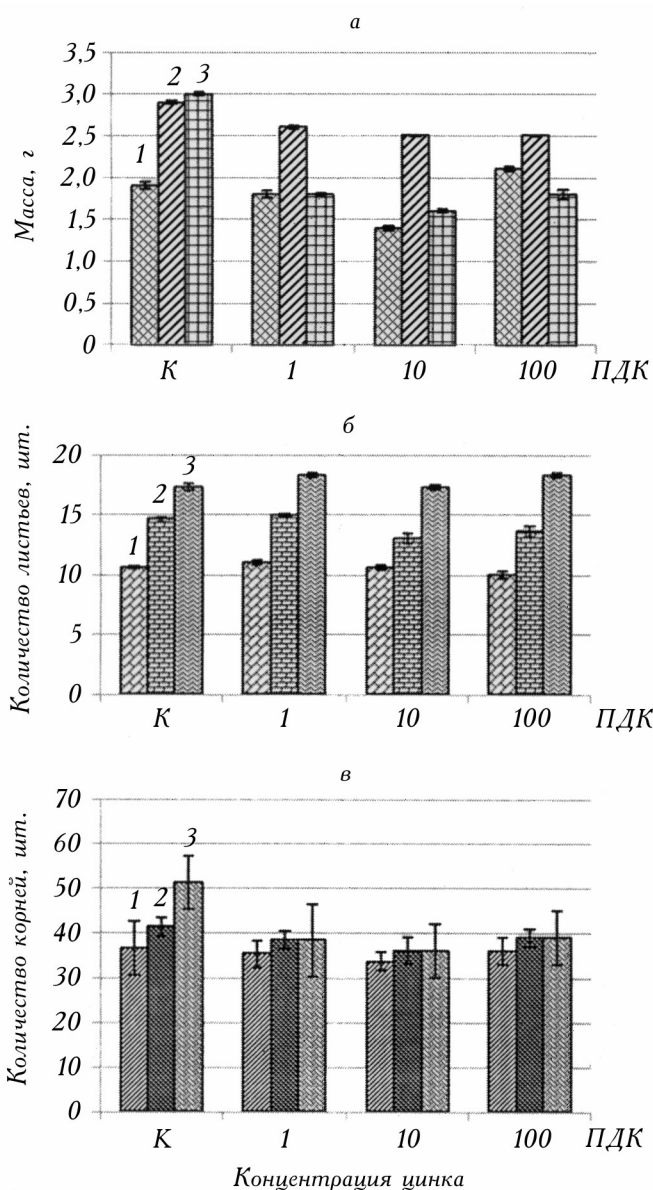
Таким образом, наиболее эффективное положительное воздействие на прирост листьев, корней и дочерних растений *L. stoloniferum* оказывали наночастицы Mn — как самостоятельно, так и в композиции с Fe. За 14 сут количество растений в обоих случаях увеличилось вдвое; в два раза, по сравнению с исходной массой, увеличилась масса растений под воздействием Mn и в 2,6 раза — под воздействием композиции Mn + Fe, тогда как в контроле этот показатель увеличился лишь на 33%. Также возрастало количество листьев и корней: под воздействием Mn — соответственно на 50 и 37%, а Mn + Fe — на 58 и 27%.

Под воздействием Zn листья на исходных растениях сначала обесцвечивались, затем массово отмирали, оставшиеся находились в угнетённом состоянии. Корни изменяли окраску на коричневую, загнивали от кончиков к основанию и постепенно отмирали. На 14-е сутки опыта листья желтели и подсыхали, отмирали отдельные листья и даже целые взрослые особи. В то же время под воздействием Zn в композиции с Cu это негативное влияние нивелировалось, количество дочерних особей по сравнению с контролем возросло.

Таким образом, что наночастицы Zn, Cu, Fe, Ag и композиция Zn + Cu негативно влияли на ростовые процессы *L. stoloniferum*, в отличие от Mn и композиции Fe + Mn, которые стимулировали рост растений в течение всего эксперимента.

Воздействие Zn на ростовые показатели *L. stoloniferum* было изучено также при использовании его ионной формы. На 1-е сутки эксперимента существенных изменений в морфологических показателях отмечено не было. Растения сохраняли зелёный цвет и интенсивно развивались при всех исследуемых концентрациях металла. На 7-е сутки масса, количество корней и листьев исходных, а также общее количество дочерних растений возросли как в контроле, так и при всех исследованных концентрациях ионов цинка. Растения были интенсивно зелёного цвета, развивались нормально, то есть негативного влияния металла не выявлено (рис. 2).

На 14-е сутки эксперимента количество листьев увеличилось по отношению к 1-м и 7-м суткам, но при этом почти не отличалось от контроля. Количество корней было на 20% меньше, чем в контроле. При концентрации цинка 1 ПДК старые растения визуально не отличались от контроля, однако мо-

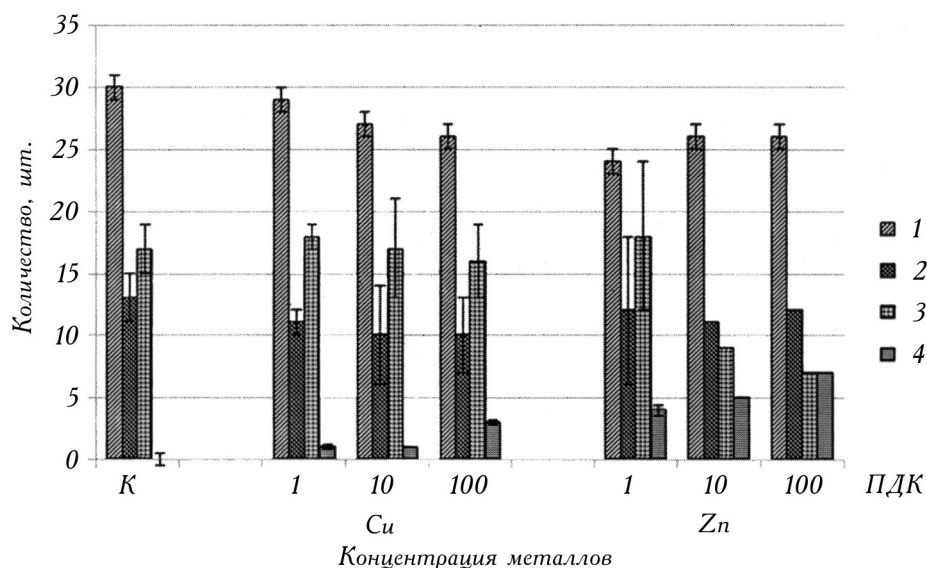


2. Масса (а), количество листьев (б) и количество корней (в) *Limnobi-um stoloniferum* под воздействием ионов цинка.

лодые листья были светлее, чем старые. При концентрации 10 ПДК листья лишь некоторых особей сохранили зелёный цвет, большинство пожелтело или обесцветилось, на них появились значительные некротические пятна, вновь образовавшиеся имели меньшие размеры по сравнению с контролем, общее количество корней уменьшилось. При концентрации 100 ПДК негативный эффект сохранялся. Таким образом, цинк в ионной форме и в виде наночастиц проявил высокую токсичность, что свидетельствует о его потенциальной опасности для гидробионтов.

Для уточнения токсичности ионов металлов была проведена оценка их воздействия на другого представителя, этой же экологической группы макрофитов — *L. minor*. Было установлено, что исследованные концентрации меди оказывали меньшее негативное влияние на ростовые показате-

тели *L. minor*, чем соответствующих концентрации цинка (рис. 3). При 1 и 10 ПДК исходные растения изменяли окраску от ярко-зелёной до светло-зелёной, сохраняя при этом нормальные размеры особей, у дочерних растений окраска листьев оставалась интенсивно зелёной, но существенно уменьшалось их количество по отношению к контролю. При концентрации



3. Ростовые показатели *Lemna minor* на 7-е сутки воздействия ионов меди и цинка: 1 — общее количество листочков; 2 — количество взрослых листочков; 3 — количество дочерних листочков; 4 — количество отмерших листочков.

100 ПДК окраска всех исходных растений изменялась на светло-жёлтую, а вновь образующиеся дочерние растения обесцвечивались.

Эксперименты с использованием *L. minor* подтвердили результаты исследований с *L. stoloniferum*, показав схожий характер ответных ростовых реакций растений одной экологической группы на повреждающее воздействие Zn, причем форма нахождения металла не имела определяющего значения.

Известно, что наночастицы способны преодолевать защитные барьеры клетки, легко проникать через клеточные мембраны и даже мембраны некоторых крупных органелл. В связи с этим интересно было провести прижизненное окрашивание тканей растений после их экспозиции в растворах наночастиц исследуемых металлов для оценки характера и степени влияния последних на цитофизиологические процессы. Поскольку у исследованных плейстофитов контакт с водными растворами осуществляется в большей степени корневой системой, а не розеткой листьев, для цитоморфологических исследований использовали именно корни. При изучении *L. minor* возникли некоторые технические сложности в связи с малыми размерами растения, поэтому основная часть исследований была проведена на *L. stoloniferum*.

В ответ на воздействие наночастиц металлов в клетках корней *L. stoloniferum* происходил целый комплекс изменений, характеризующих общую неспецифическую реакцию. Окраска клеток корней, подвергшихся воздействию наночастиц, отличалась от контроля. Так, нарушались процессы отложения прижизненных красителей в гранулы. Отмечены разные стадии

1. Степень и характер окрашивания клеток корня *Limnobium stoloniferum* прижизненным красителем нейтральным красным под воздействием наночастиц металлов

Наночастицы металлов	Тип, характер окрашивания и физиологическое состояние клеток
Контроль	Отложение красителя в гранулы, равномерное распределение гранул по клетке
Fe + Mn	Отложение красителя в гранулы, равномерное распределение гранул по клетке, отсутствие плазмолиза
Mn	То же
Fe	То же
Cu + Zn	Диффузное окрашивание цитоплазмы, образование нетипичных игольчатых кристаллов, увеличение объема хлоропластов, уголковый плазмолиз
Zn	Диффузное окрашивание цитоплазмы, образование нетипичных кубических кристаллов, увеличение объема хлоропластов, сильный плазмолиз
Cu	Отложение красителя в гранулы, неравномерное распределение гранул по клетке, образование игольчатых кристаллов, собранных группами в виде снежинок, сильный плазмолиз
Ag	Диффузное окрашивание цитоплазмы, увеличение объема хлоропластов, судорожный плазмолиз

плазмолиза, образование нехарактерных для клеток кубических и игольчатых (собранных в звёздчатые образования) кристаллов, диффузное окрашивание протоплазмы, а в некоторых вариантах (Zn, Ag и Cu + Zn) — и ядра клетки (табл. 1). Кроме того, в экзодерме корня *L. stoloniferum* увеличивался объём хлоропластов, что свидетельствует о нарушении полупроницаемости клеточной мембраны и мембран самих хлоропластов и ионного баланса в клетке.

Действие наночастиц металлов (Zn, Ag и Cu + Zn), выводящее клетку за пределы оптимального физиологического состояния, резко меняет картину внутриклеточного распределения красителя. С одной стороны, увеличивает способность ядра и цитоплазмы адсорбировать его, с другой — уменьшается интенсивность гранулообразования. Изменение отношения интенсивности двух противоположно направленных процессов — диффузного окрашивания ядра и цитоплазмы, и гранулярного отложения красителя в ней, характеризует степень повреждающего воздействия исследованных наночастиц. Поскольку известно, что в норме и цитоплазма, и ядро живых клеток не адсорбируют витальные красители, полученные результаты подтверждают токсическое воздействие наночастиц исследованных металлов на корни *L. stoloniferum*. Сходные результаты получены и при изучении влияния ионов металлов на прижизненное окрашивание корней этого растения (табл. 2).

2. Степень и характер окрашивания клеток корня *Limnobium stoloniferum* прижизненным красителем нейтральным красным под воздействием ионов Cu^{2+} та Zn^{2+}

Концентрация металлов	Тип, характер окрашивания и физиологическое состояние клеток
Контроль	Отложение красителя в гранулы, равномерное распределение гранул по клетке
Cu^{2+}	
1 ПДК	Диффузное окрашивание цитоплазмы, образование нетипичных игольчатых кристаллов
10 ПДК	То же
100 ПДК	Диффузное окрашивание цитоплазмы, образование нетипичных кубических кристаллов
Zn^{2+}	
1 ПДК	Отложение красителя в гранулы, равномерное распределение гранул по клетке
10 ПДК	Отложение красителя в гранулы, неравномерное распределение гранул по клетке, одиночные кубические кристаллы
100 ПДК	Диффузное окрашивание цитоплазмы, образование нетипичных кубических кристаллов

Механизмы взаимодействия прижизненных красителей и живой клетки в настоящее время интенсивно изучаются. Значительным успехом стала идентификация цитоплазматических органелл, отвечающих за процессы накопления витальных красителей в гранулах. В последнее время показано, что гранулы, наблюдающиеся под микроскопом, являются лизосомами, аккумуляровавшими краситель [5]. Установлен также универсальный характер их участия при деструкции любого чужеродного вещества, проникающего в клетки. Таким образом, отложение красителя в гранулах (лизосомах) можно считать механизмом защиты клетки от проникающих извне чужеродных веществ. Известно, что имеются пределы защитных возможностей клетки по отношению к красителям — их концентрация в растворе не должна превышать 0,1%. По нашему мнению, эту способность клеток можно использовать в качестве биотестеста на целостность клеточной мембраны при дополнительной нагрузке, в данном случае — при контакте с наночастицами металлов, для которых мембрана не является препятствием.

Заключение

Таким образом, воздействие наночастиц Mn и бинарной композиции Fe + Mn оказалось положительным для исследуемых водных растений, а Zn, Cu, Fe, Ag и бинарной композиции Cu + Zn — отрицательным.

Ионы Zn^{2+} и Cu^{2+} при низких концентрациях оказывали нейтральное или даже положительное влияние, однако при её увеличении — подавляли как рост, развитие и размножение растений, так и внутриклеточные физиологические процессы.

**

Досліджено дію колоїдних розчинів наночастинок металів на морфологію, ріст, розмноження та цитофізіологічні процеси плейстофітів (*Limnobium stoloniferum* та *Lemna minor*). Встановлено стимулюючий вплив наночастинок Mn, Fe + Mn та інгібуючий ефект наночастинок Zn, Cu, Fe, Zn + Cu і Ag. Проведено порівняльну оцінку дії наночастинок і іонів металів на прикладі Cu і Zn. Показано, що вплив наночастинок є подібним до впливу надвисоких концентрацій іонів.

**

*The effect of colloidal solutions of metal nanoparticles on morphology, growth, reproduction and cytophysiological processes of pleustophytes (*Limnobium stoloniferum* and *Lemna minor*) has been studied. The stimulating effect of nanoparticles of Mn, Fe + Mn and the suppressive effect of Zn, Cu, Fe, Zn + Cu and Ag was shown. The comparative assessment of the impact of metal nanoparticles and ions by example of Cu and Zn has been carried out. The effect of nanoparticles was shown to be similar to the effect of ultrahigh concentration of metal ions.*

**

1. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. — М.: Агропромиздат, 1985. — 350 с.
2. Ершов Б.Г. Наночастицы металлов в водных растворах: электронные, оптические и каталитические свойства // Рос. хим. журн. — 2001, — Т. 45, № 3. — С. 20—30.
3. Лопатько К.М., Афтонділянц Э.Г., Каленська С.М., Тонха О.Л. Спосіб отримання неіонного колоїдного розчину металів. — Пат. на винахід № 38459 від 12.01.2009.
4. Мусієнко М.М., Ольхович О.П. Методи дослідження вищих водних рослин. — К.: ВПЦ «Київський університет», 2005. — 60 с.
5. Паутов А.А. Морфология и анатомия вегетативных органов растений. — СПб, Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2012. — 336 с.
6. Atha D.H., Wang H., Petersen E.J. et al. Copper oxide nanoparticle mediated DNA damage in terrestrial plant models // Env. Sci. Technol. — 2012. — Vol. 46, N 3. — P. 1819—1827.
7. Dimkra C.O., McLean J.E., Latta D.E. et al. CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat // J. Nanoparticle Res. — 2012. — Vol. 14, N 9. — P. 1125.
8. Heinlaan M., Ivask A., Blinov I. et al. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus* // Chemosphere. — 2008. — Vol. 71, N 7. — P. 1308—1316.
9. Rico C.M., Majumdar S., Duarte-Gardea M. et al. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain // J. Agric. Food Chemistry. — 2011. — Vol. 59, N 8. — P. 3485—3498.

Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка

Поступила 24.10.13