

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.01.086>

УДК 581.8/631.8

**Є.О. Конотоп, Л.-А. Карпець, А.В. Зінченко,
С.К. Лопатько, М.С. Коваленко, О.Є. Смірнов**

ННЦ “Інститут біології та медицини” Київського національного університету ім. Тараса Шевченка
E-mail: plantaphys@gmail.com

Вплив цитратстабілізованих Cu- і Mn-вмісних наноколоїдів на ріст та проліферативну активність апикальних меристем кореня *Allium cepa* L.

Представлено членом-кореспондентом НАН України В.В. Швартау

*За допомогою стандартної тест-системи Allium-тест порівнювали фітотоксичність Cu- та Mn-вмісних наноколоїдів, отриманих за відсутності та наявності стабілізатора. Токсичність дослідних розчинів оцінювали за ростовими показниками коренів *Allium cepa* L., а цитотоксичність — за проліферативною активністю клітин кореневої меристеми. Встановлено, що розчини стабілізованих наноколоїдів були більш токсичними для рослин *A. cepa* L. за інтегральним показником приросту коренів, однак виявилися не цитотоксичними. Відмінності у фітотоксичності стабілізованих та нестабілізованих наночастинок залежать від їхніх властивостей і полягають у впливі на різні механізми росту коренів цибулі — мітоз та “кислий” ріст.*

Ключові слова: *Cu-вмісний наноколоїд, Mn-вмісний наноколоїд, проліферативна активність, Allium-тест, цитотоксичність.*

Потенційний вплив нанопрепаратів на рослини потребує ретельного вивчення, оскільки дані щодо їхньої екологічності дуже суперечливі [1, 2]. Безпосередню токсичність наночастинок металів та їхніх оксидів пов’язують із хімічним складом сировини для їхнього виготовлення (наприклад, за рахунок вивільнення токсичних іонів), фізичними характеристиками наночастинок (розмір, форма, структура поверхні) або/та генерацією ними активних форм кисню в тканинах організму [3]. Крім того, опосередкована фітотоксичність наночастинок пов’язана із порушенням поглинання поживних речовин коренями внаслідок зміни хімічного складу ризосфери за наявності наночастинок [4].

Наноколоїди есенціальних металів, фітотоксичність яких досліджується в даній роботі, вже знайшли широке застосування в рослинництві у складі протимікробних препаратів (наночастинки Cu, CuO) або ж як добрива (наночастинки Mn) на протипагу традиційним солям (MnSO₄) [5]. Проте пошуки способів покращення фізико-хімічних властивостей наноматеріалів тривають. Відомо, що поверхня наночастинок багатьох металів має підвищену хімічну активність і миттєво взаємодіє з киснем, водою та органічними сполуками. Тому на-

© Є.О. Конотоп, Л.-А. Карпець, А.В. Зінченко, С.К. Лопатько, М.С. Коваленко, О.Є. Смірнов, 2019

ночастинки потребують додаткової стабілізації, яка залежить від низки факторів: концентрації металевої фази, хімічного складу середовища, способу їхнього отримання, наявності лігандів-комплексоутворювачів. Відсутність стабілізуючих агентів призводить до утворення великих агрегатів, які поступово окиснюються [6]. Серед стабілізаторів наночастинок металів застосовують: ліганди-комплексоутворювачі (аміак, етилендіамінтетраоцтова кислота, гліцерин), сполуки із поверхнево-активними властивостями (серед інших цитрат натрію), полімерні сполуки (поліетиленгліколь, полівінілпіролідон, полівініловий спирт). Поширеним прикладом є синтезовані шляхом відновлення цитрату наночастинок золота у водному розчині. Отримані наночастинки адсорбують на своїй поверхні негативно заряджені іони цитрату і, таким чином, стабілізуються завдяки електростатичному відштовхуванню [7]. Наявність стабілізуючих агентів на поверхні наночастинок може надавати їм нових властивостей, які, своєю чергою, впливають на токсичність наноматеріалів [8]. Тому за мету дослідження ставилося порівняти фітотоксичність колоїдних розчинів наночастинок есенціальних металів (Mn і Cu), отриманих за відсутності та наявності стабілізатора.

Матеріали і методи. Досліджували фітотоксичність колоїдних розчинів нестабілізованих і стабілізованих цитратом натрію наночастинок міді та мангану. Дані розчини розроблені кафедрою технології конструкційних матеріалів і матеріалознавства Національного університету біоресурсів і природокористування України й отримані шляхом диспергування гранул міді та мангану імпульсами електричного струму амплітудою 100–2000 А у воді [9]. Фітотоксичність досліджуваних розчинів порівнювали за допомогою стандартного тест-об'єкта *Allium cepa* L. сорту Халцедон. Для цього на дослідних суспензіях наноколоїдів (концентрація Cu-вмісних наноколоїдів — 4 мг/л, Mn-вмісних наноколоїдів — 3 мг/л) протягом 5 діб культивували по 10 однакових за масою цибулин. Контрольні рослини вирощували на дистильованій воді. Щоб уникнути впливу стабілізатора на ріст коренів, додатково культивували рослини на водному розчині $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ у концентрації, що відповідала такій у дослідних розчинах стабілізованих наноколоїдів. По закінченні часу експозиції виходили індекс толерантності (ІТ, %) за приростом коренів відносно контролю [10]. Зафіксовані у розчині Кларка ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} : \text{CH}_3\text{COOH} = 3 : 1$) корені цибулі після мацерації (1М НСІ, $t = 40^\circ\text{C}$) фарбували 1 % водним розчином толуїдинового синього. Із апікальних частин коренів готували тимчасові давлені препарати, які аналізували під світловим мікроскопом при 400-кратному збільшенні. 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 [2].

Біологічна повторність кожного експерименту трикратна. Математичну обробку даних здійснювали методом дисперсійного аналізу з подальшим застосуванням критерію Стьюдента або множинного рангового критерію Дункана. Дані вважали достовірними при рівні значущості $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Вибір Cu- та Mn-вмісних наноколоїдів для дослідження обумовлений тим, що ці метали є есенціальними, тобто життєво необхідними мікроелементами для рослин. Вони входять в активні центри ензимів і беруть участь у процесах фотосинтезу та дихання. Останнім часом наночастинок Mn пропонуються як альтернатива традиційним добривам, оскільки був відмічений позитивний вплив цих наночастинок на

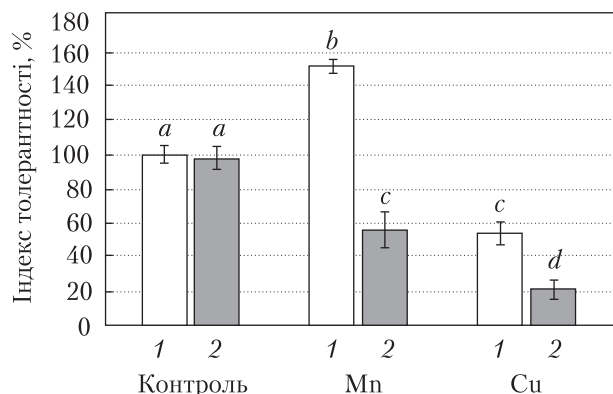


Рис. 1. Індекс толерантності, розрахований за приростом коренів *Allium cepa* L., за умов культивування на стабілізованих (2) та нестабілізованих (1) наноколоїдах есенціальних металів; a, b, c, d – середні значення показника позначені однаковими літерами свідчать про недостовірну різницю при $P < 0,05$ згідно з множинним ранговим критерієм Дункана

ріст коренів та пагонів рослин, що важливо для збільшення продуктивності сільськогосподарських культур, крім того, вони не спричиняють вільнорадикальних пошкоджень у їхніх тканинах [11]. Попри те що наночастинки Cu входять до складу багатьох комерційних протимікробних препаратів, їхня фітотоксичність досі вивчається. Отримані результати свідчать про вплив наноколоїдів есенціальних металів, стабілізованих і не стабілізованих цитратом, на ріст коренів *A. cepa* L. (рис. 1).

Як і в попередніх дослідженнях [2], приріст коренів залежав від виду наночастинок металу в середовищі культивування. Так, наноколоїд Mn сприяв росту коренів на 52 %, а наноколоїд Cu, навпаки, – гальмував на 49 %, що узгоджується з даними інших дослідників [1]. Наявність стабілізатора в наноколоїдах спричиняла достовірне пригнічення ростових процесів коренів за показником ІТ на 55 та 81 % для наноколоїдів Mn та Cu відповідно. Крім того, лише стабілізовані наноколоїди обмежували появу нових коренів у дослідних цибулин. Щоб зрозуміти причини гальмування та стимуляції росту рослин під впливом наноколоїдів есенціальних металів, було проведено мікроскопічне дослідження клітин кореневої меристеми *A. cepa* L. (рис. 2).

Цитотоксичний вплив відмічений для усіх дослідних розчинів, крім розчину наночастинок Mn, за умов культивування на якому показник МІ клітин не відрізнявся від контрольних значень (рис. 3). Оскільки мітотична активність клітин коренів під дією нестабілізованого Mn-вмісного наноколоїду не змінювалася, збільшення приросту коренів відбувалося за рахунок їхнього росту розтягненням. Найінтенсивніше пригнічення проліферативної активності клітин меристеми коренів на 68 % спостерігали під час вирощування рослин на розчинах не стабілізованих наночастинок Cu, що узгоджується з отриманими результатами за показником ІТ. Розчини стабілізованого наноколоїду Mn та Cu однаковою мірою пригнічували поділ клітин коренів – на 18 та 14 % відповідно. Показники ІТ та МІ у рослин, вирощених на розчині цитрату натрію, достовірно не відрізнялися від контрольних значень. Тому можна припустити, що стабілізовані наноколоїди набувають нових властивостей та функціональних якостей порівняно з нестабілізованими [8].

Попри незначне пригнічення мітотичної активності клітин меристеми коренів, спостерігали істотну затримку їхнього росту (за ІТ), що, вірогідно, відбувалося за рахунок гальмування росту клітин розтягненням. Видовження клітин пояснює теорія “кислого” росту, згідно з якою розм’якшення клітинних стінок відбувається за рахунок закислення апопла-

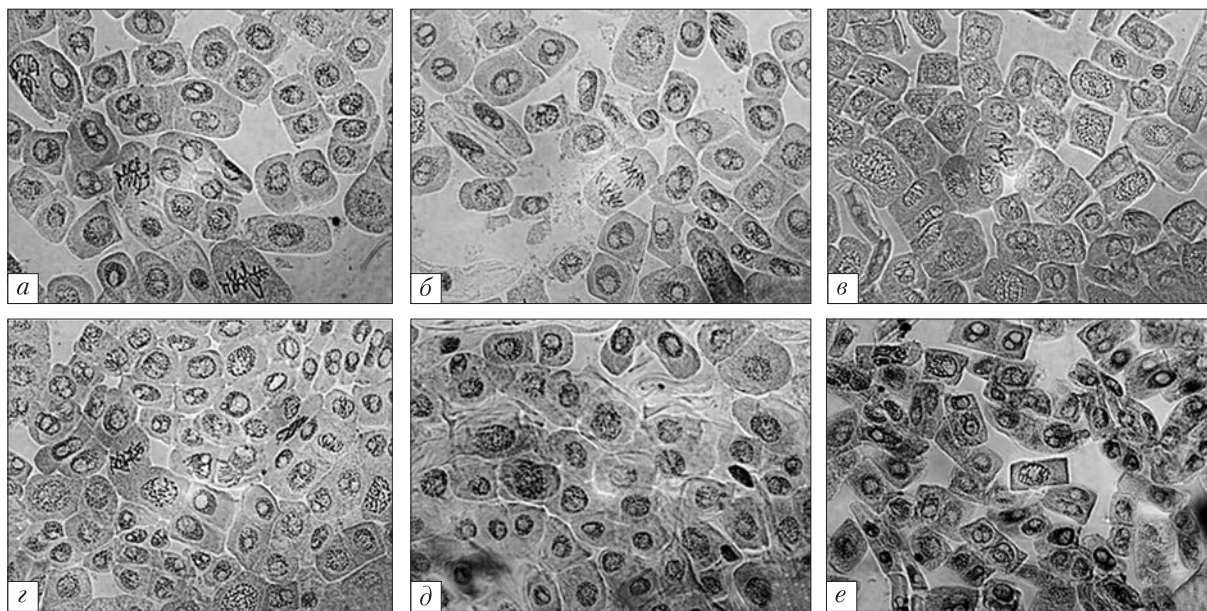
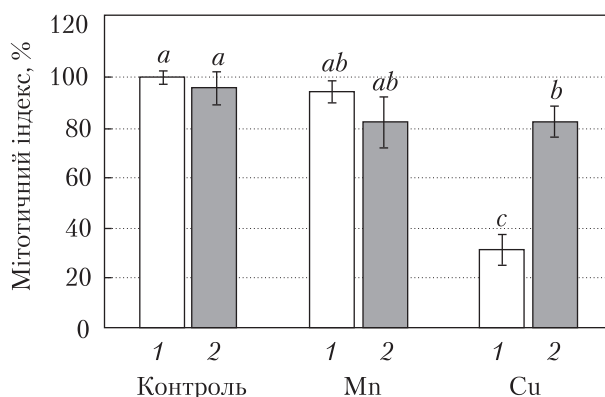


Рис. 2. Меристематичні клітини коренів *Allium cepa* L. за умов культивування на стабілізованих та нестабілізованих наноколоїдах есенціальних металів: *a* – контроль; *б* – розчин цитрату; *в* – Mn-вмісний наноколоїд; *г* – Mn-вмісний стабілізований цитратом наноколоїд; *д* – Cu-вмісний наноколоїд; *е* – Cu-вмісний стабілізований цитратом наноколоїд ($\times 400$)

Рис. 3. Проліферативна активність клітин меристеми коренів *Allium cepa* L. за умов культивування на стабілізованих (2) та нестабілізованих (1) наноколоїдах есенціальних металів



та внаслідок ауксиніндукованої активації H^+ -АТФази, яка локалізована в плазматичній мембрані. Таким чином забезпечується електрохімічний градієнт для поглинання K^+ , що необхідний для підвищення тургору клітин і подальшого розтягнення [12]. Нещодавно ауксинзалежний механізм росту був підтверджений і для клітин коренів: високі концентрації ауксинів пригнічували, а низькі – стимулювали їхнє видовження [13]. Крім того, повідомлялося, що наночастинки оксиду міді впливали на метаболізм рослин бавовни через порушення гормонального балансу, а саме ауксинів [14]. Відомо, що наночастинкам, зважаючи на більше співвідношення між площею поверхні та масою порівняно з не нанорозмірними металами, притаманна більша реакційна здатність у середовищі. Завдяки цьому наночастинки можуть утворювати комплекси з мембранними транспортерами і таким чином поглинатися рослиною [1]. Ймовірно, стабілізовані наноколоїди, на противагу нестабілізованим, завдяки відмінностям у властивостях прямо чи опосередковано впливають на ріст клітин коренів розтягненням або на механізми його регуляції, а також на появу нових точок росту.

Отже, на підставі результатів порівняння фітотоксичності наноколоїдів есенціальних металів (Mn та Cu), отриманих за наявності та відсутності стабілізатора можна дійти такого висновку. Розчини стабілізованих наночастинок: і Mn, і Cu, виявилися більш токсичними для рослин *A. serpa* L. за показниками росту та кількості коренів, однак були не цитотоксичними, оскільки істотно не впливали на проліферативну активність клітин меристеми коренів. Можна припустити, що відмінності у фітотоксичності стабілізованих та нестабілізованих наноколоїдів залежать від їхніх властивостей і полягають у впливі на різні механізми росту коренів, які залишаються нез'ясованими і потребують подальших досліджень.

Публікація містить результати досліджень, проведених за грантом Президента України за конкурсним проектом №Ф75/170-2018 Державного фонду фундаментальних досліджень.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Liu R. Q., Zhang H. Y., Lal R. Effects of stabilized nanoparticles of copper, zinc, manganese, and iron oxides in low concentrations on lettuce (*Lactuca sativa*) seed germination: nanotoxicants or nanonutrients? *Water Air Soil Pollut.* 2016. **227**. P. 1–14. doi: <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2738-2>
2. Konotop Ye.O., Kovalenko M.S., Ulynets V.Z., Meleshko A.O., Batsmanova L.M., Taran N.Yu. Phytotoxicity of colloidal solutions of metal-containing nanoparticles. *Cytol. Genetics.* 2014. **48**, № 2. P. 99–102. doi: <https://doi.org/10.3103/S0095452714020054>
3. Tang Y., He R., Zhao J., Nie G., Xu L., Xing B. Oxidative stress-induced toxicity of CuO nanoparticles and related toxicogenomic responses in *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Pollut.* 2016. **212**. P. 605–614. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.019>
4. Mirzajani F., Askari H., Hamzelou S., Farzaneh M., Ghassempour A. Effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa* L. and its rhizosphere bacteria. *Ecotox. Environ. Safe.* 2013. **88**. P. 48–54. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.10>
5. Dimkpa C.O., Calder A., Britt D.W., McLean J.E., Anderson A.J. Responses of a soil bacterium, *Pseudomonas chlororaphis* O6 to commercial metal oxide nanoparticles compared with responses to metal ions. *Environ. Pollut.* 2011. **159**, № 7. P. 1749–1756. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.04.020>
6. Sperling R.A., Parak W.J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Phil. Trans. R. Soc. A.* 2010. **368**. P. 1333–1383. doi: <https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0273>
7. Lin S.Y., Tsai Y.T., Chen C.C., Lin C.M., Chen C.H. Two-step functionalization of neutral and positively charged thiols onto citrate-stabilized Au nanoparticles. *J. Phys. Chem. B.* 2004. **108**. P. 2134–2139. doi: <https://doi.org/10.1021/jp036310w>
8. Sharma V.K., Siskova K.M., Zboril R., Gardea-Torresdey J.L. Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: Fate, stability and toxicity. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2014. **204**. P. 15–34. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.12.002>
9. Маточний колоїдний розчин металів: пат. 38459 Україна. МПК: B01J 13/00. Опубл. 12.01.2009.
10. Wilkins D.A. The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root length. *New Phytol.* 1978. **80**. P. 623–633.
11. Ruttkey-Nedecky B., Krystofova O., Nejdil L., Adam V. Nanoparticles based on essential metals and their phytotoxicity. *J. Nanobiotechnology.* 2017. **15**. P. 33. doi: <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0268-3>
12. Rayle D.L., Cleland R.E. The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.* 1992. **99**, № 4. P. 1271–1274. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.99.4.1271>
13. Barbez E., Dünser K., Gaidora A., Lendl T., Busch W. Auxin steers root cell expansion via apoplastic pH regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. **114**, № 24. P. 4884–4893. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1613499114>
14. Van N.L., Ma C., Shang J., Rui Y., Liu S., Xing B. Effects of CuO nanoparticles on insecticidal activity and phytotoxicity in conventional and transgenic cotton. *Chemosphere.* 2016. **144**. P. 661–670. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.028>

Надійшло до редакції 25.10.2018

REFERENCES

1. Liu, R. Q., Zhang, H. Y. & Lal, R. (2016). Effects of stabilized nanoparticles of copper, zinc, manganese, and iron oxides in low concentrations on lettuce (*Lactuca sativa*) seed germination: nanotoxicants or nano-nutrients? *Water Air Soil Pollut.*, 227, pp. 1-14. doi: <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2738-2>
2. Konotop, Ye. O., Kovalenko, M. S., Ulynets, V. Z., Meleshko, A. O., Batsmanova, L. M. & Taran N. Yu. (2014). Phytotoxicity of colloidal solutions of metal-containing nanoparticles. *Cytol. Genetics*, 48, No. 2, pp. 99-102. doi: <https://doi.org/10.3103/S0095452714020054>
3. Tang, Y., He, R., Zhao, J., Nie, G., Xu, L. & Xing, B. (2016). Oxidative stress-induced toxicity of CuO nanoparticles and related toxicogenomic responses in *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Pollut.*, 212, pp. 605-614. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.019>
4. Mirzajani, F., Askari, H., Hamzelou, S., Farzaneh, M. & Ghassempour, A. (2013). Effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa* L. and its rhizosphere bacteria. *Ecotox. Environ. Safe.*, 88, pp. 48-54. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.10>
5. Dimkpa, C. O., Calder, A., Britt, D. W., McLean, J. E., & Anderson, A. J. (2011). Responses of a soil bacterium, *Pseudomonas chlororaphis* O6 to commercial metal oxide nanoparticles compared with responses to metal ions. *Environ. Pollut.*, 159, No. 7, pp. 1749-1756. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.04.020>
6. Sperling, R. A. & Parak, W. J. (2010). Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Phil. Trans. R. Soc. A*, 368, pp. 1333-1383. doi: <https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0273>
7. Lin, S. Y., Tsai, Y. T., Chen, C. C., Lin, C. M. & Chen, C. H. (2004). Two-step functionalization of neutral and positively charged thiols onto citrate-stabilized Au nanoparticles. *J. Phys. Chem. B*, 108, pp. 2134-2139. doi: <https://doi.org/10.1021/jp036310w>
8. Sharma, V. K., Siskova, K. M., Zboril, R. & Gardea-Torresdey, J. L. (2014). Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: Fate, stability and toxicity. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 204, pp. 15-34. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.12.002>
9. Pat. 38459 UA, IPC B01J 13/00, Mother colloidal solution of metals, Lopatko, K.G., Aftandilyants, E.H., Kalenska, S.M. & Tonkha, O.L., Publ. 12.01.2009 (in Ukrainian).
10. Wilkins, D. A. (1978). The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root length. *New Phytol.*, 80, pp. 623-633.
11. Ruttkey-Nedecky, B., Krystofova, O., Nejdil, L. & Adam, M. (2017). Nanoparticles based on essential metals and their phytotoxicity. *J. Nanobiotechnology*, 15, pp. 33. doi: <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0268-3>
12. Rayle, D. L. & Cleland, R. E. (1992). The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.*, 99, No. 4, pp. 1271-1274. doi: <https://doi.org/10.1104/pp.99.4.1271>
13. Barbez, E., Dünser, K., Gaidora, A., Lendl, T. & Busch, W. (2017). Auxin steers root cell expansion via apoplastic pH regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 114, No. 24, pp. 4884-4893. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1613499114>
14. Van, N. L., Ma, C., Shang, J., Rui, Y., Liu, S. & Xing, B. (2016). Effects of CuO nanoparticles on insecticidal activity and phytotoxicity in conventional and transgenic cotton. *Chemosphere*, 144, pp. 661-670. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.028>

Received 25.10.2018

Е.А. Конотоп, Л.-А. Карпец, А.В. Зинченко,
С.К. Лопатько, М.С. Коваленко, А.Е. Смирнов

УНЦ “Институт биологии и медицины” Киевского национального университета им. Тараса Шевченко
E-mail: plantaphys@gmail.com

ВЛИЯНИЕ ЦИТРАТСТАБИЛИЗИРОВАННЫХ Cu- И Mn-СОДЕРЖАЩИХ
НАНОКОЛЛОИДОВ НА РОСТ И ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ
АКТИВНОСТЬ АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ *ALLIUM CEPA* L.

С помощью стандартной тест-системы Allium-тест сравнивали фитотоксичность Cu и Mn-содержащих нанокolloидов, полученных в отсутствие и присутствии стабилизатора. Токсичность исследуемых растворов оценивали по ростовым показателям корней *Allium cepa* L., а цитотоксичность — по пролифера-

тивной активности клеток корневой меристемы. Установлено, что растворы стабилизированных нанокolloидов были более токсичными для растений *A. cepa* L. по интегральному показателю прироста корней, но оказались не цитотоксичными. Отличия в фитотоксичности стабилизированных и нестабилизированных наночастиц зависят от их свойств и состоят во влиянии на различные механизмы роста корней лука – митоз и “кислый” рост.

Ключевые слова: *Cu-содержащий нанокolloид, Mn-содержащий нанокolloид, пролиферативная активность, Allium-тест, цитотоксичность.*

Ye.O. Konotop, L.-A. Karpets, A.V. Zinchenko,
S.K. Lopatko, M.S. Kovalenko, O.E. Smirnov

Institute of Biology and Medicine of Taras Shevchenko National University of Kiev
E-mail: plantaphys@gmail.com

INFLUENCE OF CITRATE-STABILIZED Cu- AND Mn-NANOCOLLOIDS ON THE GROWTH AND PROLIFERATIVE ACTIVITY OF *ALLIUM CEPA* L. APICAL MERISTEMS

Using the standard *Allium*-test system, the phytotoxicities of Cu- and Mn-containing nanocolloids obtained in the absence and presence of a stabilizer are compared. The toxicities of the studied solutions are assessed by growth indicators of *Allium cepa* L. roots, and their cytotoxicity by the proliferative activity of the root meristem cells. Solutions of stabilized nanocolloids are more toxic for *A. cepa* L. plants in terms of the integral index of root growth, but are not cytotoxic. The differences in the phytotoxicities of stabilized and unstabilized nanoparticles depend on their properties and consist in influencing the various mechanisms of onion root growth such as mitosis and “acid” growth.

Keywords: *Cu-nanocolloid, Mn-nanocolloid, proliferative activity, Allium-test, cytotoxicity.*