

УДК: 620.9:57.088:633

БІОЛОГІЧНИЙ ЕФЕКТ НАНОКОМПОЗИТІВ НА РОСЛИНИ

М. В. Таран, аспірант*

К.Є. Шаванова, кандидат біологічних наук

М. Ф. Стародуб, доктор біологічних наук, професор

Наведено результати вивчення впливу нанокompatитів на основі Saponite ($Si_{7.34}Al_{0.66}Mg_6 O_{20} ((OH)_4)$) на фотосинтетичний апарат за допомогою методів біосенсорики, що забезпечують експрес-діагностику стану рослин квасолі звичайної. Визначено показники індукції флуоресценції хлорофілу (ІФХ), енергію проростання та схожість насіння рослин за дії нанокompatитів.

Ключові слова: ІФХ, нанокompatити, біосенсор, енергія проростання, схожість.

XXI століття - час нанотехнологій, наномедицини, нанобіології, нанофармакології. Наноматеріали застосовують в косметиці, сільському господарстві, медицині, авіації, військовій промисловості та електроніці. За оцінками, на сьогодні описано понад 800 продуктів, які виготовлено на основі наноматеріалів та нанотехнологій [5].

У сільському господарстві наноматеріали використовують як нанодобрива для інтенсифікації росту і розвитку рослин. Суспензіями нанокристалічних порошків металів проводять передпосівну обробку насіння буряків, картоплі, пшениці, що зумовлює [6], збільшення врожаю до 20-35%. За таких умов відбувається підвищення адаптації рослин до стресових умов і поліпшення якості сільськогосподарської продукції. Нанотехнології застосовують для обробки рослин соняшнику, тютюну та картоплі після збирання врожаю, при зберіганні яблук в регульованих умовах, та при озонуванні повітряного середовища [7, 6].

*Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор М.Ф. Стародуб

Наночастинки впливають на біологічні об'єкти на клітинному рівні, підвищують ефективність функціонування процесів у рослинах і беруть участь у формуванні мікроелементного балансу, тобто є біоактивними. Вивчення важливих сторін наноматеріалів відбувається одночасно з оцінкою їх негативних впливів і запобіганням ризиків від їх використання [12].

На нанорівні значна кількість речовин набуває нових властивостей і може стати біологічно активними. Це зумовлює можливі потенційні токсичні ефекти таких матеріалів за контакту з ними живих організмів [4, 3, 10]. Дані наявних досліджень щодо впливу наноматеріалів на живі організми різної структурної організації досить суперечливі. Тому необхідно продовжувати дослідження наслідків можливого впливу наночастинок на живі організми та нарощувати розробку нових методів виявлення їх ефектів в навколишньому середовищі. В зв'язку з цим, характеристика структурно-функціонального стану живих систем і можливих біологічних ефектів наноструктур, як генераторів додаткового антропогенного ефекту, вимагає подальших експериментів [7].

Мета наших досліджень полягала у визначенні впливу ряду наноконкомпозитів на основі сапонітів на рослини квасолі звичайної *Phaseolus vulgaris L.*

Матеріали і методика досліджень. Об'єктами досліджень слугували наноконкомпозити на основі Saponite ($\text{Si}_{7.34}\text{Al}_{0.66}\text{Mg}_6\text{O}_{20}((\text{OH})_4)$), а саме:

- 1) Saponite-H+;
- 2) Nb-Sap-Cl
- 3) Nb-Sap-EtO

Мікроструктуру наноконкомпозитів вивчали методом сканувальної електронної мікроскопії (SEM) за допомогою Лео 1550 Gemini SEM, за напруги від 2 до 5 кВ і стандартного значення діафрагми 30 мкм. Визначали вплив наноконкомпозитів на схожість, енергію проростання і показники індукції флуоресценції хлорофілу на прикладі рослинного тест-об'єкту квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris L.*).

Біологічну дію нанопрепаратів вивчали в формі колоїдних розчинів, які отримано шляхом змішування наночастинок з дистильованою водою у різних

концентраціях. Мікроструктуру наноконкомпозитів досліджували за допомогою СЕМ (рис 1.) Зразки Saponite-H+ мали дещо трикутну форму, що відображає тетрагональну структуру їх будови, які за умов розчинення агломерували у більші фракції, але залишились пористими, з розміром пор на рівні 100 нм, що свідчить про значну площу їх активної поверхні. Зразки Nb-Sap-EtO трикутної форми, були товщиною 20 - 30 нм. Наноконкомпозити Nb-Sap-Cl, розміром \approx 30 нм, так як і попередні агломерували з утворенням окремих лусочок.

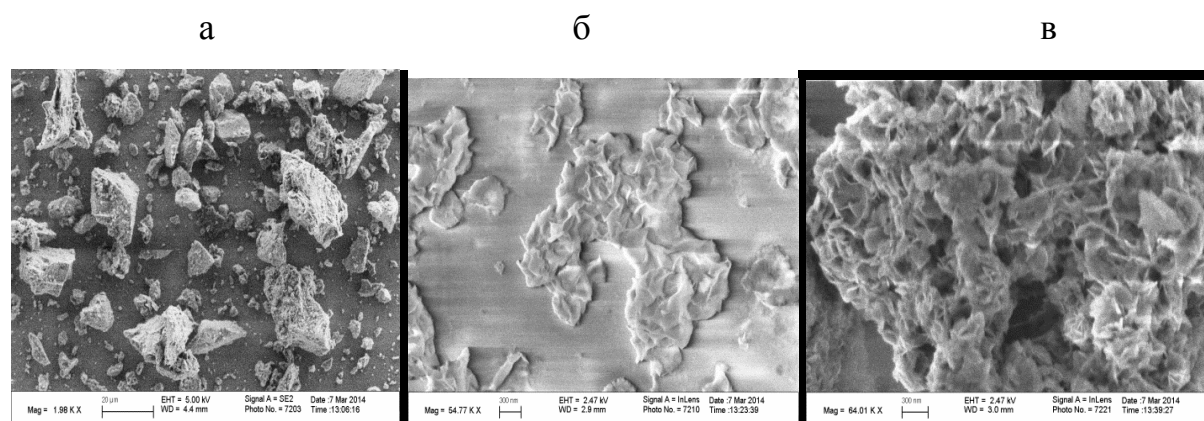


Рис.1. СЕМ вигляд наноконкомпозиту: а- Saponite-H+, б - Nb-Sap-EtO, в - Nb-Sap-Cl.

Визначення схожості та енергії проростання насіння. Енергію проростання встановлювали за кількістю насінин, що проросли протягом 24 год. Схожістю – називають відсоток насінин, що проросли протягом певного часу. Схожість насіння – важлива його якість. Лише насіння з високою лабораторною схожістю здатне забезпечити дружні сходи в польових умовах [5].

З партії насіння відбирали і розкладали по 5 шт. на фільтрувальний папір у чашки Петрі, потім обробляли колоїдними розчинами нанопрепаратів. Насіння пророщували в термостаті протягом 8 діб [14], за температури 25°C в темноті до появи зародкового корінця. Як контроль використовували насіння, яке зволожували дистильованою водою. Досліди проводили в триразовій повторності [5]. Кількість пророслих насінин у 100 % насінневої проби визначає їх лабораторну схожість [14].

Виміри показників ІФХ здійснювали за допомогою флуорометра «Флоратест», розробленого в Інституті кібернетики ім. В.М. Глушкова НАН України, а саме:

- фіксували час початку виміру;
- витримували темнову адаптацію перед вимірюванням – 3 хв;
- тривалість вимірювань 160 с;
- листкові пластинки для вимірювання відбирали з ідентичних ярусів.

Контрольну і дослідну групи рослин порівнювали на основі побудованих кривих ІФХ з використанням програмного засобу Microsoft Office Excel 2007.

Залежність інтенсивності флуоресценції від часу після початку освітлення має назву крива індукції флуоресценції хлорофілу або індукційна крива (рис. 2). За допомогою приладу «Флоратест» зафіксовано кінетику швидких і повільних змін рівня сигналу та розроблено інтерпретацію характерних ділянок індукційних кривих [2].

Після піку М спостерігають пік М2, який пов'язаний з активацією глутамін-глутаматного циклу і відіграє важливу роль у азотному метаболізмі рослин [3].

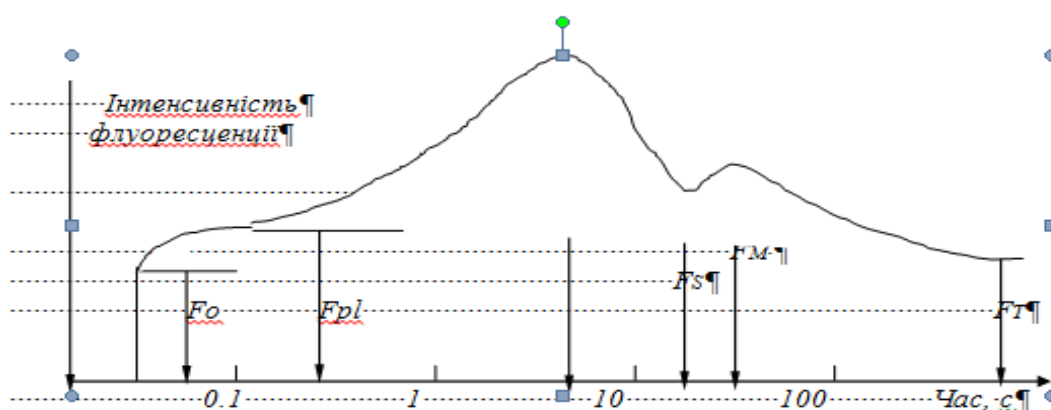


Рис. 2. Типова індукційна крива

Fo - “фоновий” рівень флуоресценції залежить від втрат енергії збудження під час міграції по пігментній матриці, а також вмісту молекул хлорофілу, які не мають функціонального зв'язку з реакційними центрами ;

- $F_0 - F_{p1}$ - швидке відновлення QA в комплексах фотосистеми 2 (ФС2), які не беруть участь у транспорті електронів на пул пластохінонів;
- $F_{p1} - F_{max}$ - повільніше відновлення QA в комплексах ФС2, які беруть участь у транспорті електронів на пул пластохінонів ;
- $F_{max} - F_s$ - активація ферредоксин-НАДФ⁺-редуктази, накопичення градієнту протонів та відокремлення фосфорильованого світлозбирального комплексу від ФС2 ;
- $F_s - F_{max_2}$ - сповільнення відтоку електронів з електрон-транспортного ланцюга до ферредоксин-НАДФ⁺-редуктази, яке зумовлене зменшенням пулу НАДФ⁺ в умовах затримки фіксації вуглекислого газу, а також градієнту протонів за рахунок активності АТФ-синтетази ;
- $F_{max_2} - F_{st}$ - початок активної фіксації вуглекислого газу ;
- F_{st} - стаціонарний рівень, який відзначається динамічною рівновагою між процесами, які обумовлюють збільшення флуоресценції та процесами, які спричиняють її зменшення.

У кінетиці індукційних переходів флуоресценції хлорофілу значну роль відіграють світлова і темнова фази фотосинтезу. Для оцінки стану фотосинтетичного апарату використовують комплекс параметрів, серед яких основними є [3]:

$(F_{max} - F_0) / F_{max} = F_v / F_{max}$ – залежить від ефективності фотохімічних реакцій ФС2 ;

$(F_v = F_{max} - F_0$ – варіабельна флуоресценція);

$(F_{p1} - F_0) / F_v$ – якщо інтенсивність діючого світла максимальна для повної відновленості QA, у момент досягнення рівня F_p , тоді параметр $(F_{p1} - F_0) / F_v$ відповідає відносній кількості QB-невідновлювальних комплексів ФС2, які не беруть участь у лінійному транспорті електронів ;

$t_{1/2}$ – час, який відповідає досягненню половини варіабельної флуоресценції;

$(F_{max}-F_{st})/F_{st}$ – величина гасіння флуоресценції, на яку впливають фотохімічні (фіксація CO_2) і нефотохімічні процеси (теплова дисипація енергії збудженого стану молекул хлорофілу);

$(F_{max_2}-F_{st})/F_{st}$ – корелює з інтенсивністю темної фіксації вуглекислого газу.

Форма індукційної кривої є чутливою до змін стану фотосинтетичного апарату у результаті дії несприятливих чинників або фізіологічно-активних речовин, наприклад, гербіцидів. Вимірювання не потребують значних затрат часу і реактивів, тому їх можна проводити не пошкоджуючи нативної структури об'єкту. Завдяки цим перевагам метод індукції флуоресценції набув широко застосування у дослідженнях фотосинтетичного апарату рослин [3, 4].

Результати досліджень та їх обговорення. Перевірка насіння на схожість і енергію проростання є важливою та відповідальною частиною аналізу. За вивчення умов впливу нанокompatитів на енергію проростання квасолі звичайної токсичність не була виявлена. Енергія проростання насіння *Phaseolus vulgaris* при збільшенні концентрації нанокompatитів суттєво не змінювалась (рис. 3).

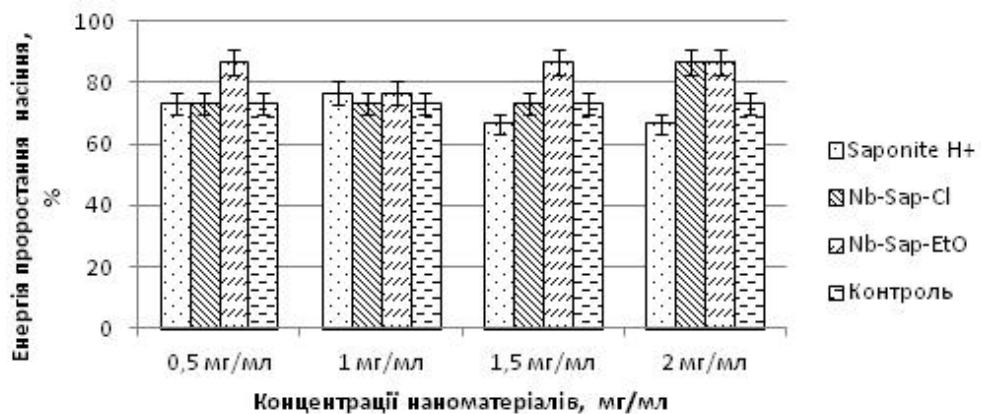


Рис.3. Вплив нанокompatитів на енергію проростання насіння квасолі звичайної

Використання нанокompatиту Nb-Sap-EtO спричинило стимулювання проростання насіння, тоді як препарат Saponite-H+ частково пригнічував цей процес.

Насіння квасолі звичайної мало лабораторну схожість 65 – 73 %. Зі збільшенням концентрації нанокompatитів відсоток схожості значно не

змінювався. Нами з'ясовано, що зниження схожості насіння квасолі звичайної прослідковується за умов використання нанокompозиту Saponite-H+ в концентрації 2 мг/мл (рис.4). Разом з тим, використання нанокompозитів Nb-Sap-EtO та Nb-Sap-Cl не підвищувало схожість насіння порівняно з контролем .

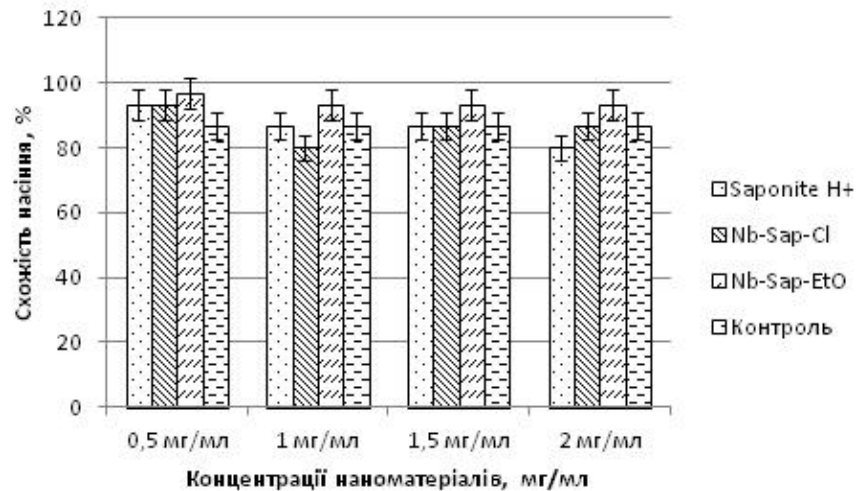


Рис. 4. Вплив нанокompозитів на схожість насіння квасолі звичайної
Застосування методу оцінки ІФХ рослин надає можливість отримати об'єктивну експресну інформацію щодо функціонування фотосинтетичного апарату рослини за різних умов вирощування.

Виміри проводили на листках квасолі звичайної, насіння якої попередньо замочували в нанопрепаратах у концентрації 2 мг/мл. За умов вирощування відслідковували зміни в характері індукційних переходів флуоресценції хлорофілу.

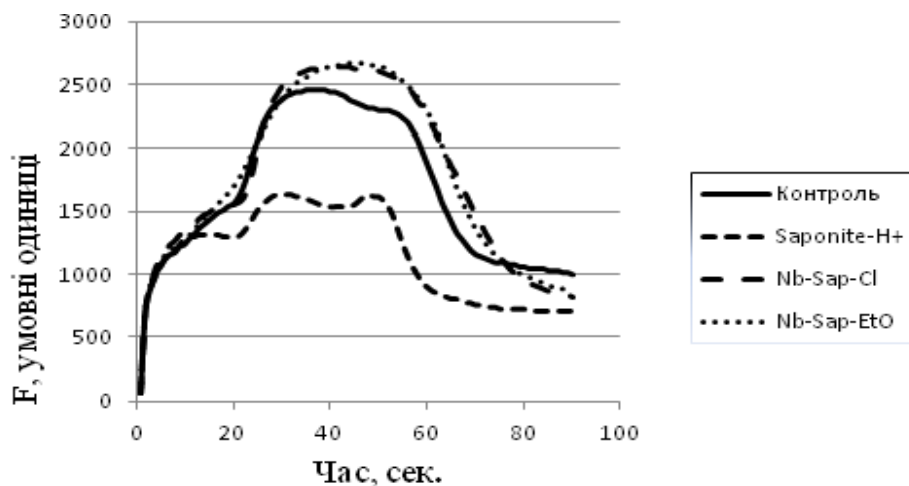


Рис. 5. Криві ІФХ квасолі звичайної в фазі двох листків за дії нанокompозитів

За дії нанокompозиту Saponite-H+ виявлено зростання інтенсивності фонової флуоресценції (F_o), що зумовлено збільшенням кількості неактивного хлорофілу, який не передає енергію збудження до реакційних центрів. У рослин, що вирощували під впливом Nb-Sap-Cl та Nb-Sap-EtO нанокompозитів фоновий рівень залишався таким самим як у контролі. Разом з тим, у контрольних зразків стаціонарний рівень флуоресценції (F_{st}) був вищим, ніж у рослин, які зростали на домішках нанокompозитів, що частково підвищує пригнічення фотосинтетичних реакцій. Загалом виявлено, що у цілому, нанокompозити зумовлюють проходження фотосинтетичних реакцій у рослин квасолі [1].

У кінетиці індукційних переходів флуоресценції хлорофілу визначне місце відведено процесам світлової і темної фази фотосинтезу. Для оцінки стану фотосинтетичного апарату використовують показники наведені в таблиці. Визначено істотне зниження показників $(F_{max}-F_{st})/F_{st}$ за дії на рослини квасолі звичайної нанокompозиту Saponite-H, а також, показника $(F_{max}-F_{st})/F_{st}$, що знижує інтенсивність темної фіксації CO_2 .

Вплив нанопрепаратів на показники ІФХ квасолі звичайної

Нанокompозити	F_o	F_{pl}	F_{max}	F_{st}	F_v	K_i	dF_{pl}	dF_{pl}/F_v	F_v/F_{max}	$(F_{max}-F_{st})/F_{st}$
Контроль	704 ±104,8 7	1525 ±112,41	2421 ±153,81	864 ±146,67	1717,31	0,71	821,31	0,48	0,71	1,80
Saponite H+	757 ±36,83	1371 ±264,14	1717 ±454,12	752 ±83,16	960,01	0,56	613,32	0,64	0,56	1,28
Nb-Sap-Cl	704 ±80,00	1659 ±122,24	2741 ±161,87	826 ±33,31	2037,32	0,74	954,63	0,47	0,74	2,32
Nb-Sap-Eto	704 ±27,73	1525 ±160,32	2779 ±257,16	853 ±48,86	2074,63	0,75	821,31	0,40	0,75	2,26

За умов використання нанокompозиту Saponite-H зменшувалась варіабельна флуоресценція (F_v), що підтверджує перехід більшої частини хлорофілів у неактивну форму. Показник F_v/F_{max} істотно знижувався, що супроводжувалося суттєвим пригніченням фотохімічних реакцій ФС 2 [1]. Нанокompозити Nb-Sap-Cl і Nb-Sap-EtO виявляли стимулювальний вплив на ІФХ, шляхом покращення

проходження фотосинтетичних реакцій, підвищення інтенсивності темної фіксації CO₂ та збільшення варіабельної флуоресценції рослин квасолі звичайної.

ВИСНОВКИ

1. Нанокompозити на основі сапонітів не впливали на енергію проростання та схожість насіння квасолі звичайної. Їх токсичність також не була виявлена.

2. Використання нанокompозиту Nb-Sap-EtO зумовлювало стимулювання проростання насіння, тоді як Saponite-H⁺ частково пригнічував цей процес.

3. Нанопрепарати Nb-Sap-Cl і Nb-Sap-EtO сприяли підсиленню фотосинтетичних реакцій, підвищенню інтенсивності темної фіксації CO₂, збільшенню варіабельної флуоресценції, водночас як нанокompозит Saponite-H⁺ - гальмував фотосинтетичні процеси в листках рослин квасолі звичайної. Гальмівний ефект нанокompозиту Saponite-H⁺ на рослини пояснюється змінами його хімічних і фізичних властивостей, зокрема, значною площею його активної поверхні.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel / [A. Nel, T. Xia, L. Madler, N. Li] // *Science* / - 2006. 311. P.622–627.
2. C.S.Yah, G.S. Simate, S.E. Iyuke Nanoparticles toxicity and their routes of exposures. *Pak. J. Pharm Sci.* 25 (2012) P.477-491.
3. A Predictive Toxicological Paradigm for the Safety Assessment of Nanomaterials / [H. Meng, T. Xia, S. George, A. E. Nel] // *ACS Nano*. - 2009. №3. P.1620–1627.
4. Cytotoxicity of Nanoparticles / [N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezek] // *Small*. 2008. №4 - P.26–49.
5. Nanogenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials / [Singh N., Manshian B., Jenkins G.J. et al] // *Biomaterials*. 2009. 30(23–24) - P.3891–3914.

6. Whitesides G.M. The “right” size in nanobiotechnology / G.M. Whitesides / Nature Biotechnology. – 2003. – Vol.21. – P.1161-1165
7. Электроэрозионная технология соединений и порошков металлов / [Асанов У.А., Цой А.Д., Щерба А.А и др.] – Фрунзе: Илим, 1990.– 256 с.
8. Веселовский В.А. Люминесценция растений: Теоретические и практические аспекты / В.А. Веселовский, Т.В. Веселова - М.: Наука, 1990. - 200 с.
9. Грицаєнко З.М. Методи біологічних та агрохімічних досліджень рослин та ґрунтів / З.М. Грицаєнко, А.О. Грицаєнко, В.П. Карпенко. – К.: ЗАТ «НІЧЛАВА», 2003. - 320 с.
10. Інструментальне вивчення фотосинтетичного апарату за допомогою індукції флуоресценції хлорофілу / [Брайон О.В., Корнеєв Д. Ю., Снегур О.О., Китаєв О. І.: Методичні вказівки для студентів біологічного факультету – Київ: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет», 2000.– 15 с.
11. Корнеєв Д. Ю. Информационные возможности метода индукции флуоресценции хлорофила / Д. Ю. Корнеєв. – К.: Альтерпрес, 2002. – 188с.
12. Нанотехнології в сучасному сільському господарстві / [Ситар О.В., Новицька Н.В. , Таран Н.Ю. та ін.] //Фізика живого 2010. - Т.18, № 3. 113-116 с.
13. Патент України на корисну модель № 24908. Спосіб визначення фізіологічного стану рослин методом індукції флуоресценції хлорофілу / Шерер В.О., Сарахан Є. В. – Опубл. 25.07.2007, бюл. № 11.
14. Физиологические и биохимические методы анализа растений: Практикум / Калинингр.ун-т; Авт.-сост. Г. Н. Чупахина. – Калининград, 2000. – 28–30с.

Биологический эффект наноконпозитов на растения

М. В. Таран, К.Е. Шаванова, М. Ф. Стародуб

Показаны результаты изучения влияния ряда наноконпозитов на состояние фотосинтетического аппарата фасоли обыкновенной методами биосенсорики,

обеспечивающими экспресс-диагностику состояния растений. Определены показатели ИФХ, энергия прорастания, всхожесть семян фасоли обыкновенной под влиянием наноматериалов на основе Saponite ($Si_{7.34}Al_{0.66}Mg_6 O_{20} ((OH)_4)$)

Ключевые слова: ИФХ, наноконпозиты, биосенсор, энергия прорастания, всхожесть.

Biological effects of nanocomposites on the plant

M. V. Taran, K.E. Shavanova, M. F. Starodub

The results of studying the influence of the number of nanocomposites on the state of the photosynthetic apparatus of the bean conventional by the methods of biosensors that provide rapid diagnosis of plant are presented. Indices of IFH, vigor, germination of beans usually under the influence of nanomaterials based Saponite ($Si_{7.34}Al_{0.66}Mg_6 O_{20} ((OH)_4)$) were analyzed.

Keywords: IFH, nanocomposites, biosensor, germination energy, germination.