

## ЕКОТОКСИКОЛОГІЧНЕ ОЦІНЮВАННЯ НАНОПРЕПАРАТІВ ШЛЯХОМ БІОТЕСТУВАННЯ

**Н. А. МАКАРЕНКО**, доктор сільськогосподарських наук

**Л. В. РУДНІЦЬКА**, аспірант\*

*Національний університет біоресурсів і природокористування України*

*Представлено результати з розроблення наукових підходів до визначення чутливості біотестів відносно нанопрепаратів. Показано, що для оцінювання небезпечності нанопрепаратів доцільно використовувати біотести, які характеризуються високою чутливістю - відхилення від оптимуму фіксується за мінімальних концентрацій і становить не менше 25 %.*

**Ключові слова:** *нанопрепарати, екотоксикологічна оцінка, біотести*

Створення нанодобрих і нанопестицидів із "розумним" вивільненням "нанокаталізаторів", здатних підвищувати ефективність дії традиційних препаратів, є актуальним напрямом наукових досліджень. Проте, специфічні фізичні і хімічні властивості наночастинок, порівняно з більш крупними частинками, можуть мати несподівані ризики для екосистем. Наразі, відсутня система екотоксикометрії для врахування специфічних впливів нанопрепаратів на нецільові об'єкти природних екосистем. Відмічається значне випередження розвитку нанотехнологій над дослідженнями з вивчення їх негативного впливу на людину та біоту природних екосистем: у світовій літературі налічується понад 31000 наукових публікацій з нанотехнологій, із них близько 400 – з наноекотоксикології. Тому пошук чутливих тест-організмів та біоіндикаторів, розроблення системи показників, нормативів, критеріїв, які б дозволили враховувати особливості впливу нанопрепаратів на біохімічні процеси у клітині, стан організму і популяції, в цілому, є важливим і актуальним завданням сьогодення.

Виходячи з вищезазначеного, першочерговим нашим дослідженням було оцінювання різних біотестів за рівнем їх чутливості відносно нанопрепаратів,

---

\* Науковий керівник – доктор сільськогосподарських наук, Н. А. Макаренко

що застосовуються у рослинництві. Найчутливіші методи біотестування передбачається рекомендувати для використання під час державних випробувань нових нанопрепаратів в Україні.

**Матеріали та методи досліджень.** Досліджували нанопрепарати Nano-Gro та Аватар- 1, які застосовуються у сільськогосподарському виробництві з метою створення оптимальних умов росту і розвитку сільськогосподарських рослин.

Nano-Gro, препарат виробництва США, представляє собою водорозчинні гранули діаметром близько 4 мм, масою 0,05 г з масовою долею активних компонентів сульфатів заліза, кобальту, алюмінію, магнію, марганцю, нікелю та срібла  $2,84 \cdot 10^{-9}$  % гранули або  $1,43 \cdot 10^{-11}$  г.

Аватар-1, препарат вітчизняного виробництва, представляє собою колоїдний розчин особливо чистих карбоксилатів природних харчових кислот та особливо чистих біогенних металів нанорозмірів (1-100 нм) у концентрації (мг/л): Cu – 800, Zn – 70, Mg – 800, Ag – 1,3, Mn – 50, Co – 25, Cr – 0,3, Mo – 25, Fe–80, Se – 15, Ge –15,0 в деіонізованій воді чистотою 99,99999 %.

Вивчали концентрації, які відповідали наступним нормам внесення нанопрепаратів під сільськогосподарські культури (табл.1).

### **1. Норми внесення нанопрепаратів під сільськогосподарські культури**

Назва нанопрепарату	Норми внесення, мг/га	Концентрація розчину, %
Nano-Gro	100 (рекомендована)	0,05
	200	0,10
	300	0,15
	400	0,20
Аватар -1	50 (рекомендована)	0,025
	100	0,050
	150	0,075
	200	0,100

Для пошуку чутливих тест-систем використовували традиційні біоіндикатори: кресс – салат (*Lepidium sativum* L.), горох посівний

(*Pisumsativum* L.), редис посівний з білим кінчиком (*Raphanussativus* L.), ячмінь ярий (*Hordeum* L.) [1,2], мікроорганізми ґрунту (групи, які беруть участь у перетворенні сполук азоту і визначають його нітрифікаційну здатність). Показники інгібування встановлювали за ДСТУ ISO 14238:2003 [3].

**Результати дослідження.** В основу екотоксикологічної характеристики препаратів нами було покладено класичні підходи В. Шелфорда, а саме реакцію організмів-стенобіонтів на такий лімітуючий чинник як концентрація речовини. Відомо, що організми-стенобіонти здатні вижити лише в діапазоні мінливості чинника, який ще називають амплітудою. Порогове значення концентрації, за якої порушуються процеси метаболізму у клітині, що у свою чергу, призводить до порушення функціонування окремих органів, організму, популяції, є критичною точкою. Діапазон між оптимальними і критичними концентраціями прийнято позначати як зону екотоксикологічної толерантності. За оптимум приймали варіант без внесення добрива (природні умови розвитку організму) і досліджували відхилення від нього на фоні збільшення концентрацій препарату.

До першої групи відносилися біотести, які характеризуються морфометричними показниками росту і розвитку.

Результати досліджень показали, що морфометричні показники розвитку кресс-салату (*Lepidium sativum* L.), гороху посівного (*Pisumsativum* L.), редису посівного з білим кінчиком (*Raphanussativus* L.), безумовно, залежали від норм внесення препаратів (або концентрацій робочих розчинів). Спостерігалася загальна тенденція - підвищення концентрації препаратів більше пригнічувало розвиток кореня, ніж розвиток стебла (табл.2).

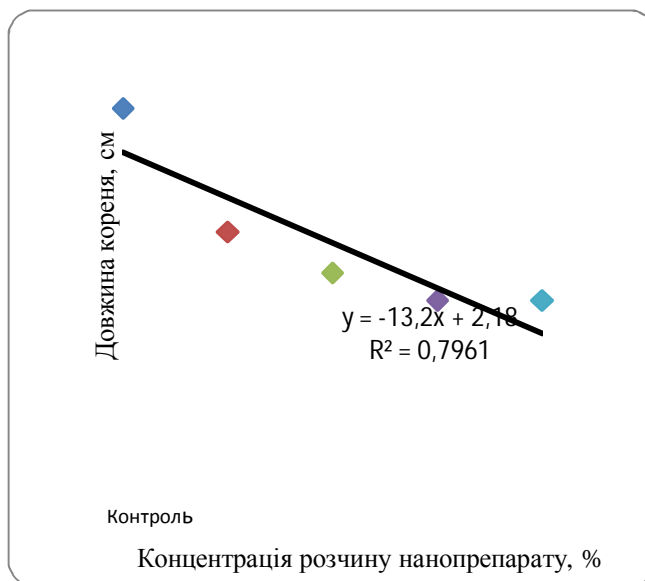
Серед фітотестів, що досліджувалися, найчутливішим виявився кресс-салат (*Lepidium sativum* L.) – інгібування росту кореня вже спостерігалася за застосування норм, які рекомендовані виробництву. Так, навіть за низьких концентрацій Аватару-1 (0,025 %) було зафіксовано зменшення довжини стебла в 1,2 рази, кореня – в 1,6 раза, тоді як за максимальної концентрації (0,100 %) це пригнічення збільшилося відповідно у 1,3 та 2,3 рази (рис.1).

## 2. Вплив нанопрепаратів на морфометричні показники розвитку

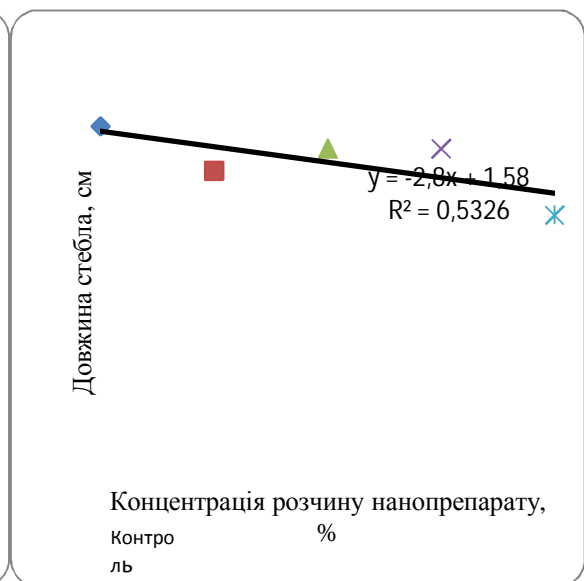
### тест-культур

Нано-препарат	Норма внесення, мл/га	Довжина кореня, см			Довжина стебла, см		
		Кресс салат	Горох	Редис	Кресс салат	Горох	Редис
Контроль	-	2,5±0,68		2,1±0,71	1,6±0,37	1,5±0,20	1,2±0,11
Аватар - 1	50	1,6±0,06	**	1,9±0,18	1,4±0,09	1,7±0,19	1,3±1,01
	100	1,3±0,10	-	2,8±0,14	1,5±0,21	1,5±0,01	2,1±0,81
	150	1,1±0,32	-	1,7±1,00	1,5±0,50	1,4±0,16	1,5±0,13
	200	1,1±0,60	-	1,6±0,37	1,2±0,30	1,7±0,13	0,9±0,15
Nano Gro	100	1,0±0,05	-	2,6±0,31	1,5±0,04	1,6±0,31	1,4±0,12
	200	1,6±0,36	-	2,2±0,04	1,3±0,10	1,8±0,40	1,5±0,13
	300	0,8±0,04	-	2,0±0,64	1,4±0,03	1,7±0,83	2,2±0,87
	400	1,4±0,35	-	2,8±0,06	1,6±0,01	1,8±0,15	1,3±0,19

\*\* - під час проростання насіння гороху розвивається тільки один головний зародковий корінець (епікотиль)



а)



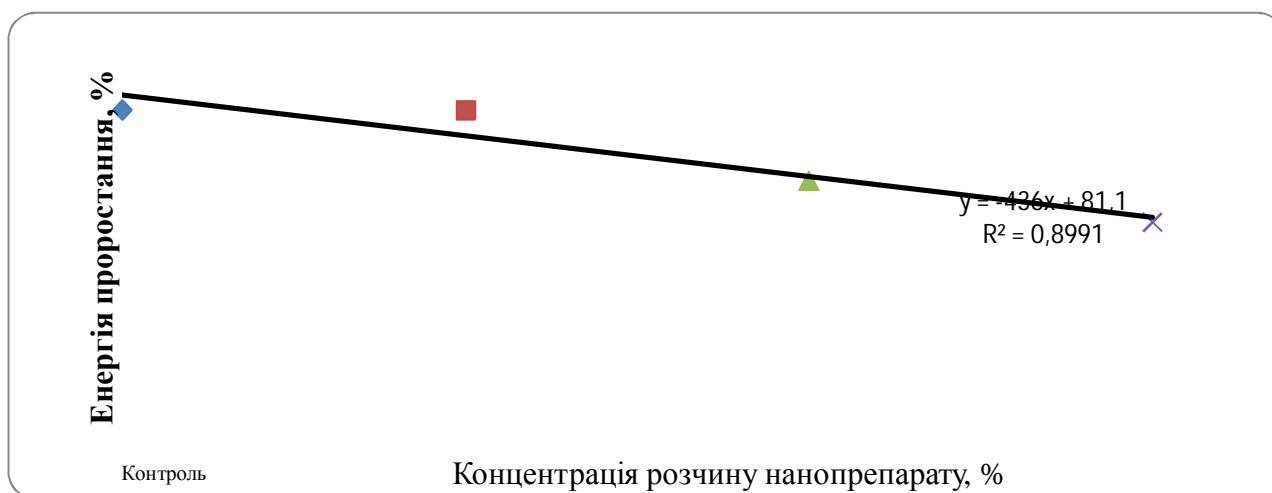
б)

**Рис.1. Вплив нонопрепарату Аватар-1 на ростові процеси кресс-салату (*Lepidium sativum* L.): а) довжина кореня, б) довжина стебла**

Дослідження впливу нанопрепаратів на енергію проростання насіння тест-культур також виявили тенденцію до пригнічення ростових процесів із збільшенням норм внесення (табл. 3). Найбільш чутливим до підвищених концентрацій Аватару-1 і Nano-Gro виявилися рослини гороху (*Pisum sativum* L.). Пригнічення енергії проростання його насіння досягало 39 % відносно контролю, що може бути підставою для подальшого використання цього тесту в екотоксикологічних дослідженнях (рис. 2).

### **3. Вплив нанопрепаратів на енергію проростання насіння тест-культур**

Нанопрепарат	Норма внесення, мл/га	Енергія проростання насіння тестових культур, %		
		кресс - салат	горох	редис
Контроль	-	77±0,24	77±0,82	85±0,82
Аватар - 1	50	78±0,24	77±0,41	87±1,63
	100	67±0,62	58±0,85	89±1,65
	150	75±0,41	47±1,43	89±0,47
	200	76±0,41	77±0,41	86±0,82
Nano - Gro	100	51±1,22	64±0,82	92±0,82
	200	81±1,25	65±1,03	91±1,63
	300	60±0,41	61±0,41	83±1,22
	400	74±0,82	62±0,82	89±0,41



**Рис. 2. Вплив нанопрепарату Аватар – 1 на енергію проростання гороху (*Pisum sativum* L.)**

Гальмівна дія нанопрепаратів на ріст і розвиток насіння ячменю, практично, не проявилась. Деякі тенденції спостерігалися лише для препарату Nano-Gro: було помічено відхилення від контролю у бік гальмування процесів проростання для концентрації, що відповідала нормі внесення 400 мл/га (рекомендована норма – 100 мл/га) - 17,1 % (табл. 4). Отримані результати дозволяють зробити висновок, що показник гальмування розвитку насінини ячменю не буде перспективним для екотоксикологічного біотестування нанопрепаратів.

#### **4. Визначення гальмівної дії нанопрепаратів на ріст кореня ячменю**

Нанопрепарат	Норма внесення, мл/га	Довжина кореня, см	Відхилення від контролю, %
Контроль	-	41±5,84	-
Аватар - 1	50	49±4,48	19,5
	100	66±7,98	61,0
	200	41±1,25	0,0
	400	41±6,25	0,0
Nano - Gro	100	63±4,73	53,7
	200	48±7,15	17,1
	400	53±5,76	29,2
	800	34±6,24	-17,1

Відомо, що бактерії, які беруть участь у перетворенні сполук азоту ґрунту, мають високу чутливість до дії хімічних речовин. Процеси перетворення відбуваються за участі азотфіксуючих бактерій (*Phizobium*, *Azotobacter* та деяких актиноміцетів), денітрифікуючих бактерій (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aeruginosa* та ін.), бактерій, що приймають участь у процесах амоніфікації та нітрифікації. Інтегральним показником активності всіх цих бактерій є нітрифікаційна здатність ґрунту. Саме цей показник використовували для екотоксикологічного оцінювання нанопрепаратів. Показником, що характеризує пригнічення активності бактерій, є показник інгібіторної дії (ID).

Цей показник розраховується як:

$$100 - \frac{\text{Кількість міліграм } \text{NO}_3^- \text{ на кілограм обробленого ґрунту}}{\text{Кількість міліграм } \text{NO}_3^- \text{ на кілограм необробленого ґрунту}} * 100.$$

Отримані результати показали високу чутливість мікроорганізмів ґрунту до дії нанопрепаратів, що проявлялося у порушенні процесів синтезу-мініралізації сполук азоту (табл. 5). Пригнічення нітрифікаційної здатності ґрунту коливалося у межах 51-96 % і підтверджувалося величиною ID. Можна, без сумніву, стверджувати про високу ефективність використання цього біотесту для оцінювання небезпечності нанопрепаратів.

##### **5. Вплив нанопрепаратів на нітрифікаційну здатність чорнозему типового**

Нанопрепарат	Концентрація, %	Нітрифікаційна здатність ґрунту, мг/кг	Інгібіторна дія на мініралізацію (ID)
Контроль	-	60,4±1,50	-
Аватар - 1	0,025	19,8±0,15	-49,0
	0,05	29,5±3,19	-37,0
	0,1	19,6±3,01	-49,0
Nano - Gro	0,05	2,0±0,51	-70,0
	0,1	5,6±1,86	-66,0
	0,2	4,8±0,57	-67,0

Керуючись вищезазначеними принципами, було проаналізовано всі біотести (табл. 6) і визначено найбільш придатні для екотоксикологічної оцінки нанопрепаратів:

1. кресс-салат за показниками довжини кореня,
2. горох за показником енергії проростання насіння,
3. нітрифікаційна здатність ґрунту за показником інгібіторної дії.

### **6.Оцінювання чутливості біотестів, з точки зору їх придатності для здійснення екотоксикологічної характеристики нанопрепаратів**

Відхилення від контролю у сторону погіршення показників росту, розвитку, активності процесів тощо	Чутливість тесту	Придатність тесту для екотоксикологічної оцінки нанопрепаратів
51-100 %	високо чутливий	придатний
25-50 %	чутливий	
10-25	помірно чутливий	обмежено придатний
<10	мало чутливий	не придатний

Таким чином, для вдосконалення системи екотоксикометрії нанопрепаратів можна рекомендувати використання високо чутливих і чутливих біотестів, що дозволить врахувати їх специфічні впливи на нецільові об'єкти природних екосистем і попередити можливі негативні впливи на довкілля.

### **Висновки**

У результаті дослідження розроблено наукові підходи до визначення чутливості біотестів відносно нанопрепаратів. Показано, що для оцінювання небезпечності нанопрепаратів доцільно використовувати біотести, які характеризуються високою чутливістю-відхилення від оптимуму фіксується за мінімальних концентрацій і становить не менше 25 %. До таких біотестів відносяться кресс-салат за показниками довжини кореня, горох за показником енергії проростання насіння, нітрифікаційна здатність ґрунту за показником інгібіторної дії.

### **Оцінювання біотестів за критерієм відхилення від контролю %**

Нано-	§ §	Показники розвитку рослин	Нітр
-------	-----	---------------------------	------



препарат		морфометричні						енергія проростання насіння			гальмівна дія на ріст кореня ячменю	іфікаційна здатність ь ь грунту
		довжина кореня			довжина стебла			кресс - салат	горох	редис		
		кресс салат	горох	редис	кресс салат	горох	редис					
Аватар-1	50	-36,8	-	-9,5	-12,5	13,3	8,3	1,3	0,0	2,4	19,5	-67,2
	100	-48,0		33,3	-6,3	0,0	75,0	-13,0	-24,7	4,7	61,0	-51,2
	150	-56,0		-19,0	-6,3	-6,7	25,0	-2,6	-40,0	4,7	0,0	-
	200	-56,0		-23,8	-25,0	13,3	-25,0	-1,3	0,0	1,2	0,0	-67,5
Nano-Gro	100	-60,0	-	23,8	-6,3	6,7	16,7	-33,8	-16,8	8,2	53,7	-96,7
	200	-36,0		4,8	-18,8	20,0	25,0	5,2	-15,6	7,1	17,1	-96,7
	300	-68,0		-4,8	-12,5	13,3	83,3	-22,1	-20,8	-2,4	29,2	-90,7

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести: ГОСТ 12038 – 84. – М.: Стандартиформ, 2011.
2. Якість ь ь грунту. Визначення дії забрудників на флору грунту. Частина 1. Метод визначення гальмівної дії на ріст коренів (ISO 11269-1:1993, IDT) : ДСТУ ISO 11269-1:2004. – [Чинний від 2005-07-01]. – К.: Держспоживстандарт України, 2005.- 10 с.
3. Якість ь ь грунту. Біологічні методи. Визначення мінералізації азоту і нітрифікації в ь ь грунтах та впливу хімічних речовин на ці процеси (ISO 14238:1997, IDT): ДСТУ ISO 14238:2003. – [Чинний від 2003 – 11 – 06]. – К.: Держспоживстандарт України, 2004. – 12.с.

## **ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ОЦЕНИВАНИЕ НАНОПРЕПАРАТОВ ПУТЕМ БИОТЕСТИРОВАНИЯ**

**Н. А. Макаренко, Л. В. Рудницкая**

*Представлены результаты по разработке научных подходов к определению чувствительности биотестов относительно нанопрепаратов. Показано, что для оценки опасности нанопрепаратов целесообразно использовать биотесты, которые характеризуются высокой чувствительностью - отклонение от оптимума фиксируется при минимальных концентрациях и составляет не менее 25 %.*

**Ключевые слова:** *нанопрепараты, экотоксикологическая оценка, биотесты*

## ***ECOTOXICOLOGICAL ASSESSMENT NANOPREPARATIV BY BIOASSAY***

**N. A. Makarenko, L. V. Rudnitska**

*The results of the development of scientific approaches to determine the relative sensitivity bioassays nanopreparativ. It is shown that for hazard assessment nanopreparativ should be used bioassays, which are characterized by high sensitivity - a deviation from the optimum fixed at minimum concentrations and is at least 25 %.*

**Key words:** *nanopreparaty, ecotoxicological assessment, bioassays*