

БИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ МЕТАЛЛОВ НА РАСТЕНИЕ *LEMNA MINOR*

А.М. Короткова^{1,2}, Д.Б. Косян²

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Оренбургский государственный университет», Оренбург, Россия, anastasiaporv@mail.ru

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук», Оренбург, Россия, kosyan.diana@mail.ru

Аннотация. Все больше исследований исследователи посвящают наночастицам (НЧ) металлов и раскрытию механизмов их воздействия на водные растения, поскольку многие НЧ склонны проявлять большую токсичность в водной фазе. В своем исследовании мы использовали водное растение ряска малая (*Lemna minor* L.). Внесение в водную среду НЧ CeO₂ (1, 10 и 100 мг/л) от 7 до 30 дней способствовало небольшому ингибированию роста Ряски относительно контроля. Анализ активности редуктаз с помощью соли тетразолия продемонстрировал, что наиболее токсичными оказались 10 и 100 мг/л НЧ CeO₂, вызывающие снижение выхода формазана после 14 суток экспозиции на 27% и после 30 дней – на 31% по сравнению с контролем, соответственно. Текущее исследование подтвердило, что нано-CeO₂ не приводит к заметным метаболическим изменениям и токсическим эффектам в водной среде в отношении растений ряска.

Ключевые слова: наночастицы оксида церия, активные формы кислорода, ДНК, жизнеспособность клеток, ряска

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1063-1066

Введение. Все больше исследований в научном мировом сообществе посвящено наночастицам металлов (НЧМ) и раскрытию механизмов их воздействия на водные растения, поскольку многие НЧ склонны проявлять большую токсичность именно в водной фазе [Nowack et al., 2012]. С этой позиции очень мало известно о поведении НЧ диоксида церия CeO₂, широко используемых во многих областях [Giraldo et al., 2014]. Интерес к данному металлу-антиоксиданту вызван его способностью непосредственно вовлекаться в окислительно-восстановительный цикл и быстро изменять свою степень окисления (Ce³⁺ и Ce⁴⁺) [Cassee et al., 2011]. Несмотря на то, что была исследована острая токсичность и в целом подробно описаны биологические свойства НЧ CeO₂ для растений [Du et al., 2015; Zhao et al., 2015], их эффекты в водной среде до сих пор неизвестны и мало обсуждаются [Schwabe et al., 2013; Collin et al., 2014]. Очень мало работ, посвященных проблематике развития биологических эффектов НЧ оксида церия в водных растениях [Blinova et al., 2017]. Все это делает актуальным более детальное исследование механизмов воздействия НЧ CeO₂ на растительные организмы на клеточном и молекулярном уровнях.

Материалы и методы. В исследовании использовалось водное растение ряска малая (*Lemna minor* L.). Преимущества выбора Ряски в качестве тестового водного организма следующие: 1) макрофиты являются одним из основных автотрофов в экосистемах малых озер и рек; 2) высокая репродуктивная скорость, небольшой размер и легкость выращивания; 3) тест ингибирования роста с помощью *Lemna* sp. широко используется в экотоксикологических исследованиях наноматериалов [Li et al., 2013].

В работе были взяты НЧ CeO₂ диаметром 57±8 нм, изготовленные компанией «Advanced powder technologies LLC» (Россия). Для проведения исследования НЧМ диспергировали в течение 30 мин ультразвуком (f-35 кГц, N-300 Вт, A-10 мкА). Размер и дзета-потенциал диспергированных в водных суспензиях НЧМ оценивали с помощью

лазерного автокорреляционного анализатора Photocor (Россия). Дзета-потенциал наночастиц в водных суспензиях составлял – $15,98 \pm 0,19$ мВ.

Растения выращивали в течение 3 суток в водной среде без металла, а затем добавляли НЧ CeO_2 в концентрации 1, 10 и 100 мг/л и обрабатывали в течение 7, 14 и 30 суток. Предварительными испытаниями выявлено, что концентрация 10 мг/л является пороговой или субтоксической, что соответствует паспорту безопасности оксида церия (https://www.carlroth.com/downloads/sdb/ru/7/SDB_7042_RU_RU.pdf). Для оценки биологического воздействия нано-церия брали среднюю пробу, которая состояла из листьев 3-х растений в трех биологических повторностях.

В конце эксперимента было подсчитано ингибирование роста по сравнению с контролем для каждой тестируемой концентрации НЧ CeO_2 , выраженное как % ингибирования роста (OECD Guideline for Testing of Chemicals, №221, 2006) и подсчитана жизнеспособность (ЖС) клеток по изменению ферментативной активности редуктаз согласно протоколу производителя (WST-8 patent №2.251.850, Канада) с помощью высокочувствительного теста «Cell counting kit-8 (СКК-8)» («Sigma-Aldrich», США), основанного на использовании водорастворимой соли тетразолия (WST-8) [Castro-Concha et al., 2006]. Для проведения СКК-8-теста готовили клеточные суспензии – растирали листья 3 растений массой 40 мг в течение 10 мин в 120 мкл ФСБ, центрифугировали 5 мин при 10000 об/мин. Далее отбирали 100 мкл супернатанта и смешивали с 10 мкл красителя СКК-8 в 96-луночной планшете. Полученные пробы инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. После этого каждые 15 мин проводили измерение ОП при $\lambda=450$ нм (WST-8 patent №2.251.850, Канада) с использованием микропланшетного ридера («Тесан», Австрия) в режиме встряхивания и обогрева до 37 °С. Количество ЖС клеток (в %) рассчитывали по формуле из соотношения ОП опытных проб (ОП_о) к значениям контрольных (ОП_к) за вычетом фонового поглощения реагентов набора (СКК8): $\text{ЖС} = ((\text{ОП}_o - \text{ОП}_k) / (\text{ОП}_k - \text{СКК8})) \cdot 100\%$.

Результаты и их обсуждение. Внесение в водную среду НЧ CeO_2 (1, 10 и 100 мг/л) от 7 до 30 дней способствовало небольшому ингибированию роста ряски относительно соответствующего контроля ($P \leq 0,05$), но значения не превышали 20%, независимо от времени воздействия и от морфологической части растения (рис. 1).

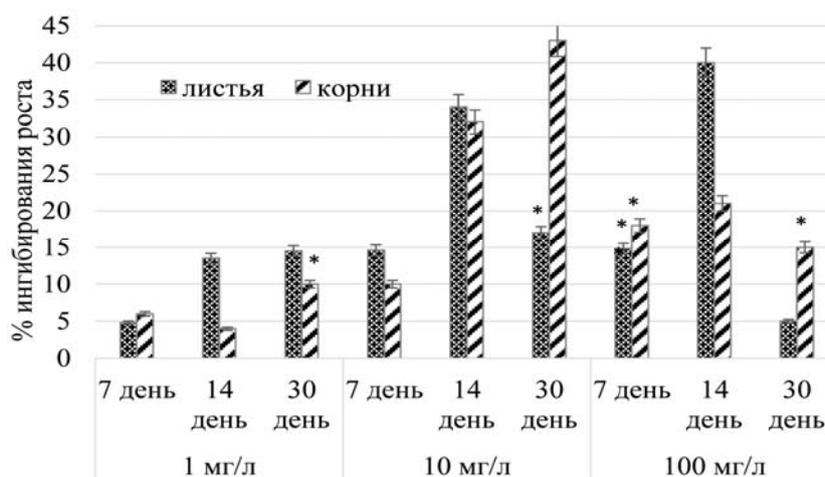


Рис. 1. Значения процента ингибирования роста (% от контроля) *L. minor* после воздействия НЧ CeO_2 (1, 10 и 100 мг/л), * вариант, достоверно отличающийся от контроля (значение $P \leq 0,05$).

Анализ активности редуктаз с помощью водорастворимой соли тетразолия продемонстрировал, что наиболее токсичными оказались 10 и 100 мг/л НЧ CeO_2 ,

вызывающие снижение выхода формазана после 14 суток экспозиции на 27% и после 30 дней – на 31% по сравнению с контролем, соответственно. Напротив, воздействие 1 мг/л НЧ CeO₂ приводило к более плавному снижению ЖС (не более чем на 10% к контролю). Другими исследователями показана высокая устойчивость растений к нано-CeO₂ [Giraldo et al., 2014].

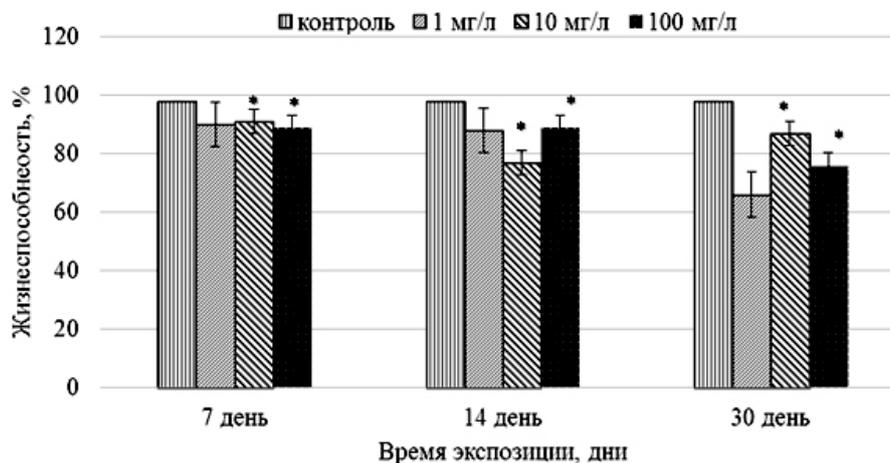


Рис. 2. Процент жизнеспособности *L. minor* после 7, 14 и 30 дней воздействия различных концентраций НЧ CeO₂: контроль=0 мг/л, 1 мг/л, 10 мг/л и 100 мг/л; вертикальный бар означает стандартное отклонение от среднего; *вариант, достоверно отличающийся от контроля (значение $P \leq 0,05$).

Текущее исследование подтвердило, что нано-CeO₂ не приводит к заметным метаболическим изменениям и токсическим эффектам в водной среде в отношении растений ряски.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Гранта РФФИ № 18-316-00116.

Литература

Blinova I., Kanarbik L., Irha N., Kahru A. Ecotoxicity of nanosized magnetite to crustacean *Daphnia magna* and duckweed *Lemna minor* // *Hydrobiologia*. – 2017. – V. 798. – P. 141–149.

Cassee F.R., van Balen E.C., Singh C., Green D., Muijser H., Weinstein J., Dreher K. Exposure, health and ecological effects review of engineered nanoscale cerium and cerium oxide associated with its use as a fuel additive // *Crit. Rev. Toxicol.* – 2011. – V. 41 (3). – P. 213–229.

Collin B., Auffan M., Johnson A.C., Kaur I., Keller A.A., Lazareva A., Lead J.R., Ma X., Ruth C., Merrifield R.C., Svendsen C., White J.C., Unrine J.M. Environmental release, fate and ecotoxicological effects of manufactured ceria nanomaterials // *Environ. Sci. Nano.* – 2014. – V. 1. – P. 533.

Du W.C., Gardea-Torresdey J.L., Ji R., Yin Y., Zhu J.G., Peralta-Videa J.R., Guo H.Y. Physiological and biochemical changes imposed by CeO₂ nanoparticles on wheat: a life cycle field study // *Environ. Sci. Technol.* – 2015. – V. 49. – P. 11884–11893.

Giraldo J.P., Landry M.P., Faltermeier S.M. et al. Plant nanobionics approach to augment photosynthesis and biochemical sensing // *Nat. Mater.* – 2014. – V. 89. – P. 10–17.

Li L., Sillanpaa M., Tuominen M., Lounatmaa K., Schultz E. Behavior of titanium dioxide nanoparticles in *Lemna minor* growth test conditions // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2013. – V. 88. – P. 89–94.

Nowack B., Ranville J.F., Diamond S., Gallego-Urrea J.A., Metcalfe C., Rose J., Horne N., Koelmans A.A., Klaine S.J. Potential scenarios for nanomaterial release and subsequent alteration in the environment // *Env. Toxic. Chem.* – 2012. – V. 31. – P. 50–59.

Schwabe F., Schulin R., Limbach L.K., Stark W., Bürge D., Nowack B. Influence of two types of organic matter on interaction of CeO₂ nanoparticles with plants in hydroponic culture // *Chemosphere.* – 2013. – V. 91. – P. 512–520.

Zhao L.J., Sun Y., Hernandez-Viezcas J.A., Hong J., Majumdar S., Niu G.H., Duarte-Gardea M., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. Monitoring the environmental effects of CeO₂ and ZnO nanoparticles through the life cycle of corn (*Zea mays*) plants and in situ μ -XRF mapping of nutrients in kernels // *Environ. Sci. Technol.* – 2015. – V. 49. – P. 2921–2928.

BIOLOGICAL ASPECTS OF NANOSTRUCTURED METAL IMPACT ON THE *LEMNA MINOR* PLANT

A.M. Korotkova^{1,2}, D.B. Kosyan²

¹Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Orenburg State University», Orenburg, Russia *anastasiaporv@mail.ru*

²Federal Scientific Center of Biological Systems and Agrotechnologies RAS, Orenburg, Russia, *kosyan.diana@mail.ru*

Abstract. More and more researches are devoted to nanoparticles (NP) of metals and the discovery of the mechanisms of their influence on aquatic plants, since many NPs tend to show more toxicity in the water phase. In our study, we used an aquatic plant of *Lemna minor* L. The introduction of NP CeO₂ (1, 10 and 100 mg/l) from 7 to 30 days in the aqueous medium promoted a slight inhibition of the growth of the Lemna relative to control. Analysis of reductase activity with the tetrazolium salt showed that 10 and 100 mg/l of NP CeO₂ proved to be the most toxic, causing a decrease in the yield of formazan after 14 days of exposure by 27% and after 30 days by 31% compared to the control, respectively. The current study confirmed that nano-CeO₂ does not lead to significant metabolic changes and toxic effects in the aquatic environment against duckweed plants.

Keywords: cerium oxide nanoparticles, active oxygen species, DNA, cell viability, duckweed