

ВЛИЯНИЕ РАЗМЕРА И КОНЦЕНТРАЦИИ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ НА ИХ БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ

INFLUENCE OF THE SIZE AND CONCENTRATION OF METAL NANOPARTICLES ON THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY

**G. Churilov
I. Obidina
D. Churilov
S. Polishchuk**

Summary. The stimulating effect of various nanopowders of metals of different chemical nature on the ontogeny of plants continues to be a subject of numerous studies. As a result of laboratory and field experiments, we found that for nanopowders of iron, copper, cobalt, and zinc with a particle size of 35–60 nm, the correlation of biological activity and the effect of “small doses” is particularly evident. The positive effect is based on the effect of biologically active particles of nanometals at the cell level. Direct dependence of the pH value of the dispersed solution of metal nanopowders on the size and concentration of particles was observed. Certain concentrations of nanoparticles caused an increase in phytohormones in the studied plants. Electron microscopic analysis of the partition of metals in the tissues of experimental plants did not reveal deviations from control values.

Keywords: nanoparticles, ultrafine powders, germination energy, biological activity, enzymes, phytohormones, toxic effect.

Чурилов Геннадий Иванович

Д.б.н., доцент, ФГБОУ ВО «Рязанский
государственный медицинский университет имени
академика И. П. Павлова»
genchurilov@yandex.ru

Обидина Инна Вячеславовна

Д.б.н., ассистент, ФГБОУ ВО «Рязанский
государственный медицинский университет имени
академика И. П. Павлова»
inna.obidina@mail.ru

Чурилов Дмитрий Геннадьевич

Д.т.н., доцент, ФГБОУ ВО «Рязанский
государственный агротехнологический университет
имени П. А. Костычева»
churilov.dmitry@yandex.ru

Полищук Светлана Дмитриевна

Профессор, ФГБОУ ВО «Рязанский государственный
агротехнологический университет имени
П. А. Костычева»
svpolishuk@mail.ru

Аннотация. Стимулирующее действие на онтогенез растений различных по химической природе нанопорошков металлов продолжает оставаться объектом многочисленных исследований. В результате лабораторных и полевых испытаний нами установлено, что для нанопорошков железа, меди, кобальта и цинка при размерах частиц 35–60 нм, корреляция биологической активности и эффекта «малых доз» проявляется наиболее ярко. В основе положительного влияния лежит воздействие биологически активных частиц нанометаллов на уровне клетки. Наблюдалась прямая зависимость величины pH диспергированного раствора нанопорошков металлов от размера и концентрации частиц. Определенные концентрации наночастиц вызывали увеличение фитогормонов в исследуемых растениях. Электронно-микроскопический анализ распределения металлов в тканях экспериментальных растений не выявил отклонений от контрольных значений.

Ключевые слова: наночастицы, ультрадисперсные порошки, энергия прорастания, биологическая активность, ферменты, фитогормоны, токсическое действие.

Введение

Взаимодействие с живыми организмами наночастиц, отличающихся по физико-химическим свойствам природного и техногенного происхождения актуально, так как они заставляют активизировать системы адаптации растений к внешним условиям, стимулируя их генетический потенциал. Биологические эффекты вызывают различные по физико-химическим

свойствам наночастицы одного размера, следовательно, причинами этих явлений становятся процессы, связанные с действием определенного регуляторного сигнала в биологических системах [1,2,3]. Изменения структуры клеточных мембран в присутствии наночастиц могут приводить к изменению функционального состояния клетки и сменой механизма действия вещества в различном концентрационном интервале. Определены сравнительные факторы, влияющие на биологическую актив-

Таблица 1. Характеристики наночастиц.

	Cu	Co	Fe
Размер частицы, нм	14–63	10–46	20–54
Отношение максимального размера наночастицы к минимальному	<10	<10	<10
Растворимость в воде мас.%	Нерастворимы	Нерастворимы	Нерастворимы
Растворимость в б/ж. экстракционный буфер мас.%	<1	<1	Нерастворимы
Заряд	+	+	+
Устойчивость к агрегации	Низкая	Низкая	Низкая
Гидрофобность	+	+	+
Адгезия к поверхностям растений	выявлена методом электронно-микроскопического анализа	выявлена методом электронно-микроскопического анализа	выявлена методом электронно-микроскопического анализа

Таблица 2. Характеристики наночастиц размером 10–20нм: растворимость, мас.%

Растворитель	Время	Cu	Fe	Zn	Co
Вода	5 часов	1,5	2,6	2,0	2,3
	24 часа	8,9	12,1	10,7	11,6
Экстракционный буфер, pH 7,8	5 часов	0,8	1,6	0,96	1,4
	24 часа	9,7	12,8	11,8	12,2

ность и механизм действия наночастиц: концентрация, размеры, площадь удельной поверхности, структура наночастиц.

В исследованиях, проводимых нами в течение нескольких лет, наблюдались следующие биологические эффекты: изменение морфофизиологических показателей роста и развития растений, активности ферментов и фитогормонов [4], показателей окислительной модификации белков [5,6], вызываемые различными по площади удельной поверхности и физико-химическими свойствами наночастиц. Эти данные свидетельствуют, что в основе изменения показателей лежит считывание регуляторного сигнала от биологически активных частиц самой живой системой на уровне клетки. Биологический эффект должен быть связан с передачей информации, универсальной для любых биологических объектов, которая с высокой степенью надежности функционирует в системе: это агент (препарат) — клетка и ее структуры. Этим требованиям удовлетворяет мембрана и система надмолекулярных структур микроокружения клетки. Малыми и сверхмалыми дозами считают дозы, эффективность которых нельзя объяснить с помощью традиционных представлений [7,8]. Для наночастиц металлов наблюдается одно из характерных свойств эффекта малых доз (МД)- который связан с колебательным характером зависимости биологических показателей от количества воздействующего компонента. При этом характерным

является существование «мертвой зоны» — интервал в котором изучаемая биологическая активность не проявляется. Это обусловлено, на наш взгляд, волновым характером распространения пространственных перестроек проницаемости мембран и надмолекулярных структур под влиянием энергетического воздействия наночастиц, повышающих концентрацию протонов. При определении данного явления в случае сверхнизких концентраций биологически активных веществ интересной является идея о параметрическом резонансе, которая нашла подтверждение в наших работах. Речь идет о возможном механизме действия наночастиц на клеточном и субклеточном уровнях. В проведенных исследованиях учитывается и роль аллостерического взаимодействия каталитических центров ферментов, то есть поэтапное изменение пространственной организации специализированных надмолекулярных структур клетки и ее цитоплазмы, которые определяют механизм действия наночастиц в биологических процессах.

Условия и методология исследования

Биологическая активность наночастиц зависит от многих факторов, в том числе их размера, способности накапливаться в растениях, биосовместимости. Было изучено влияние наночастиц металлов Cu, Co, Fe, Zn на развитие инновационной агротехнологии.

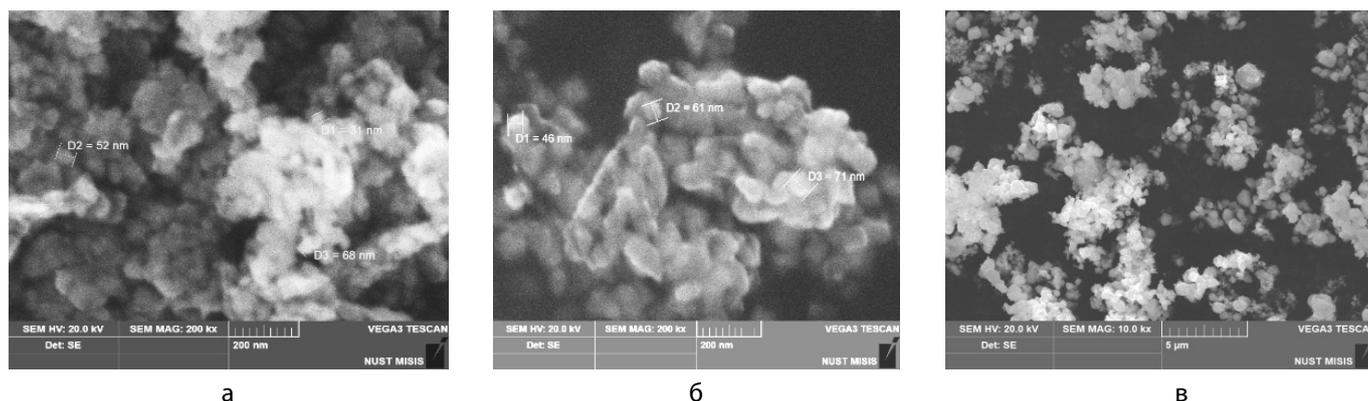


Рис. 1. Наночастицы а) кобальта, б) меди, в) железа

При проведении исследований были определены наиболее важные характеристики наночастиц металлов, влияющие на биосовместимость и, как следствие, биологическую активность наночастиц (таблица 1,2). Физико-химическая активность наночастиц зависит от состава и морфологии частиц, толщины и состава оксидной пленки на поверхности, а также от метода получения [12].

В экспериментах использовались сертифицированные семена горчицы белой, пшеницы, вики одного года урожая, соответствующие 1 классу, не обработанные протравляющими средствами. Исследования проводились по методике, указанной в ГОСТ 12038–84, с использованием термостата с подогревом ТСО-1М с температурным интервалом от 0 °С до 60 °С; допустимые колебания температуры ± 1 °С. Определены морфофизиологические показатели роста и развития семян: энергия прорастания и лабораторное прорастание на 3 сутки; длина и масса надземных и подземных побегов на 7-е сутки согласно [9]. При прорастании семян в качестве субстрата использовали жидкую среду для культивирования на основе полисахарида, полученного из морских водорослей (агар Difco или домашний микробиологический агар). Повтор 4 раза, в каждой чашке Петри — 50 семян.

Нанопорошки получены химическим осаждением гидроксидов металлов из растворов солей с последующим их низкотемпературным восстановлением в потоке водорода с последующей пассивацией. Фазовый состав определяли с помощью рентгенофазового анализа (РФА) по методу порошка на дифрактометре *XRD-7000 (Shimadzu)*. Удельная поверхность полученных НЧ измерялась методом низкотемпературной адсорбции азота по БЭТ, с использованием анализатора «Quantachrome NOVA 1200e».

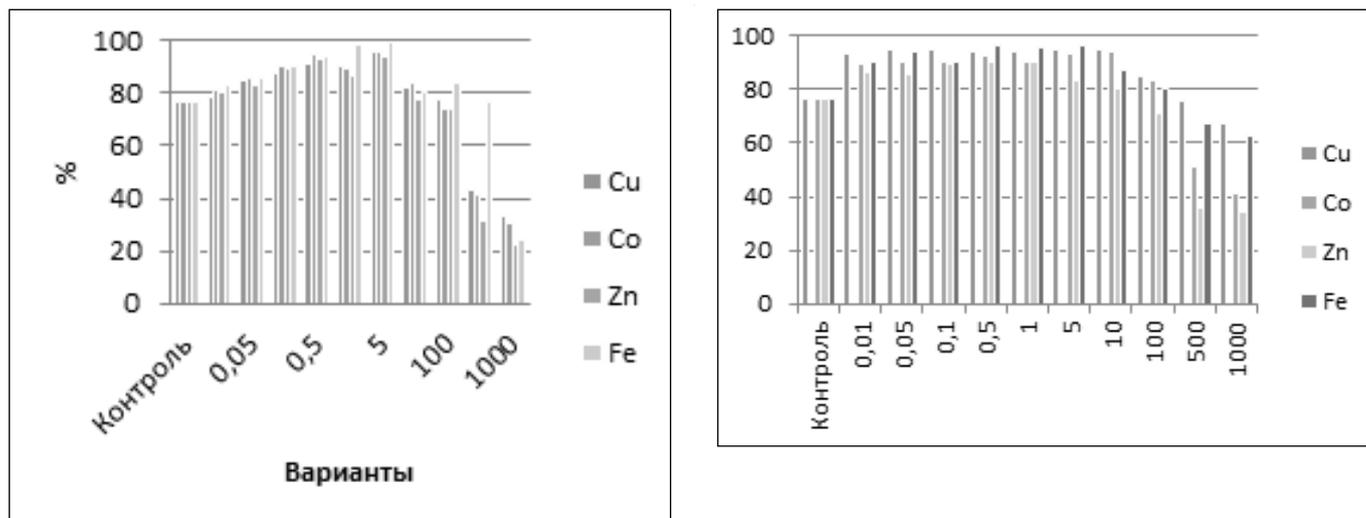
Суспензии наночастиц готовили в дистиллированной воде. Нужное количество наночастиц взвешивали

на аналитических весах (Shinko Denshi, Япония, точность $\pm 0,0001$ г), добавляли в 1 л воды и перемешивали. Затем суспензию диспергировали ультразвуком 10 минут, мощность—300 Вт при частоте—23,7кГц. Полученные суспензии использовали для обработки семян. Дистиллированная вода для контрольных вариантов обрабатывалась так же только без добавления наночастиц.

Результаты исследований

При определении влияния наночастиц металлов Cu, Co, Fe, Zn на рост и развитие растений: вика, горчица, пшеница было доказано, что они проявляют высокую биологическую активность в интервале концентраций 0,01–100 г/т (тонну семян), проявляя одинаковую закономерность. При проведении лабораторных исследований установлено, что для нанопорошков железа, меди, кобальта и цинка полученных химическим способом при размерах частиц 35–60 нм, биологическая активность и эффект «малых доз» проявляется наиболее ярко. Активными концентрациями стали для энергии прорастания 0,5 и 5,0 г/т (тонну семян); для длины корешка —0,1 и 1,0 г/т, массы 3-дневного ростка — 0,05 и 5,0 г/т; массы 7-дневного ростка — 0,1 и 1,0 г/т; для массы корешка — 0,5 г/т. Причем отличались концентрации друг от друга наиболее часто в 10, реже в 100 раз. При концентрации выше 100г/т зависимость доза-эффект перестала проявляться, но все показатели оставались достоверно выше контроля, то есть угнетения не было даже при концентрации 500 г/т (рисунок 1,2,4). Было доказано, что наночастицы стимулируют высокую биологическую активность в интервале концентраций 0,01–100 г/т (тонну семян), проявляют одинаковую закономерность. Величина активности зависит от площади удельной поверхности и размеров.

Наночастицы, имеющие размер частиц до 20 нм, демонстрировали эффект МД только при низких концентрациях: до 10г/т и при концентрации 100г/т все по-



а — размер наночастиц, 35–60нм б- размер наночастиц до 20нм
 Рис. 2. Влияние наночастиц на энергию прорастания семян горчицы

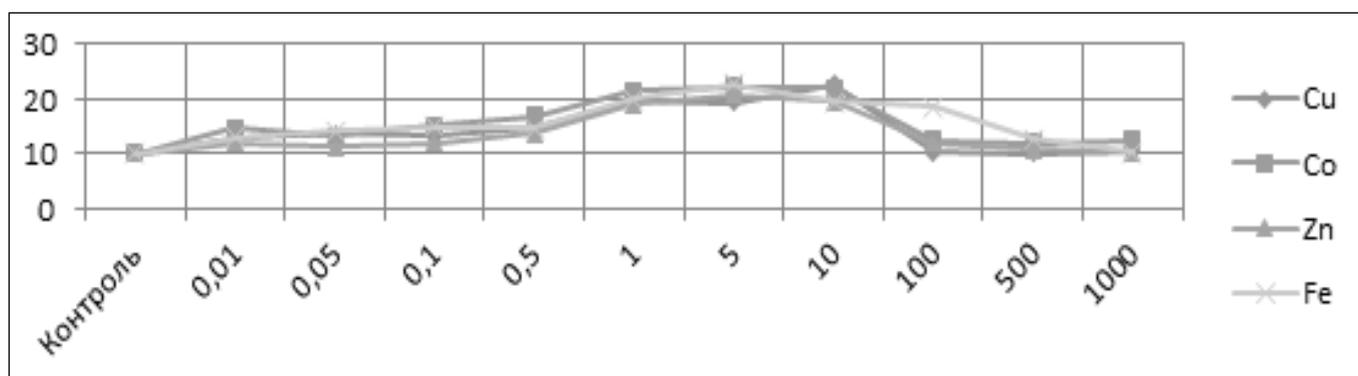


Рис. 3. Длина корней 3-х дневных проростков пшеницы размер наночастиц, 35–60нм

казатели были ниже контроля, наблюдалось угнетение развития растений (рисунок 1,3,4). Наночастицы размером ниже 20 нм опасно применять в биопрепаратах, что связано с их высокой реакционной способностью. Такие нанобъекты проявляют высокую физико-химическую активность и при этом теряют свою индивидуальность.

Для суспензий наночастиц было замечено изменение рН в зависимости от состава и размеров наночастиц. Мы предполагаем прямую зависимость между увеличением количества протонов и энергией, производимой в клетках, которая используется для прорастания семян. Активность ферментов, транспорт субстратов через мембраны, направление ферментативных реакций зависят от величины рН в клетке. Связь ионов водорода и энергии, производимой в клетках и используемой для прорастания, подтверждается последними исследованиями в области ферментов и нашими в рамках данного проекта.

Комплексное исследование влияния различных концентраций и размеров наночастиц на активность трех ферментов-антиоксидантов (супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и пероксидазы) позволило установить: активность пероксидазы при максимальных морфофизиологических показателях высокая и снижается в «мертвых зонах» как при низких, так и высоких концентрациях наночастиц металлов. Активность СОД и каталазы в исследуемых культурах достоверно снижалась в условиях максимальных морфофизиологических показателей и резко возрастала при концентрациях больше 100 г/т для наночастиц размером 35–60 нм, и выше 10 г/т при размере до 20 нм.

Для наночастиц размером 35–60 нм пределом устойчивости служит концентрация наночастиц металлов намного выше 100 г/т, для размеров до 20 нм в интервале 10 г/т.

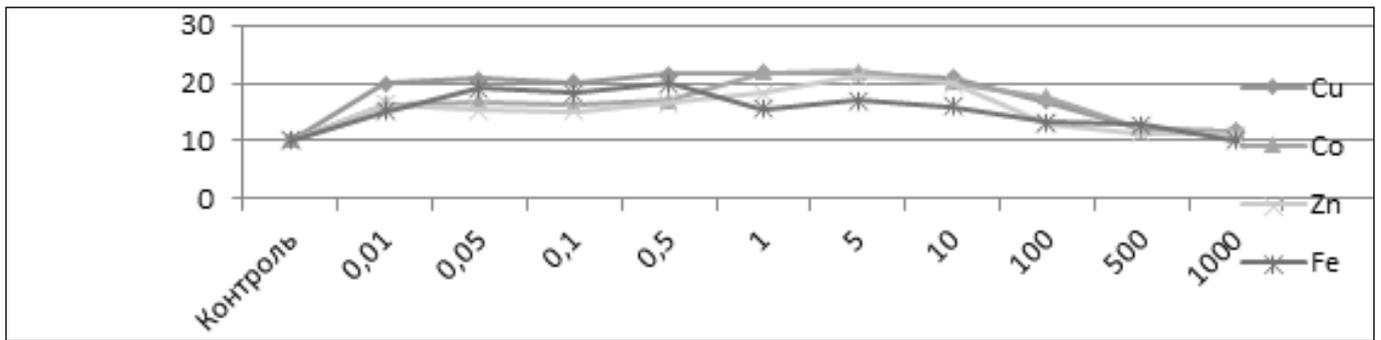
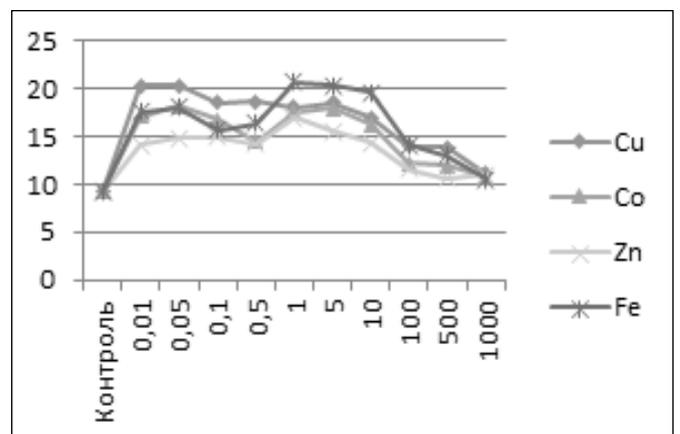
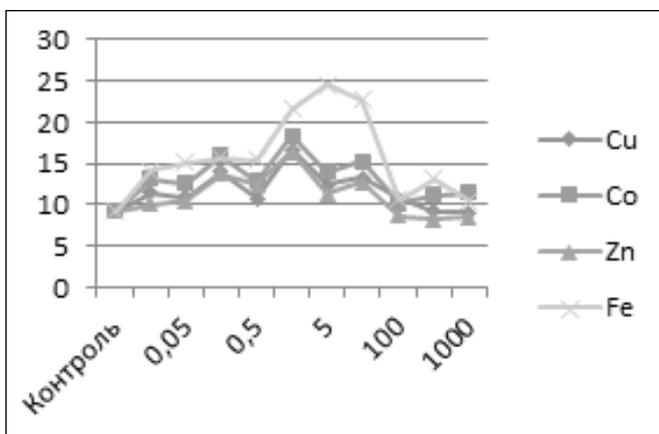


Рис. 4. Длина корней 3-х дневных проростков пшеницы размер наночастиц до 20нм



а — размер наночастиц, 35–60нм б- размер наночастиц до 20нм
Рис. 5. Длина ростков 3-х дневных проростков пшеницы

При развитии растений соотношение фитогормонов в разных структурах организма меняется под влиянием факторов внешней среды, что стимулирует направление и скорость роста растительных организмов, оказывая действие на ферменты, регулирующие активность других гормонов. Поэтому нами было изучено действие наночастиц (НЧ) металлов кобальта, железа, цинка и меди в течении месяца на активность фитогормонов цитокининов (ЦК), гибберелловой (ГК), абсцизовой (АБК), индолилуксусной (ИУК) кислот на рост и развитие горчицы белой.

В интервале концентраций 0,001–10,0 г/т под действием наночастиц металлов содержание ИУК возрастает. Так как с увеличением количества ИУК усиливается содержание в клетках АТФ и коэффициент Р/О, показывающий соотношение фосфорилирования и окисления, следовательно, при этих концентрациях наночастиц возрастает энергетическая эффективность дыхания растений и это приводит к изменениям активности различных ферментативных реакций. При этом возрастает движения питательных веществ и воды, что усиливает рост

и развитие растений, которое мы и наблюдали в наших опытах. Далее значения ИУК уменьшаются, приближаясь к контрольным показателям.

Увеличение содержания гибберелловой, абсцизовой и индолилуксусной кислот сохраняется до концентрации 10 г/т, причем наиболее интенсивно, при увеличении концентрации НЧ размером 30–60 нм. Такие выводы достоверно характерны и для действия наночастиц кобальта, меди, цинка и железа.

Для наночастиц размером до 20 нм в целом наблюдается аналогичная зависимость: доза (концентрация) — эффект (активность фитогормонов), как в случае частиц размером 35–60 нм; при этом более высокая активность ЦК, ГК и ИУК характерна относительно контроля при более низких концентрациях 0,01–1,0 г/т и эти изменения выше, чем для наночастиц размером 35–60 нм. Следует отметить, что количество абсцизовой кислоты практически не изменяется, зависимость доза-эффект для данного гормона отсутствует. Наиболее высокая активность ИУК наблюдается в пределах концентраций наночастиц

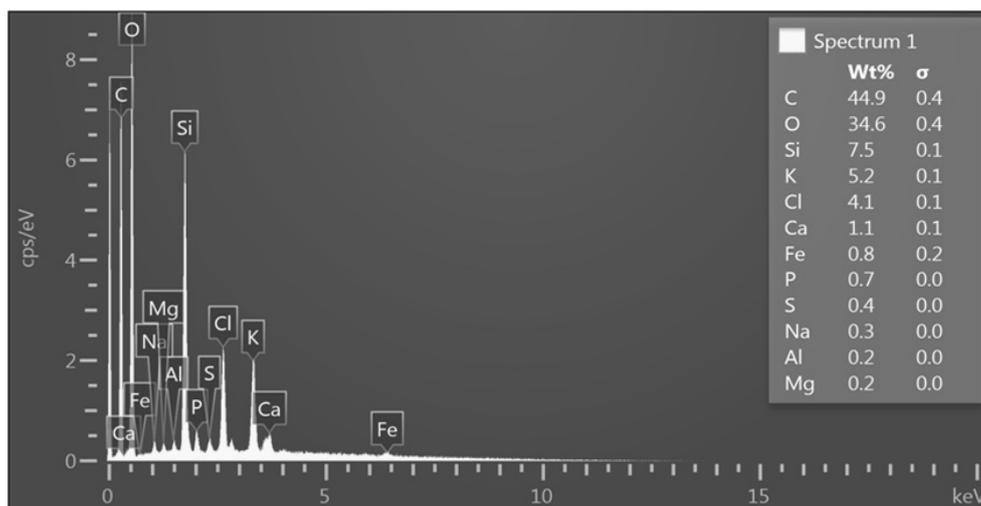


Рис. 6. Элементный состав проростка, выполненный на рентгеновском энергодисперсионном анализаторе.

кобальта размером 35–60 нм 1–10 г/т; для размера до 20 нм активность смещается в сторону меньших концентраций 0,1–1,0 г/т, при этих концентрациях возрастает активность остальных фитогормонов, при уменьшении содержания АБК.

Методика оценки бионакопления наночастиц в проростках с помощью электронной микроскопии

Максимальное разрешение электронной микроскопии достигается в ходе исследования металлов и кристаллических решеток. В случае биологических объектов препятствием для исследования становится их низкая контрастность [10]. Увеличение ускоряющего напряжения приводит к быстрой деградации биообъектов, т.к. макромолекулы, входящие в их состав, достаточно неустойчивы.

Была разработана следующая методика подготовки образцов для электронно-микроскопических исследований. В биологически активную среду были добавлены нанопорошки металлов меди, железа и кобальта. В этой среде в течение 10 дней были пророщены семена пшеницы. В качестве контроля, семена так же проращивали без добавления наночастиц. Проростки отбирали на 5-й и 7-й день и подвергали фиксации для анализа методами электронной микроскопии. Проростки растений промывали в деионизированной воде, после чего образцы замораживали с помощью жидкого азота. Замороженные образцы механически измельчали в ступке, при этом выбор материала ступки и пестика должен быть обусловлен отсутствием дефектов поверхности, что определяет минимальную контаминацию образца.

Для окончательного измельчения образцов использовалась ультразвуковая обработка. Для этого измельченный биологический материал помещается в среду ёмкостью 30 мл, содержащую этанол и диспергировался с помощью ультразвукового гомогенизатора в течение 5 минут при мощности 400 Вт. Полученная суспензия отбирается с помощью стерильного медицинского шприца объёмом 5 мл и наносится на медную сетку с углеродной электропроводящей плёнкой, после чего проводятся электронно-микроскопические исследования стандартными методами.

Электронно-микроскопические исследования и анализ распределения металлов в тканях экспериментальных растений, выполненные на сканирующем электронном микроскопе показали для образцов гомогената проростков, экспонированных наночастицами металлов, размером 3–60 нм, на диаграммах пики, характерные для металлов.

В соотношении содержания остальных элементов отклонений от контрольных значений не зафиксировано (исследования проводились, в том числе в лаборатории электронной микроскопии РЦЗМкп РГРТУ). Накопления их на поверхности клеток надземной и подземной частей обнаружено не было. Дополнительно проведенный элементный анализ не показал достоверного накопления наночастиц в тканях растений по сравнению с контролем, для всех металлов размером 20–60 нм до концентрации 1000г/т. Это важно для малорастворимых наночастиц металлов. Поэтому возможные негативные эффекты могут быть связаны только с индивидуальным воздействием наночастиц, а не с накоплением тяжелых металлов в растениях и почве.

Таблица 3. Влияние гербицида и нанопорошков (НП) на урожайность яровой пшеницы

Без гербицида (контроль), ц/га	Тифенсульфурон с трибенувроном	НП-Сu 0,1 г/т	НП- Со 0,1 г/т
28,6	30,7	38,3	34,1
Сохраненный урожай в среднем,%	14,3	18,0	16,1

Полевые исследования

В ходе полевых испытаний было установлено, что однократная предпосевная обработка семян пшеницы суспензиями наночастиц Fe, Со и Сu не приводит к уменьшению количества сорняков, но увеличивает урожайность и всхожесть первых сеянцев, сводя к минимуму влияние сорняков. Использование наноматериалов способствует формированию мощного и активно работающего листового аппарата, что позволяет увеличить количество накапливаемой энергии. Мы добились лучших условий созревания, плодоношения и качества получаемой продукции, при условии экологической безопасности нанопрепаратов [11].

Более того, если максимальное увеличение урожайности от действия гербицидов было получено во влажные, умеренно жаркие годы, то во всех жестких случаях они оказывались незначительными, тогда как нанопорошки, напротив, демонстрировали максимальное увеличение урожайности в разные периоды. Проведено сравнение с гербицидом, рекомендованным для борьбы с широкополосными сортами пшеницы, это комбинация тифенсульфурон с трибенувроном. Рекомендуемые концентрации 30 г/га.

После сбора массовая доля клейковины превысила контроль в 2016 году для вариантов с наночастицами железа и меди (на 4,02% и 4,43% соответственно); в 2018 г. содержание было выше контрольного во всех экспериментальных вариантах: при использовании наночастиц железа — на 5,61%, наночастиц меди — на 8,24%, наночастиц кобальта — на 4,95%. Пшеница была отнесена ко II группе качества, а под действием наночастиц меди в концентрации 1,0 г / га и кобальта из расчета 0,5 г / га в I группу качества.

Выводы

1. Размер наночастиц оказывает очень большое влияние как на их биологическую активность, так и на проявление эффекта малых доз.

2. В клеточных мембранах диаметр пор от 5 до 25 нм, что определяет возможность прохождения наноразмерных частиц в клетки и достигать уровень плазматической мембраны. Но под действием самих наночастиц могут образовываться новые поры. Поэтому наночастицы размером 20–60 нм являются биологически активными и обладают эффектом “малых доз”.

3. Клеточная мембрана покрыта множеством рецепторов, которые посредством внеклеточного связывания со специфическим лигандом (или наночастицами) передают сигнал в клеточное пространство. Этот сигнал может служить началом запуска многих биохимических реакций и привести к интернализации лиганда (и наночастиц) через эндоцитоз.

4. Биологически активные наночастицы, действуя на уровень фитогормонов, могут влиять на состояние биомембран и опосредованно выступать регулятором белоксинтезирующих клеток растений.

5. Для наночастиц металлов размером до 60 нм аккумуляция не доказана, но проходимость их в клетку имеет место. Следовательно, для НЧ металлов речь идет о биосовместимости, которая может объясняться такими факторами как:

- ◆ высокая адгезия к поверхностям живых систем;
- ◆ положительный заряд;
- ◆ размер,
- ◆ смещение pH суспензий наночастиц в кислую область.

6. Анализ результатов наших исследований предполагает, что положительные НЧ связываются с отрицательно заряженными поверхностными группами митохондриальных мембран, нейтрализуя их, при этом изменяется трансмембранный потенциал — повышается энергия, возрастает активность синтеза ферментов и фитогормонов в частности ИУК. Протоны митохондрий выталкиваются наружу, усиливается протонный насос, который отвечает за вывод протонов и их концентрация возрастает в наружном слое мембраны. Возврат через АТФ-азу приводит к иницированию синтеза АТФ, что стимулирует процессы роста и развития. Это фактор позволяет предположить опосредованное влияние наночастиц на синтез ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чурилов Г. И. Эколого-биологические эффекты нанокристаллических металлов: дис. ... д.б.н. — Балашиха, 2010. — 321 с.
2. Churilov G. I., Polischuk S. D., Kuznetsov Denis., Borychev S. N., Byshov N. V. Churilov D. G. Agro ecological grounding for the application of metal nanopowders in agriculture // *Int. J. Nanotechnol.* — 2018. — Vol. 15. -Nos. 4/5. — PP. 258–279
3. Polischuk S. D., Churilov G. I., Churilov D. G., Borychev S. N., Churilova V. V. Plants nutrition and growth stimulation with the help of nanotechnologies // *International Journal of Engineering and Technology (UAE)*. — 2018. Vol. 7. — № 4.36. -PP. 231–236.
4. Gennady Churilov, Quoc Buu Ngo, Hoai Chau Nguyen. Physiological and Biochemical Effects of Nanocrystalline Metals on maize plant // *Proceeding of 4th International Workshop on Advanced Materials and NanoScience*. — 2013. -Nov 12–14. -PP. 282–285
5. Муравлева Л.Е. [и др.] Окислительная модификация белков: проблемы и перспективы исследования // *Фундаментальные исследования* — 2010. — № 1. — С. 74–78.
6. Губский Ю.И. [и др.]. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях // *Современные проблемы токсикологии*. — 2005. -Т.8. — № 3. — С. 20–27.
7. Абаленихина Ю.В., Фомина М. А., Чурилов Г. И., Ивановичева Ю. Н. Активность катепсинов тимуса крыс под влиянием меди в ультрадисперсной форме // *Научное обозрение*. — 2012. — № 5. — С 76–82
8. Зайцев, С.В., Ефанов, А.М., Сазанов, Л. А. Общие закономерности и возможные механизмы действия биологически активных веществ в сверхмалых дозах // *Рос. хим. ж.* — 1999 — Т. XLIII, № 5 — С. 28–33.
9. Kasemets K., Ivask A., Dubourguier H. C. et al. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Toxicology In Vitro*. 2009. V. 23. I. 6. P. 1116.
10. Полищук С. Д., Голубева Н. И. Изменение лабораторной всхожести семян яровой пшеницы под воздействием обработки их ультрадисперсными материалами // *Вестник Рязанского государственного агротехнологического университета им. П. А. Костычева*. -2010. — № 3 (7). — С. 38–39.
11. Чурилов Д. Г., Горохова М. Н., Бударина Г. И., Полищук С. Д., Бакунин И. В. Особенности роста и развития кукурузы и подсолнечника при обработке семян наночастицами кобальта // *Труды ГОСНИТИ*. — 2011. — Т. 107. — № 2. -С. 46–48.
12. Векилова, Г.В., Иванов А. Н., Ягодкин Ю. Д. // *Дифракционные и микроскопические методы и приборы для анализа наночастицы наноматериалов*. Москва, МИСиС. — 2009. — 145 с.

© Чурилов Геннадий Иванович (genchurilov@yandex.ru), Обидина Инна Вячеславовна (inna.obidina@mail.ru),
Чурилов Дмитрий Геннадьевич (churilov.dmitry@yandex.ru), Полищук Светлана Дмитриевна (svpolishuk@mail.ru).
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»