

И. В. Обидина, Г. И. Чурилов, С. Д. Полищук, А. Ю. Тарара,
С. С. Гомозова, Н. Б. Рыбин, Л. Е. Амплеева

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТИМУЛИРУЮЩЕГО И ТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОПОРОШКОВ МЕДИ И КОБАЛЬТА НА ПРОРОСТКИ РИСА

I. V. Obidina, G. I. Churilov, S. D. Polischuk,
A. Yu. Tarara, S. S. Gomozova, N. B. Rybin, L. E. Ampleeva

STIMULATING AND TOXIC EFFECTS OF COPPER AND COBALT NANOPOWDERS ON RICE SEEDLINGS

Аннотация. Нанопорошки металлов обладают стимулирующим воздействием на рост и развитие растений. Биологическая активность наночастиц зависит от размеров, концентрации, химического состава. Имея широкий диапазон направлений применения в медицине и сельском хозяйстве, они требуют дальнейшего изучения. Наночастицы меди и кобальта обладают биосовместимостью и выполняют роль стимуляторов роста, не обладают токсичностью и могут быть использованы для контакта с живыми системами. Объектом нашего исследования является рис, как экономически важная культура. Мы исследовали воздействие наночастиц кобальта и меди на прорастание и развитие проростков. Определили оптимальную концентрацию ультрадисперсных растворов этих нанопорошков для предпосевной обработки семян. Обладая разной химической природой наночастицы меди и кобальта показывают сходный характер воздействия и дозозависимый эффект. Минимальные концентрации исследуемых наночастиц положительно воздействовали на морфологические и биометрические показатели проростков. Для определения токсического эффекта измеряли активность оксидазных ферментов, которая показала обратимый характер окислительного стресса. Увеличение активности супероксиддисмутазы и уменьшение активности каталазы менее чем на 30% свидетельствует о стрессоустойчивости ростков риса и отсутствии фитотоксического воздействия нанометаллов. Определяли наличие данных металлов в гомогенате проростков. Электронно-микроскопический анализ распределения металлов в тканях экспериментальных растений не выявил существенных отклонений от контрольных значений. Экспериментальные исследования выполнены с использованием научного оборудования РЦЗМкп РГРТУ.

Ключевые слова: ультрадисперсные порошки; наночастицы; биологическая активность; кобальт; медь.

Abstract. Metal nanopowders have a stimulating effect on the growth and development of plants. The biological activity of nanoparticles depends on size, concentration, and chemical composition. Nanoparticles require further study because they have a wide range of applications in medicine and agriculture. Being biocompatible, copper and cobalt can play the role of growth stimulant, are not toxic and can be used for contact with living systems. The object of study was rice, as an economically important culture. The study addressed the effect of cobalt and copper nanoparticles on the germination and development of rice seedlings. The optimal concentration of ultrafine solutions of these nanopowders for pre-sowing treatment of seeds was determined. Although copper and cobalt have different chemical nature, the nanoparticles show similar impact and dose-dependent effect. Minimum concentrations of the nanoparticles had a positive effect on the morphological and biometric indicators of sprouts. The activity of oxidase enzymes was measured and it showed a reversible nature of oxidative stress. An increase in superoxide dismutase activity and a decrease in catalase activity by less than 30% indicates the stress resistance of rice sprouts and the absence of phytotoxic effects of the nanopowders. The presence of these metals in the seedling homogenate was determined to define the toxic effect. The electron microscopic analysis of the partition of metals in the tissues of experimental plants did not reveal significant deviations from control values. The experiments were performed using scientific equipment of Regional Center for Collective Use of Probe Microscopy in Ryazan State Radio Engineering University.

Key words: ultrafine powders; nanoparticles; biological activity; cobalt; copper.

Сведения об авторах: Обидина Инна Вячеславовна, ORCID: 0000-0002-7235-6415, Scopus Author ID: 57215004004, SPIN-код: 8087-7620, Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, г. Рязань, Россия, inna.obidina@mail.ru; Чурилов Геннадий Иванович, ORCID: 0000-0002-4056-9248, Scopus Author ID: 16462685500, SPIN-код: 2096-4817, д-р биол. наук, Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, г. Рязань, Россия, genchurilov@yandex.ru; Полищук Светлана Дмитриевна, ORCID: 0000-0001-8482-7045, Scopus Author ID: 56085894600, SPIN-код: 9988-2972, д-р техн. наук, Рязанский государственный агротехнологический университет им. П.А. Костычева, г. Рязань,

Россия, svpolishuk@mail.ru; Тарапа Алексей Юрьевич, Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, г. Рязань, Россия, Zendekrussia@gmail.com; Гомозова Софья Сергеевна, Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, г. Рязань, Россия, sophya-00@yandex.ru; Рыбин Николай Борисович, ORCID: 0000-0003-2000-0158, ResearcherID: A-6908-2014, Scopus Author ID: 36448662500, SPIN-код: 5980-2083, канд. ф.-м. наук, Региональный центр зондовой микроскопии коллективного пользования Рязанского государственного радиотехнического университета им. В.Ф. Уткина, г. Рязань, Россия, rcpm-rgrtu@yandex.ru; Амплеева Лариса Евгеньевна, ORCID: 0000-0001-5699-0048, Scopus Author ID: 57209319180, SPIN-код: 3267-8206, канд. биол. наук, Рязанский государственный агротехнологический университет им. П.А. Костычева. venelona@gmail.com.

About the authors: Obidina Inna Vyacheslavovna , ORCID: 0000-0002-7235-6415, Scopus Author ID: 57215004004, SPIN-код: 8087-7620, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia, inna.obidina@mail.ru; Churilov Gennady Ivanovich, ORCID: 0000-0002-4056-9248, Scopus Author ID: 16462685500, SPIN-code: 2096-4817, Dr. habil., Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia, genchurilov@yandex.ru; Polischuk Svetlana Dmitrievna, ORCID: 0000-0001-8482-7045, Scopus Author ID: 56085894600, SPIN-code: 9988-2972, Dr. habil., Ryazan State Agrotechnological University named after P.A. Kostychev, Ryazan, Russia, svpolishuk@mail.ru; Tarara Alexey Yuryevich, Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia, Zendekrussia@gmail.com; Gomozova Sofya Sergeevna Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia, sophya-00@yandex.ru; Rybin Nikolai Borisovich, ORCID: 0000-0003-2000-0158, ResearcherID: A-6908-2014, Scopus Author ID: 36448662500, SPIN-code: 5980-2083, Ph.D., Laboratory of Electron Microscopy Chief, Regional Center for Probe Microscopy of collective use, Ryazan State Radio Engineering University named after V.F. Utkin, Ryazan, Russia, rcpm-rgrtu@yandex.ru; Ampleeva Larisa Evgenievna, ORCID: 0000-0001-5699-0048, Scopus Author ID: 57209319180, SPIN-code: 3267-8206, Ph.D., Ryazan State Agrotechnological University named after P.A. Kostychev, Ryazan, Russia, venelona@gmail.com.

Введение

Нанотехнологии получают бурное развитие, и их влияние на развитие экономики, повышение качества жизни – несомненно. Помимо использования ультрадисперсных порошков (УДП) металлов в качестве новых конструкционных материалов и катализаторов, возрос интерес к применению их в сельском хозяйстве, животноводстве, медицине. По утверждению экспертов, основанному на проведенных за несколько лет исследованиях, нанотехнологии обладают огромным потенциалом. Они меняют взгляд на использование стимуляторов роста растений, подавление патогенной микрофлоры растений и животных, процессы заживления и восстановления [1; 8; 9; 12]. Определены основные направления применения нанопорошков в растениеводстве. Предпосевная обработка семян рапса, вики, свеклы, пшеницы, огурцов, кукурузы, хлопчатника, картофеля, диспергированной суспензией УДП железа повышает урожайность этих культур по сравнению с контрольными образцами. Определение состава питательных веществ в растениях, выращенных из обработанных семян, показывает качественные изменения, в частности, улучшение аминокислотного состава [10].

Многолетние исследования подтверждают высокую биологическую и физиологическую активность нанопорошков [6]. Частицы металлов в ультрадисперсном состоянии способны проникать через клеточные мембраны, принимать участие в окислительно-восстановительных реакциях, изменять содержание микроэлементов [5]. Металлы в ультрадисперсном состоянии пролонгированно воздействуют на минеральное питание, углеводный и азотный обмен, синтез аминокислот, реакции фотосинтеза и дыхания [4].

До недавнего времени интенсивная агрономия предполагала внесение в почву минеральных солей в качестве удобрений. Образующиеся в результате этого в почве анионы солей оказывают негативное воздействие на почвенный состав вследствие их увеличения в составе растений, что в конечном итоге неблагоприятно для потребителей. В этом случае использование УДП для микроэлементного воздействия на растения исключает отрицательное влияние различных анионов. Кроме того, токсичность солей оказалась в 4–10 раз выше токсичности чистых металлов [8].

Научные достижения позволяют детально изучить воздействие наночастиц на качество сельхозпродукции, воды и в целом на среду обитания и здоровье человека. Это связано с малой величиной частиц ультрадисперсных металлов, их способностью проникать в ткани и клетки и вступать в химические взаимодействия. В связи с увеличением коммерческих продуктов при производстве которых используются наноструктурные материалы, оценка токсичности наноматери-

лов должна получать больше внимания, чем когда-либо прежде, встает вопрос поиска способа обнаружения наноразмерных систем, особенно широко используемых в промышленности.

Целью наших исследований является изучение влияния нанокристаллических порошков меди и кобальта на морфофизиологические и биометрические показатели проростков риса, а также изучение их токсического воздействия на исследуемое растение.

Материалы и методы исследования

Биологическая активность нанопорошков металлов зависит от различных факторов: способа их получения, размера частиц, концентрации раствора. Используемые в нашей работе нанопорошки кобальта и меди получены методом химического осаждения гидроксидов металлов с последующим низкотемпературным восстановлением их в токе водорода. Средний размер частиц составил 30–50 нм.

Катионы, образуемые железом, кобальтом, медью, входят в состав карбоксилазы, полипептидазы, аминопептидазы и других биологически активных веществ, необходимых для дыхания клетки, синтеза белков и обмена веществ в целом [11].

Кобальт. Содержание кобальта в земной коре невысокое, около 18 мг/кг. В природных средах он находится в виде растворимых солей, содержащих Co^{2+} и Co^{3+} , может также образовывать комплексный анион $\text{Co}(\text{OH})^{3-}$. С увеличением значения рН среды взаимодействие кобальта с минеральными и органическими компонентами почвы усиливается, а доступность микроэлемента для растений снижается.

В тканях растений находится в ионной и комплексной форме. Основная функция кобальта связана с его участием в фиксации атмосферного азота. Входит в состав коэнзима кобаламина (витамин B_{12}), метионинсинтетазы (синтез метионина, синтез белка), рибонуклеотидредуктазы (катализатор восстановления рибонуклеотидов до дезоксирибонуклеотидов, синтез ДНК и деление клеток), метил-коэнзим А-мутаза (синтез гема), которые необходимы для симбиотических микроорганизмов, усваивающих азот.

Кобальт способствует репродукции листьев растений, влияет на увеличение мезофилла, столбчатой и губчатой ткани. Благодаря переменной валентности кобальт участвует в окислительно-восстановительных реакциях, регулирует цикл Кребса, дыхание, энергетический обмен, биосинтез белка и полинуклеотидов. Стимуляция роста растений объясняется участием кобальта в регуляции баланса фитогормонов: ауксина и этилена.

Отмечено влияние кобальта на интенсивность фотосинтеза, а также увеличение содержания аскорбиновой кислоты в растениях. Недостаток кобальта может вызвать нарушения азотистого обмена, уменьшение в листьях количества хлорофилла, каротиноидов, витамина Е. Для риса кобальт наиболее важен на стадии кущения и выметывания метелок.

Медь. Медь выполняет роль катализатора в ферментативных процессах или входит в состав медьсодержащих ферментов: регулирует углеводный белковый обмен, катализирует окисление аскорбиновой кислоты, увеличивает процесс фотосинтеза, дыхания, препятствует разрушению хлорофилла в клетках. Медь участвует в регуляции гормонального баланса, входит в состав множества оксидаз, пластоцианинов, церулоплазмينا и регулирует большинство окислительно-восстановительных процессов. Она повышает устойчивость растений к полеганию, засухе, морозо- и жаростойкость [7]. Недостаток меди при выращивании риса вызывает бледность листьев, неполноценный выход метелки из влагалища, что резко снижает урожайность.

В качестве объекта исследований был выбран представитель злаковых – рис. Эта культура занимает одно из первых мест по потреблению населением, выращивается в южных областях и играет ведущую экономическую роль. Заинтересованность в изучении влияния нанопорошков на выращивание данной культуры выражают и наши вьетнамские партнеры. Рис имеет большую потребность во влаге, особенно на стадии прорастания. Эта культура широко распространена, ее возделывают и используют с древних времен. Семена риса сбалансированы по аминокислотному составу, отличаются прекрасными вкусовыми качествами и имеют высокую усвояемость. Крахмал, полученный из рисового зерна, является сырьем в текстильной, медицинской и парфюмерной индустрии. В сельском хозяйстве на корм животным используют рисовую солому. Не менее ценно использование ее для изготовления бумаги, картона, веревок, мешков, корзин и других подобных изделий. Урожайность риса, в зависимости от сорта и области выращивания, составляет 69–80 ц/га.

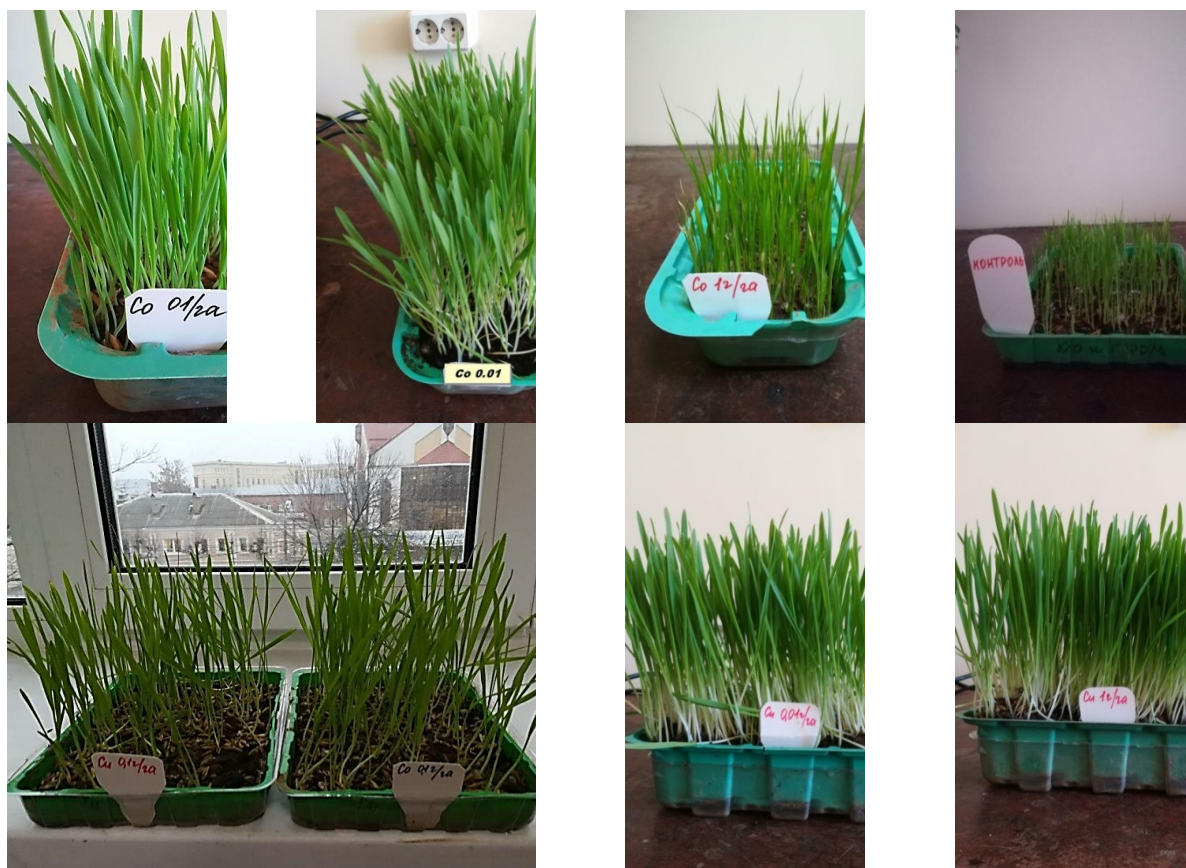


Рис. 1. Проростки риса

Результаты и их обсуждение

Для определения влияния нанопорошков меди и кобальта на всхожесть, прорастание и развитие проростков риса использовали водные суспензии кобальта и меди. Суспензии объемом по 500 мл готовили из расчета каждого УДП на га посевной площади: 1 г/га, 0,1 г/га, 0,01 г/га. Диспергирование нанопорошков металлов готовили в ультразвуковой ванне (Град 13-35). Растворы УДП обрабатывали ультразвуком при максимальной мощности в течение 15 мин.

При проведении эксперимента брали партии по 1000 семян риса сорта Длиннозерный. Каждая партия семян выдержана в растворе соответствующей концентрации в течение 15 мин и помещена в грунт, состоящий из смеси почвы и глины в пропорции 1:3. В лотки с грунтом равномерно на расстоянии 1 см распределили обработанные семена, слегка заглубляя. Затем в лотки добавили отстоянной воды до уровня 1–3 мм над грунтом. Лотки с обработанными и контрольными семенами поместили в термостат с температурой 30⁰С. Через 3 дня в каждой партии было подсчитано количество проростков и определена всхожесть и энергия прорастания. С 4-го дня лотки находились в лабораторных условиях на открытой поверхности при температуре 25⁰С и естественном освещении. Через 10 дней проростки были извлечены из почвы, промыты водой, просушены и взвешены. В каждой исследуемой партии определено количество растений с наибольшими и наименьшими показателями, измерены массы надземной и подземной частей, длины зеленой и корневой части проростков (табл. 1, 2).

Из приведенных данных следует, что воздействие нанокристаллического кобальта наиболее благоприятно при минимальной концентрации. Под действием УДП меди лучшая всхожесть и энергия прорастания выявлена при максимальной концентрации, а наибольшая длина наземной и подземной частей проростков – при минимальной.

Таблица 1

Зависимость биометрических и морфофизиологических показателей ростков риса от воздействия наночастиц

Варианты	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %	10-дневные проростки			
			Длина проростка, мм	Длина корней, мм	Масса надземного ростка, г	Масса подземного ростка, г
контроль	72,0±0,1	76,1±0,2	86±0,4	100±0,3	0,22±0,004	0,04±0,0041
Cu 1 г/га	83,8±0,2	85,2±0,1	158±0,6	101±0,4	0,29±0,004	0,09±0,004
Cu 0,1 г/га	73,5±0,3	74,0±0,4	100±0,7	80±0,7	0,19±0,009	0,06±0,005
Cu 0,01 г/га	76,5±0,3	75,5±0,1	154±0,4	133±0,6	0,28±0,007	0,09±0,006
Co 1 г/га	63,1±0,2	70,5±0,2	101±0,8	95±0,2	0,25±0,009	0,08±0,007
Co 0,1 г/га	76,1±0,1	76,5±0,3	160±0,3	123±0,3	0,29±0,009	0,08±0,009
Co 0,01 г/га	97,5±0,3	98,5±0,2	120±0,6	127±0,5	0,27±0,002	0,09±0,002

Таблица 2

Соотношение минимальных и максимальных показателей ростков риса при взаимодействии с НП металлов

Варианты	Процент растений с длиной ниже средней	Мин. длина проростка, мм	Мин. длина корня, мм	Процент растений с длиной выше средней	Макс. длина проростка, мм	Макс. длина корня, см
контроль	20	65±0,72	100±0,74	30	100±0,46	100±0,44
Cu 1 г/га	10	65±0,21	95±0,60	15	220±0,50	100±0,31
Cu 0,1 г/га	15	40±0,52	60±0,37	15	160±0,56	100±0,56
Cu 0,01 г/га	10	51±0,65	32±0,25	25	200±0,69	170±0,39
Co 1 г/га	15	55±0,48	90±0,85	25	130±0,48	150±0,28
Co 0,1 г/га	5	40±0,31	50±0,33	15	200±0,73	110±0,19
Co 0,01 г/га	10	40±0,09	30±0,20	20	160±0,19	170±0,22

Наибольший процент растений с максимальными длинами ростка и корня, а также фактическая длина наземной и подземной частей зафиксированы при минимальных концентрациях порошков меди и кобальта.

Очевидно, что металлы в наноразмерном состоянии, благодаря малому размеру частиц и способности к диффузии, способны на стадии прорастания семян проникать во внутриклеточные структуры корней и ростков. Увеличение энергии прорастания, всхожести, силы роста и других показателей отражает уровень обменных процессов, протекающих в семенах и проростках. Эффективность предпосевной обработки семян ультрадисперсными порошками металлов определяется на основании регистрируемых закономерностей в ответных реакциях при прорастании и развитии проростков.

Металлы в ультрадисперсном состоянии обладают принципиально иными свойствами в сравнении с металлами в их обычном виде. Помимо изменения оптических, электрических, магнитных свойств, параметров решетки наночастицы обладают развитой удельной поверхностью. Они активно вступают в химические взаимодействия с белковыми молекулами, образуют комплексы с органическими соединениями, требующими изучения их свойств и прогнозирования возможного токсического эффекта [2].

Механизм токсического действия наночастиц заключается в развитии комплекса реакций оксидативного стресса, вызванного их проникновением внутрь клетки [5]. Следствием является некроз и апоптоз отдельных клеток, угнетение физиологического статуса в целом. Экспресс-диагностика фитотоксичности наноматериалов основана на доступных методиках оценки биохимических и морфофизиологических показателей и не требует дорогостоящего молекулярно-клеточного анализа [14].

Именно биохимический статус растения является критерием его адаптивной устойчивости. Многокомпонентная антиоксидантная защита, существующая в клетках растений, поддерживает динамическое равновесие между образованием активных форм кислорода (АФК) и их ликвидацией. Наиболее важными высокомолекулярными компонентами клеток растений, непосредственно

обезвреживающими АФК, являются ферменты [13]. Оксидоредуктазы, в частности пероксидаза, играют ключевую роль в поддержании молекул в восстановленном состоянии, что является одним из основных условий для нормального существования живых организмов. В связи с этим современные авторы предлагают использовать измерение активности ферментов, как диагностический признак оценки устойчивости растений к действию стрессовых факторов.

Для определения активности ферментов проростки каждой партии разделены на три части для получения экстрактов. Навеску растительных образцов массой 800 мг охлаждают и растирают фарфоровым пестиком в ступке с добавлением в 0,5 мл охлажденного экстракционного буфера. Гомогенат помещают в центрифужную коническую пробирку и центрифугируют в течение 30 мин при 15000 g. Пробы помещают в холодильник. Материалом для исследования является супернатант (надосадочная жидкость) полученная из гомогената растительной ткани. Супернатант каждой партии делится на четыре части для проведения измерений по каждому ферменту, каждой концентрации с целью получения статистически достоверных данных.

Определение активности супероксиддисмутазы в растительных тканях. Принцип метода: в результате аутоокисления кверцетина в присутствии ТЕМЕД (тетраметилендиамин) в аэробных условиях происходит гиперация супероксидного анион-радикала, который в присутствии СОД подвергается дисмутации. Это проявляется в торможении реакции окисления кверцетина.

Реактивы: ЭДТА 0,5 мм раствор, ТЕМЕД 0,05М раствор, бикарбонатный буфер рН 10, кверцетин (97%) 0,5М раствор.

	холостая проба	контроль	опыт
раствор №1	0,5 мл	0,5 мл	0,5 мл
Буфер рН 10,0	0,5 мл	0,5 мл	0,5 мл
Дистиллированная H ₂ O	2,0 мл	1,9 мл	1,8 мл
Биологический материал	–	–	0,1 мл
Кверцетин 0,5 М раствор	–	0,1 мл	0,1 мл

Исследования проводились на фотометре при $\lambda = 406$ нм. Замеры осуществляли через 10 мин.

Таблица 3

Активность супероксиддисмутазы (в усл. ед. акт./г сырой ткани) в корнях и ростках риса под воздействием нанопорошков кобальта (Co) и меди (Cu)

Варианты	Корни		Ростки	
	абс. знач.	% к контр.	абс. знач.	% к контр.
контроль	1,46875	–	1,925926	–
Cu 1 г/га	1,633333	+ 11,21	2,038462	+ 5,84
Cu 0,1 г/га	1,548387	+ 5,42	2,16	+ 12,15
Cu 0,01 г/га	1,507937	+ 2,67	1,987897	+ 3,22
Co 1 г/га	1,540193	+ 4,86	2,211382	+ 14,82
Co 0,1 г/га	1,633333	+ 11,22	2,02682	+ 5,24
Co 0,01 г/га	1,548387	+ 5,42	1,981132	+ 2,87

Супероксиддисмутаза первой выступает в процессе защиты от окислительных повреждений, обрывая окисление клеточных макромолекул еще на стадии иницирования. Неблагоприятные факторы повышают образование активных форм кислорода, в том числе и радикалов супероксида. Наименьшее приращение СОД к контролю наблюдается при минимальной концентрации наночастиц меди и крайних (наибольшей и наименьшей) концентрациях кобальта (табл. 3). Активность супероксиддисмутазы зависит от стадии развития и физиологического статуса растения, напряженности стрессового фактора. Действие супероксиддисмутазы вызывает образование в клетке пероксида водорода, который в свою очередь угнетает работу фермента и, как следствие, ее эффективность зависит от деятельности других компонентов системы защиты, способных удалять пероксид водорода.

Определение активности пероксидазы в растительных тканях. Принцип метода основан на измерении оптической плотности продуктов реакции, образовавшихся при окислении гваякола за определенный промежуток времени (продукт окисления тетрагваякол).

Реактивы: 0,15М ортофосфатный буфер pH 5,4, 0,15% раствор перекиси водорода, раствор гваякола (0,05% гваякол в 70⁰С этаноле 12,5 мг в 25 мл).

	контроль	исследуемая проба
Буфер pH 6,7	1,5 мл	1,5 мл
Биологический материал	0,5 мл	0,5 мл
Дистиллированная H ₂ O	0,5 мл	-
0,05% спиртовой раствор гваякола	0,5 мл	0,5 мл

Исследования проводились на фотометре при $\lambda = 470$ нм. Перед началом измерений в каждую пробирку добавляли 0,5 мл перекиси водорода. Замеры осуществляли через 5 минут.

Активность каталазы (табл. 5) под действием нанопорошков кобальта и меди уменьшается в корнях и ростках проростков риса, однако характер изменений в данных частях отличается. В ростках активность каталазы, оставаясь ниже контроля, с повышением концентрации нанопорошка кобальта до 1 г/га возрастает и становится выше контроля. От общей закономерности отклоняется показатель активности пероксидазы (табл. 4). С увеличением концентрации кобальта в ростках активность уменьшается, а в корнях возрастает.

Таблица 4

Активность пероксидазы (в ед. опт.пл/г сырой ткани • сек) в корнях и ростках риса под воздействием нанопорошков кобальта (Co) и меди (Cu)

Варианты	Корни		Ростки	
	абс. знач.	% к контр.	абс. знач.	% к контр.
контроль	0,004615	–	0,010038	–
Cu 1 г/га	0,005063	+ 9,70	0,011139	+ 10,97
Cu 0,1 г/га	0,0048	+ 4,00	0,012038	+ 19,93
Cu 0,01 г/га	0,004835	+ 4,75	0,010175	+ 1,36
Co 1 г/га	0,0055	+ 19,17	0,010884	+ 24,53
Co 0,1 г/га	0,005031	+ 9,01	0,011	+ 9,59
Co 0,01 г/га	0,0045	– 2,50	0,0125	+ 8,44

Определение активности каталазы в растительных тканях. Принцип метода основан на определении скорости разложения перекиси водорода каталазой исследуемого образца с образованием воды и кислорода.

Реактивы: фосфатный буфер pH 7,8; 10 мм/л раствор перекиси водорода.

	контроль	исследуемая проба
фосфатный буфер pH, 8,7	2,5 мл	2,6 мл
Биологический материал	-	0,02 мл
дистиллированная H ₂ O	0,1мл	–
Перекись водорода	0,4 мл	0,4 мл

Исследования проводились на спектрофотометре при $\lambda = 230$ нм. Перекись водорода вносились перед началом измерений. Замеры осуществляли через 30 сек в течение 5 мин.

Таблица 5

Активность каталазы (в усл. ед. акт./г сырой ткани) в корнях и ростках риса под воздействием нанопорошков кобальта (Co) и меди (Cu)

Варианты	Корни		Ростки	
	абс. знач.	% к контр.	абс. знач.	% к контр.
контроль	0,004431818	–	0,048068182	–
Cu 1 г/га	0,004090909	– 7,62	0,047727273	– 0,71
Cu 0,1 г/га	0,005113636	– 15,38	0,046590909	– 3,07
Cu 0,01 г/га	0,003522727	– 20,51	0,043181818	– 10,17
Co 1 г/га	0,004204545	– 5,13	0,051136364	+ 6,38
Co 0,1 г/га	0,003409091	– 23,08	0,038977273	– 18,91
Co 0,01 г/га	0,00375	– 15,38	0,038409091	– 20,09

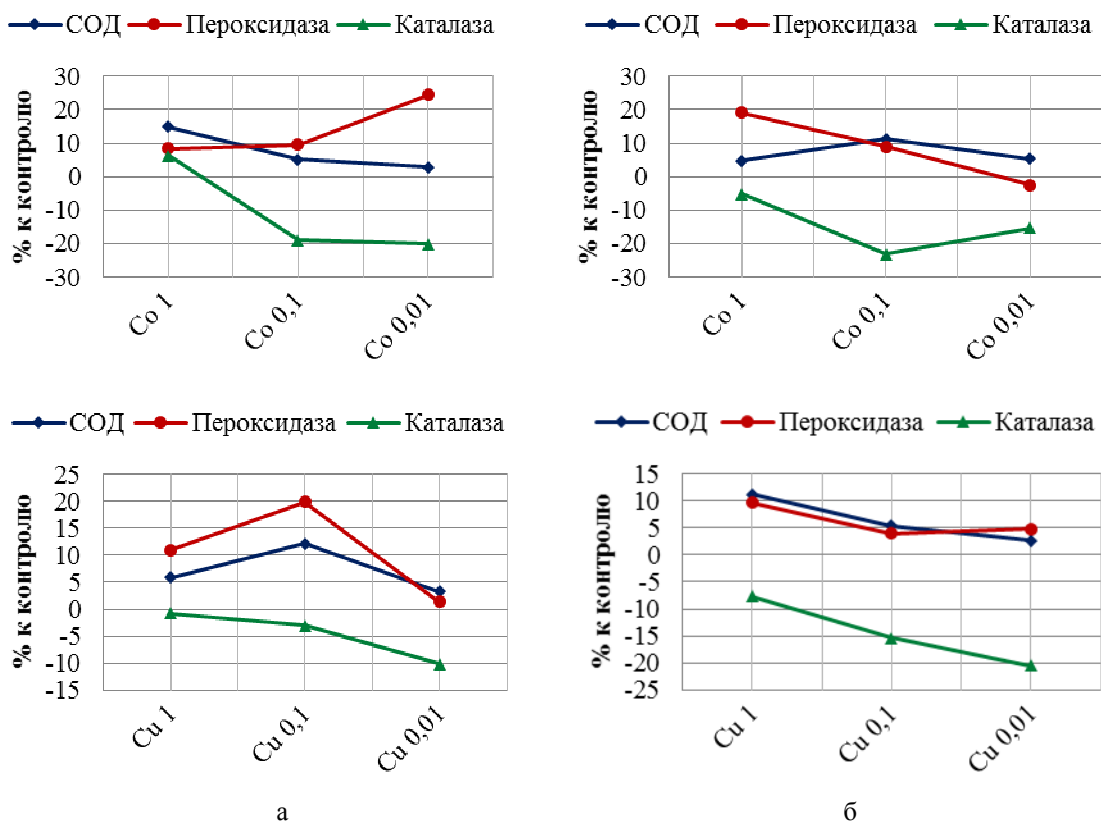


Рис. 2. Активность ферментов: супероксиддисмутазы, пероксидазы, каталазы (в усл. ед. акт /г сырой ткани) в ростках риса под воздействием нанопорошков кобальта (Co) и меди (Cu) а) в ростках, б) в корнях

Стрессоустойчивость растительного организма может определяться по работе оксидазной системы клетки: активности пероксидазы и каталазы, которая свидетельствует о жизнеспособности растений. Данные ферменты конкурируют за субстрат – перекись водорода – и взаимозависимы. Повышение активности пероксидазы угнетает активность каталазы. Но данные ферменты имеют различное сродство к субстрату, и при низком содержании пероксида катализатором выступает пероксидаза, а при повышении концентрации катализирует процессы каталаза.

На данный момент критерием токсикологической оценки фитотоксичности любых наноматериалов является отклонение показателей на 30% и более. Нанопорошки кобальта и меди, применяемые в нашей работе для обработки семян риса, повысили активность пероксидазы и снизили активность каталазы, но данные изменения не выходили за установленные показатели (рис. 2). Максимальное уменьшение активности наблюдалось у каталазы под воздействием кобальта в концентрации 0,1 г/га и составляло 23%.

Микроэлементный состав растений, выращенных из семян, прошедших предпосевную обработку нанопорошками кобальта и меди, определяли с помощью рентгеновского энергодисперсионного анализатора IncaX-Max20 (OxfordInsr., USA) в составе растрового электронного микроскопа JSM6610LV (Jeol, Japan) со следующими характеристиками: ускоряющее напряжение – 15 кВ, низковакуумный режим, давление в рабочей камере – 30 Па, исследуемый сигнал – характеристическое рентгеновское излучение, рабочее (фокусное) расстояние – 10 мм, размер пятна – 60 отн. ед. (рис. 3). Измерения выполнены в лаборатории аналитических исследований Регионального Центра Зондовой Микроскопии коллективного пользования при Рязанском государственном радиотехническом университете.

Данное исследование показало изменение концентраций важных макро- и микроэлементов в исследуемых образцах (табл. 6, рис. 4, 5), которое непосредственно повлияло на увеличение биометрических показателей растений, обработанных УДП металлов.

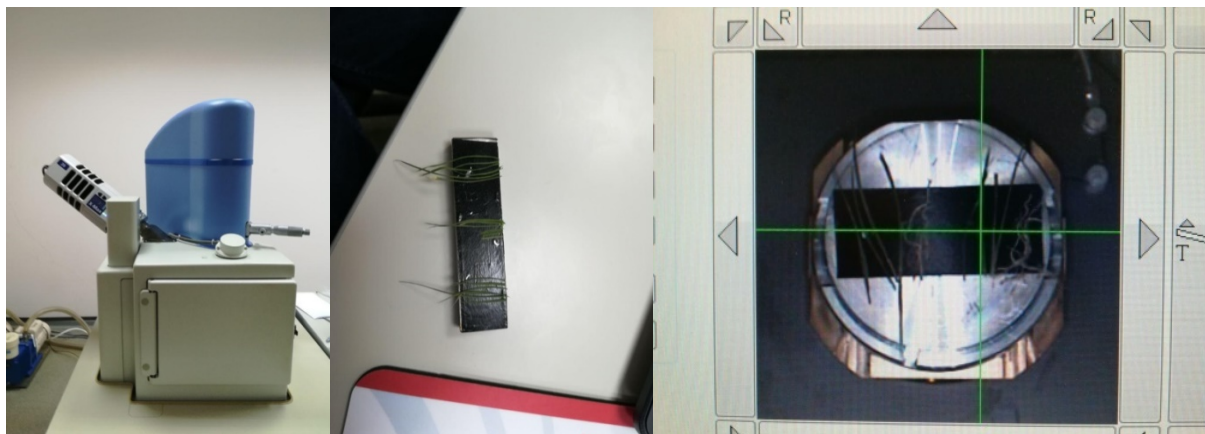


Рис. 3. Растровый электронный микроскоп (РЭМ) с энергодисперсионным анализатором и атомно-силовым микроскопом (АСМ)

Таблица 6

Элементный состав ростков риса, выращенных в условиях эксперимента

элемент	% содержания элемента в различных частях проростков риса					
	корень, контроль	стебель, контроль	корень, обработан 0,1 г УДП кобальта	стебель, обработан 0,1 г УДП кобальта	корень, обработан 0,1 г УДП меди	стебель, обработан 0,1 г УДП меди
Si	2,4	6,9	1,5	8,9	1,7	4,5
K	0,8	3,3	1,2	2,6	4,5	4,0
P	0,1	0,5	0,1	0,7	0,1	0,4
Fe	0,7	0,1	0,5	0,3	0,5	0,3
Mg	0,4	0,1	0,9	0,3	0,6	0,2
Na	0,3	0,1	0,6	0,5	0,6	0,2

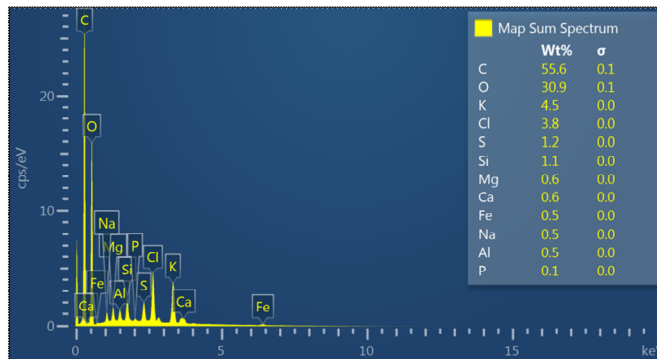
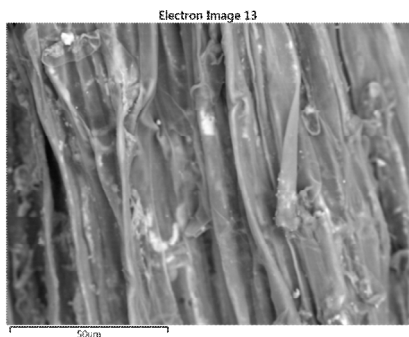


Рис. 4. Корень риса

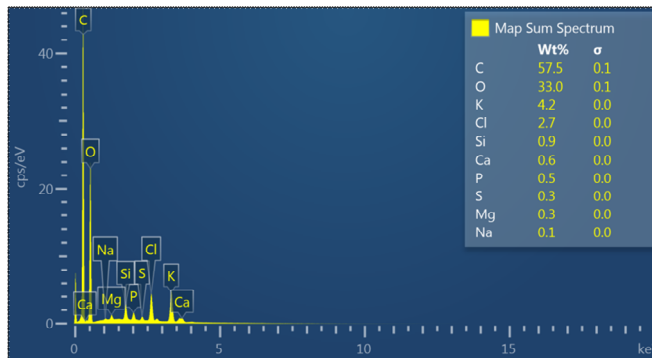
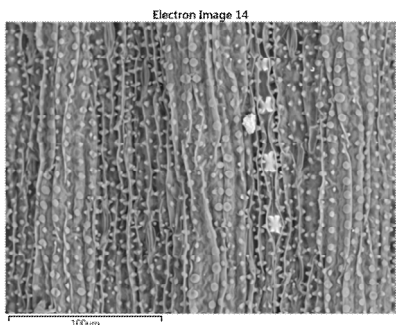


Рис. 5. Стебель риса

Нанопорошки кобальта и меди способствовали увеличению в корнях проростков магния и натрия, тем самым активизируя процессы фотосинтеза и увеличения синтеза углеводов. Превышение над контролем содержания калия и фосфора улучшает транспортную функцию, дыхание и создание энергетического резерва клетки.

Выводы

Минимальные концентрации, 0,1–0,01 г/га, ультрадисперсных меди и кобальта привели к увеличению всех морфометрических показателей, положительно влияли как на всхожесть, так и на развитие проростков. С повышением активности пероксидазы – активность каталазы снижалась. Совокупность этих изменений определяет стрессоустойчивость и жизнеспособность растений. В целом, изменение активности СОД, пероксидазы и каталазы в ростках и корнях проростков риса под действием нанопорошков исследуемых металлов в концентрациях 0,1 г/га и 0,01 г/га не вызывает стресса и не является токсичным.

Синергизм кобальта и меди проявляется в увеличении в корнях и ростках исследуемых растений жизненно важных микро- и макроэлементов. Элементный анализ образца гомогената проростков растений группы, экспонированной наночастицами Со и Си размерами 30–50 нм практически не определяет в тканях накопление данных элементов (рис. 4, 5).

Биотестирование наночастиц на растительных объектах позволяет, используя экономичные методы исследований, за короткие сроки получить результаты «положительного» воздействия ультрадисперсных суспензий металлов. Чувствительность растений к внешним воздействиям превышает таковую у животных объектов, поэтому на растительных объектах с высокой степенью достоверности можно изучать специфичность воздействия УДП, дозозависимость и экотоксичность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богословская О. А., Сизова Е. А., Полякова В. С., Мирошников С. А., Лейпунский И. О., Ольховская И. П., Глущенко Н. Н. Изучение безопасности введения наночастиц меди с различными физико-химическими характеристиками в организм животных // Вестник Оренбургского государственного университета. 2009. № 2. С. 124–127.
2. Гусев А. А., Акимова А. О. Влияние высокодисперсных частиц различной природы на ранние стадии онтогенеза растений рапса (*Brassica napus*) // Интернет-журнал Науковедение. 2013. № 5. С. 11.
3. Давронов К. С., Усмонов Р. М., Кучкаров К. К. Рост и развитие растений хлопчатника под влиянием ультрадисперсных порошков железа и меди // Сельскохозяйственная биология. 2006. Т. 41. № 3. С. 58–61.
4. Зотова Е.С. Исследование строения и свойств ультрадисперсных (нано-) порошков на основе меди, магния и железа, обладающих биологической активностью: автореф. дис. ... канд. техн. наук. М., 2008. 23 с.
5. Короткова А. М., Лебедев С. В., Каюмов Ф. Г., Сизова Е. А. Морфологические изменения у пшеницы (*Triticum vulgare* L.) под влиянием наночастиц металлов (Fe, Cu, Ni) и их оксидов (Fe₃O₄, CuO, NiO) // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52. № 1. С. 172–182.
6. Куцкир М. В. Определение экологической безопасности наноматериалов на основе морфологических и биохимических показателей сельскохозяйственных культур: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Рязань, 2014. 23 с.
7. Максименко Е. П., Шеуджен А. Х. Научные основы применения комплексных микроудобрений в рисоводстве // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2015. № 107. С. 1102–1125.
8. Маслород С. Н., Миргород Ю. А., Бородин В. Г., Борщ Н. А. Влияние водных дисперсных систем с наночастицами серебра и меди на прорастание семян // Электронная обработка материалов. 2014. № 4. С. 103–112.
9. Паничкин Л. А., Райкова А. П. Использование нанопорошков металлов для предпосевной обработки семян с.-х. культур // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2009. № 1. С. 59–65.
10. Чурилов Г.И., Амплеева Л.Е. Биологическое действие наноразмерных металлов на различные группы растений. Рязань: РГАУ. 2010.
11. Чурилов Г. И., Амплеева Л. Е., Назарова А. А., Полищук С. Д. Влияние кобальта на физиологическое состояние и морфобиохимические показатели крови животных // Российский медико-биологический вестник им. академика ИП Павлова. 2007. Т. 15. № 4. С. 34–42.
12. Bellantone M., Williams H. D., Hench L. L. Broad-spectrum bactericidal activity of Ag₂O-doped bioactive glass // Antimicrobial agents and chemotherapy. 2002. V. 46. № 6. P. 1940–1945. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.6.1940-1945.2002>

13. Kuk Y. I. et al. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants // *Crop Science*. 2003. V. 43. № 6. P. 2109–2117. <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.2109>

14. Song H. M., Ye P. D., Ivanisevic A. Elastomeric nanoparticle composites covalently bound to Al₂O₃/GaAs surfaces // *Langmuir*. 2007. V. 23. № 18. P. 9472–9480. <https://doi.org/10.1021/la700979r>

REFERENCES:

1. Bogoslovskaya, O. A., Sizova, E. A., Polyakova, V. S., Miroshnikova, S. A., Leipunsky, I. O., Olkhovskaya, I. P., & Glushchenko, N. N. (2009). Studying of safety of copper nanoparticles introduction with different physical-chemical characteristics into animals' organism. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta*, (2). 124-127. (In Russian).

2. Gusev, A. A., & Akimova, A. O. (2013). Vliyanie vysokodispersnykh chastits razlichnoi prirody na rannie stadii ontogeneza rastenii rapsa (*Brassica napus*). *Internet-zhurnal Naukovedenie*, (5). 11. (In Russian).

3. Davronov, K. S., Usmonov, P. M., & Kuchkarov, K. K. (2006). Rost i razvitie rastenii khlopchatnika pod vliyaniem ul'tradispersnykh poroshkov zheleza i medi. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya*, 41(3), 58-61. (In Russian).

4. Zotova, E. S. (2008). Issledovanie stroeniya i svoistv ul'tradispersnykh (nano-) poroshkov na osnove medi, magniya i zheleza, obladayushchikh biologicheskoi aktivnost'yu: avtoref. dis. ... kand. tekhn. nauk. Moscow. (In Russian).

5. Korotkova, A. M., Lebedev, S. V., Kayumov, F. G., & Sizova, E. A. (2017). Morfofiziologicheskie izmeneniya u pshenitsy (*Triticum vulgare* L.) pod vliyaniem nanochastits metallov (Fe, Cu, Ni) i ikh oksidov (Fe₃O₄, CuO, NiO). *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya*, 52(1). 172-182. (In Russian).

6. Kutsir, M. V. (2014). Opredelenie ekologicheskoi bezopasnosti nanomaterialov na osnove morfofiziologicheskikh i biokhimicheskikh pokazatelei sel'skokhozyaistvennykh kul'tur: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. Ryazan'. (In Russian).

7. Maksimenko, E. P., & Sheudzen, A. Kh. (2015). Nauchnye osnovy primeneniya kompleksnykh mikroudobrenii v risovodstve. *Politematicheskii setevoi elektronnyi nauchnyi zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, (107). 1102-1125. (In Russian).

8. Maslobrod, S. N., Mirgorod, Yu. A., Borodina, V. G., & Borshch, N. A. (2014). Vliyanie vodnykh dispersnykh sistem s nanochastitsami serebra i medi na prorastanie semyan. *Elektronnaya obrabotka materialov*, (4), 103-112. (In Russian).

9. Panichkin, L. A. & Raikova, A. P. (2009). Ispol'zovanie nanoporoshkov metallov dlya predposevnoi obrabotki semyan s.-kh. kul'tur. *Izvestiya Timiryazevskoi sel'skokhozyaistvennoi akademii*, (1), 59-65. (In Russian).

10. Churilov, G. I., & Ampleeva, L. E. (2010). Biologicheskoe deistvie nanorazmernykh metallov na razlichnye gruppy rastenii. Ryazan. (In Russian).

11. Churilov, G. I., Ampleeva, L. E., Nazarova, A. A., & Polishchuk, S. D. (2007). Vliyanie kobal'ta na fiziologicheskoe sostoyanie i morfobiokhimicheskie pokazateli krovi zhivotnykh. *Rossiiskii mediko-biologicheskii vestnik im. akademika IP Pavlova*, 15(4), 34-42. (In Russian).

12. Bellantone, M., Williams, H. D., & Hench, L. L. (2002). Broad-spectrum bactericidal activity of Ag₂O-doped bioactive glass. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(6), 1940-1945. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.6.1940-1945.2002>

13. Kuk, Y. I., Shin, J. S., Burgos, N. R., Hwang, T. E., Han, O., Cho, B. H., ... & Guh, J. O. (2003). Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage in rice plants. *Crop Science*, 43(6), 2109-2117. <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.2109>

14. Song, H. M., Ye, P. D., & Ivanisevic, A. (2007). Elastomeric nanoparticle composites covalently bound to Al₂O₃/GaAs surfaces. *Langmuir*, 23(18), 9472-9480. <https://doi.org/10.1021/la700979r>

Обидина И. В., Чурилов Г. И., Полищук С. Д., Тарара А. Ю., Гомозова С. С., Рыбин Н. Б., Амплеева Л. Е. Определение стимулирующего и токсического воздействия нанопорошков меди и кобальта на проростки риса // Вестник Нижневартговского государственного университета. 2020. № 2. С. 42–52. <https://doi.org/10.36906/2311-4444/20-2/06>

Obidina, I. V., Churilov, G. I., Polishchuk, S. D., Tarara, A. Yu., Gomozova, S. S., Rybin, N. B., & Ampleeva, L. E. (2020). Stimulating and toxic effects of copper and cobalt nanopowders on rice seedlings. *Bulletin of Nizhnevartovsk State University*, (2). 42–52. (In Russian) <https://doi.org/10.36906/2311-4444/20-2/06>

дата поступления: 03 марта 2020 г.

дата принятия: 17 апреля 2020 г.

© Обидина И.В., Чурилов Г.И., Полищук С.Д., Тарара А.Ю., Гомозова С.С., Рыбин Н.Б., Амплеева Л.Е.