

УДК 581.5

Углеродные нанотрубки проникают в ткани и клетки и оказывают стимулирующее воздействие на проростки эспарцета *Onobrychis arenaria* (Kit.) Ser.

Е. А. Смирнова^{1*}, А. А. Гусев², О. Н. Зайцева², Е. М. Лазарева¹, Г. Е. Онищенко¹,
Е. В. Кузнецова³, А. Г. Ткачев⁴, А. В. Феофанов^{1,5}, М. П. Кирпичников^{1,5}

¹Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы

²Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина, 392000, Тамбов, ул. Интернациональная, 33

³Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, 664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132

⁴ООО «НаноТехЦентр», 392000, Тамбов, ул. Советская, 51

⁵Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*E-mail: kinggobi@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.02.2011 г.

РЕФЕРАТ Влияние промышленно производимых наноматериалов на окружающую среду требует детального изучения, так как использование, утилизация и непреднамеренные утечки неизбежно приводят к распространению и накоплению наночастиц в воздухе, почве и воде. Растения являются одним из основных компонентов экосистем, поэтому неизбежно их взаимодействие с наночастицами, загрязняющими окружающую среду. Цель данной работы состояла в изучении воздействия на растения промышленного наноматериала «Таунит» на основе многостенных углеродных нанотрубок (МУНТ), а также определении его способности проникать в клетки и ткани растений. Установлено, что «Таунит» стимулирует рост надземных и подземных частей проростков и вызывает усиление активности пероксидаз у *Onobrychis arenaria*. Активность пероксидаз повышается при снижении концентрации «Таунита» в среде от 1000 до 100 мг/л. МУНТ из «Таунита» обнаружены в клетках и в межклеточном пространстве корней и листьев проростков, что указывает на способность МУНТ проникать в корни и накапливаться в них, а также транспортироваться по проводящей системе в листья проростков. Таким образом, изменения физиологических показателей растений связаны не только с адсорбцией МУНТ на корнях, как считалось ранее, но и с их проникновением в клетки и ткани растений.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА многостенные углеродные нанотрубки, световая микроскопия, электронная микроскопия, дифракция электронов, проростки эспарцета.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ УНМ – углеродный наноматериал; МУНТ – многостенные углеродные нанотрубки; ОУНТ – одностенные углеродные нанотрубки; ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Преимущества использования наноматериалов в современных технологиях не вызывают сомнений. Однако возможные негативные эффекты, связанные с распространением и накоплением в окружающей среде таких компонентов наноматериалов, как наночастицы и нановолокна, требуют детального изучения [1, 2]. Растения – основной компонент экосистем,

поэтому изучению влияния на них разных техногенных наноматериалов уделяется большое внимание [3–5]. Повышенный интерес вызывают углеродные наноматериалы (УНМ), такие, как фуллерены, многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ) и одностенные углеродные нанотрубки (ОУНТ), промышленное производство которых развивается быстрыми темпами. Так как нанотрубки имеют фибриллярную

форму, их часто сравнивают с асбестом [6] и по аналогии с ним опасаются возможного неблагоприятного воздействия на живые организмы [7]. Предварительные исследования дают основания полагать, что МУНТ/ОУНТ патогенны для животных [8]. В то же время нанотрубки по-разному влияют на растения. Показано, что МУНТ значительно усиливают скорость прорастания семян томатов [9], не влияют на параметры роста проростков пшеницы [10] и подавляют рост проростков риса [11], а ОУНТ подавляют рост корней томата, но стимулируют рост корней у лука и огурца [12]. МУНТ оказывают токсическое действие и на культивируемые клетки *Arabidopsis* [13]. Во всех исследованиях отмечали высокую адсорбцию МУНТ/ОУНТ на поверхности корневой системы проростков. Открытым остается вопрос о способности МУНТ/ОУНТ проникать и накапливаться в клетках и тканях растений. При этом неясен механизм развития физиологических эффектов, вызываемых экзогенным воздействием нанотрубок на растения. Цель работы – изучение воздействия промышленного наноматериала «Таунит» на основе МУНТ на проростки эспарцета и способности МУНТ проникать в клетки и ткани растений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объект исследования

Объект данного исследования – промышленный УНМ «Таунит» (ООО «НаноТехЦентр», Тамбов, Россия). Этот материал представляет собой сыпучий порошок черного цвета. Гранулы порошка размером в несколько микрометров состоят из спутанных пучков МУНТ. МУНТ имеют структуру полых цилиндров длиной 2 мкм и более, с наружным диаметром 20–70 нм и внутренним диаметром 5–10 нм. «Таунит» получают путем газофазного химического осаждения, его чистота составляет более 98% [14].

Проращивание семян и морфометрическая оценка

Семена эспарцета песчаного *Onobrychis arenaria* (Kit.) Ser. проращивали в среде, содержащей коллоидный водный раствор УНМ «Таунит» в концентрации 100 или 1000 мг/л. Перед использованием УНМ диспергировали в дистиллированной воде при помощи ультразвуковой установки. Для приготовления контрольной среды брали дистиллированную воду. Семена (50 штук на чашку) проращивали в течение 10 дней на фильтровальной бумаге в стеклянных чашках Петри диаметром 90 мм, в которые добавляли 5 мл суспензии УНМ. Размер выборки – 200 семян в каждом опыте. Условия проращивания соответствовали требованиям методики ГОСТа 12038-84 «Семена сельскохозяйственных культур. Методы

определения всхожести». Воздействие УНМ оценивали по следующим параметрам: всхожесть семян (%), энергия прорастания (%), линейные размеры надземных и подземных частей растений. Энергию прорастания и всхожесть определяли как отношение числа проросших семян к числу высеванных в процентах на 5-е и на 10-е сут соответственно (согласно ГОСТу).

Экстракция растворимых (общих) пероксидаз и определение их активности

Навески (2 г) тканей проростков эспарцета помещали в 5 мл холодного цитратно-фосфатного буфера (1 М раствор лимонной кислоты + 1 М NaH_2PO_4 , два раствора сливают вместе до pH 5.5) и растирали в фарфоровой ступке при 4°C [15]. Гомогенат центрифугировали при 3000g в течение 15 мин. Супернатант использовали для определения активности растворимых пероксидаз по скорости изменения (времени в секундах) оптической плотности при длине волны 580 нм в реакционной смеси следующего состава: 0.5 мл 0.1 М раствора цитратно-фосфатного буфера (pH 5.5), 0.5 мл 0.3% H_2O_2 («Реахим», Россия), 0.5 мл 0.05% гваякола («Sigma», США) и 0.5 мл пробы. Активность пероксидаз определяли при 25°C сразу после выделения ферментов из образцов. Активность рассчитывали по методу Бояркина [16] и выражали в условных единицах активности на грамм сырой массы тканей в секунду по формуле:

$$A = (\varepsilon \times \alpha \times \beta \times \gamma) / (d \times t),$$

где ε – коэффициент экстинкции;
 α – отношение количества буфера, взятого для приготовления вытяжки (мл), к массе сырой ткани (г);
 β – степень дополнительного разведения вытяжки в реакционной смеси;
 γ – степень постоянного разведения вытяжки в реакционной смеси;
 d – толщина поглощающего слоя (мм);
 t – время реакции (с).

Подготовка проб для микроскопии

Дно пластиковой коробки (размеры коробки приблизительно 40 × 40 × 7 см) выстилали четырьмя слоями марли, смачивали ее раствором УНМ или водой (в контроле). На марле раскладывали по 100 семян эспарцета. Концентрация УНМ – 300 мг/л.

Проростки отбирали на 5-й и 10-й день и подвергали фиксации для анализа методами световой и электронной микроскопии. Для световой микроскопии проростки фиксировали в смеси 96% этанола и уксусной кислоты (3 : 1) в течение 16 ч. После фиксации образцы растений переносили в 70% этанол.

Затем исследуемые участки растений (корень, лист, колеоптиль) помещали на предметное стекло в каплю 45% уксусной кислоты. Приготовление тотальных препаратов различных органов растений проводили по стандартному методу [17]. Готовые препараты анализировали с помощью светового микроскопа Leica DM1000 (объективы $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$ и $\times 100$), а изображения регистрировали цифровой камерой Leica DFC 295 (размер сенсора 3×10^6 пикселей).

Для просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) проростки фиксировали 2.5% глутаровым альдегидом на 0.1 М Na-K-фосфатном буфере (pH 7.2) с добавлением сахарозы (15 мг/мл). Затем проводили дегидратацию проб в серии этанола возрастающей концентрации и заключали в эпон 812 по стандартной методике. Чтобы облегчить выявление углеродных нанотрубок на фоне тканевых структур, мы отказались от дополнительной фиксации образцов с OsO_4 , а также от контрастирования уранилацетатом и PbNO_3 .

Образец исходного УНМ готовили для ПЭМ следующим образом: 25 мг «Таунита» помещали на поверхность жидкой смолы (эпон 812), налитой в пробирку, центрифугировали в течение 3 мин при 6000 г и полимеризовали по стандартной методике.

Ультратонкие срезы залитых в эпон образцов исследовали методами ПЭМ и дифракции электронов с помощью просвечивающих электронных микроскопов JEM-1011 (JEOL) с цифровой фотокамерой GATAN ES500W и LEO 912AB (Carl Zeiss).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние «Таунита» на морфометрические и биохимические характеристики проростков эспарцета

Для определения экотоксичности УНМ использовали тест на прорастание семян, в котором оценивали всхожесть, длину корней и стеблей, энергию прорастания и активность пероксидаз [18]. Проращивание семян эспарцета песчаного в присутствии коллоидного раствора УНМ «Таунит» увеличило энергию прорастания на 14% по сравнению с контролем. УНМ в концентрации 100 и 1000 мг/л повышал всхожесть семян на 2 и 7% соответственно (рис. 1а). «Таунит» усиливал рост подземных и надземных частей растений. При концентрации УНМ, равной 100 и 1000 мг/л, увеличение длины корней составило 55 и 73% соответственно, а стеблей проростков – 84 и 82% по сравнению с контролем (рис. 1б). Таким образом, УНМ «Таунит» вызывает небольшое повышение всхожести семян и энергии их прорастания, а также значительно усиливает рост надземных и подземных частей растения. В концентрации 100 и 1000 мг/л «Таунит» усиливал активность пероксидаз в про-

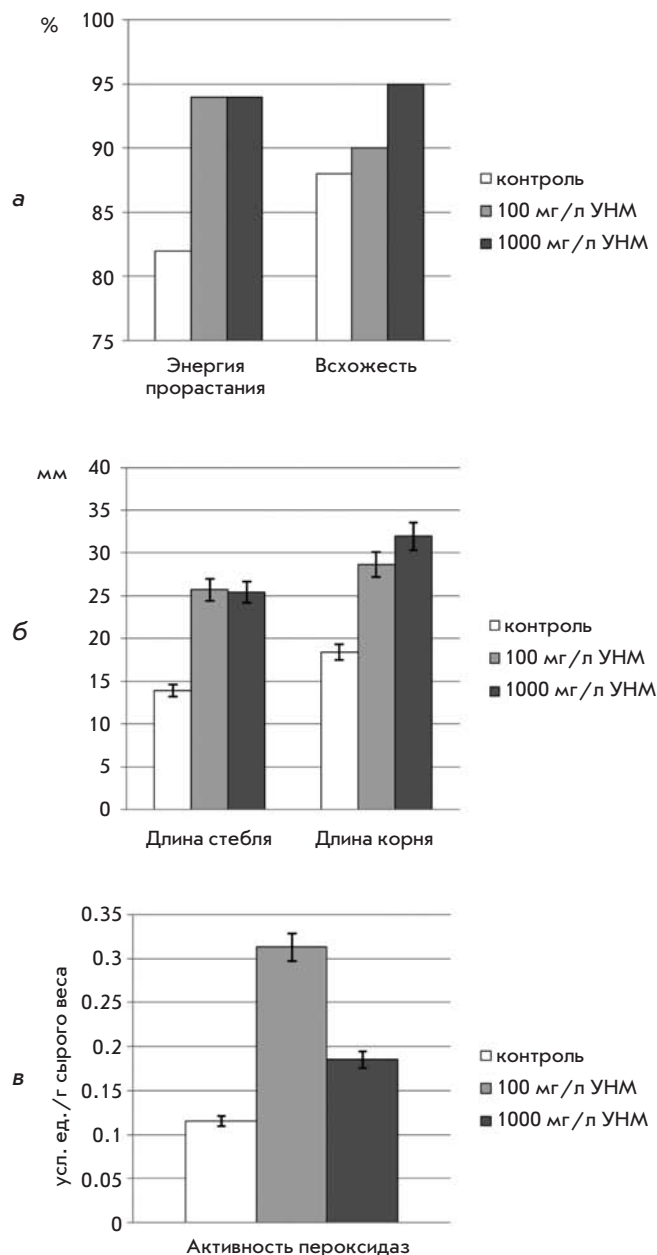


Рис. 1. Влияние различных концентраций углеродного наноматериала (УНМ) на витальные, морфометрические и биохимические характеристики проростков семян эспарцета.

ростках эспарцета, соответственно, до 0.31 ± 0.01 и 0.19 ± 0.02 усл. ед. /г сырого веса, что достоверно больше контрольного значения (0.12 ± 0.01) (рис. 1в).

Известно, что растения отвечают на механические воздействия и повреждения путем изменения морфологии или скорости роста. Это явление получило название тигмоморфогенеза. Тигмоморфогенетические

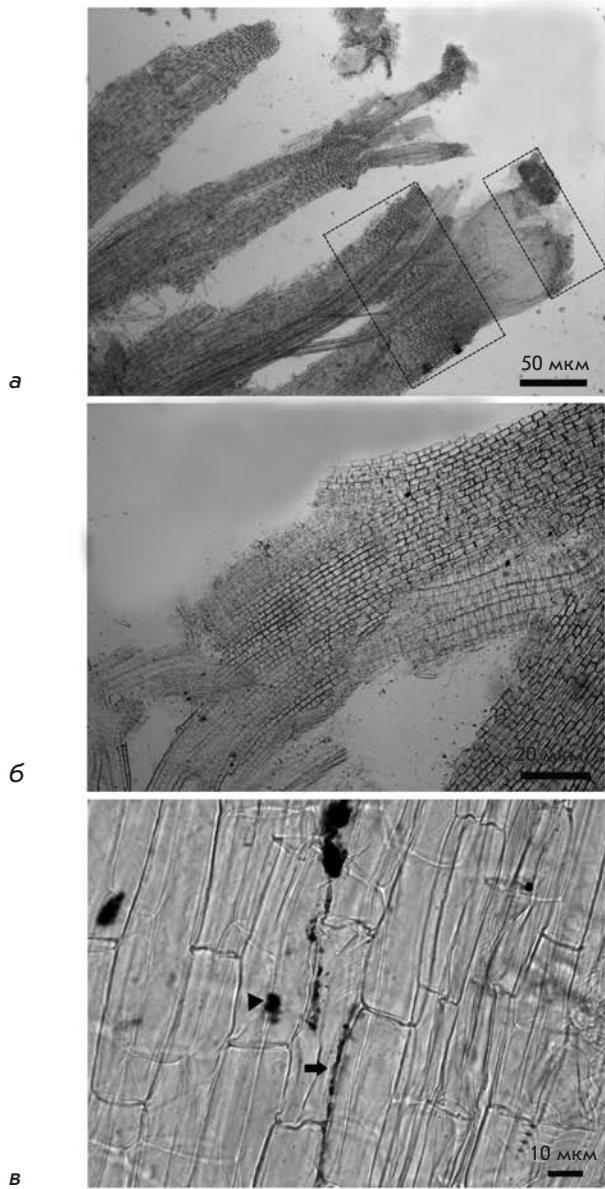


Рис. 2. Препарат распластанного корня эспарцета. Дополнительное контрастирование (окрашивание) не проводилось. *а* – В корне УНМ распределяется неравномерно, и области более интенсивного накопления выделены прямоугольными вставками. УНМ декорируют межклетники чехлика, зоны дифференцировки и проводящие пучки. Масштаб 50 мкм. *б* – Включение УНМ в межклетники зоны дифференцировки. Масштаб 20 мкм. *в* – Крупные скопления УНМ локализованы в межклетниках (стрелка) и клетках (треугольная стрелка). Масштаб 10 мкм.

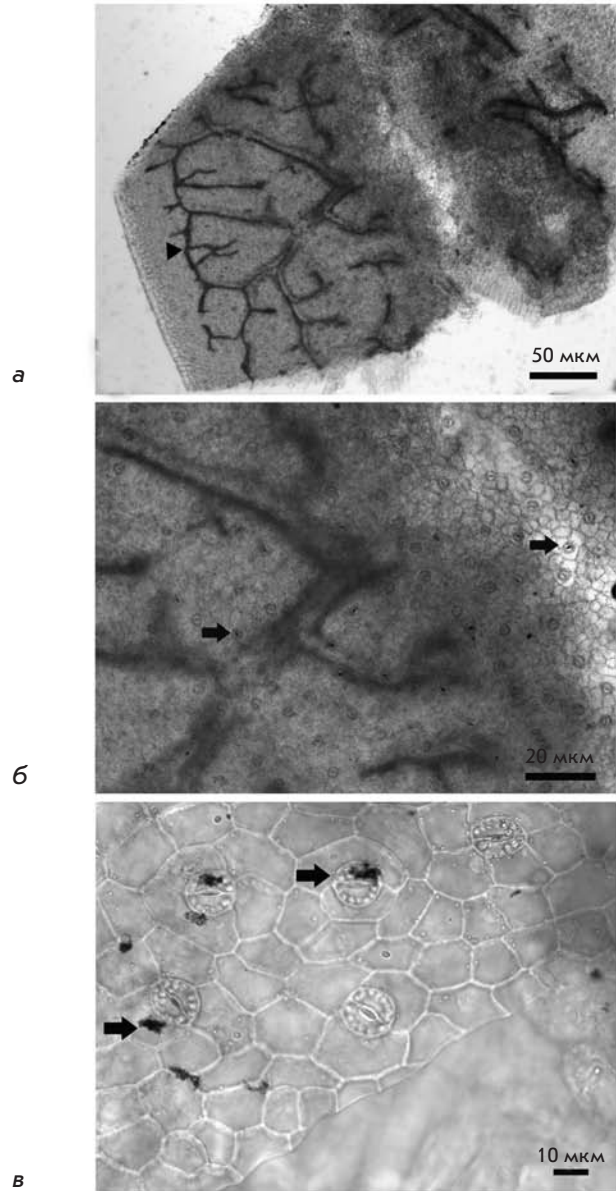


Рис. 3. Препарат распластанного участка листа эспарцета. Дополнительное контрастирование (окрашивание) не проводилось. *а* – УНМ декорируют проводящие пучки (треугольная стрелка). Масштаб 50 мкм. *б* – УНМ окрашивает проводящие пучки и локализуется в устьицах (стрелки). Масштаб 20 мкм. *в* – УНМ выявляется в замыкающих клетках устьица и в клетках эпидермиса (стрелки). Масштаб 10 мкм.

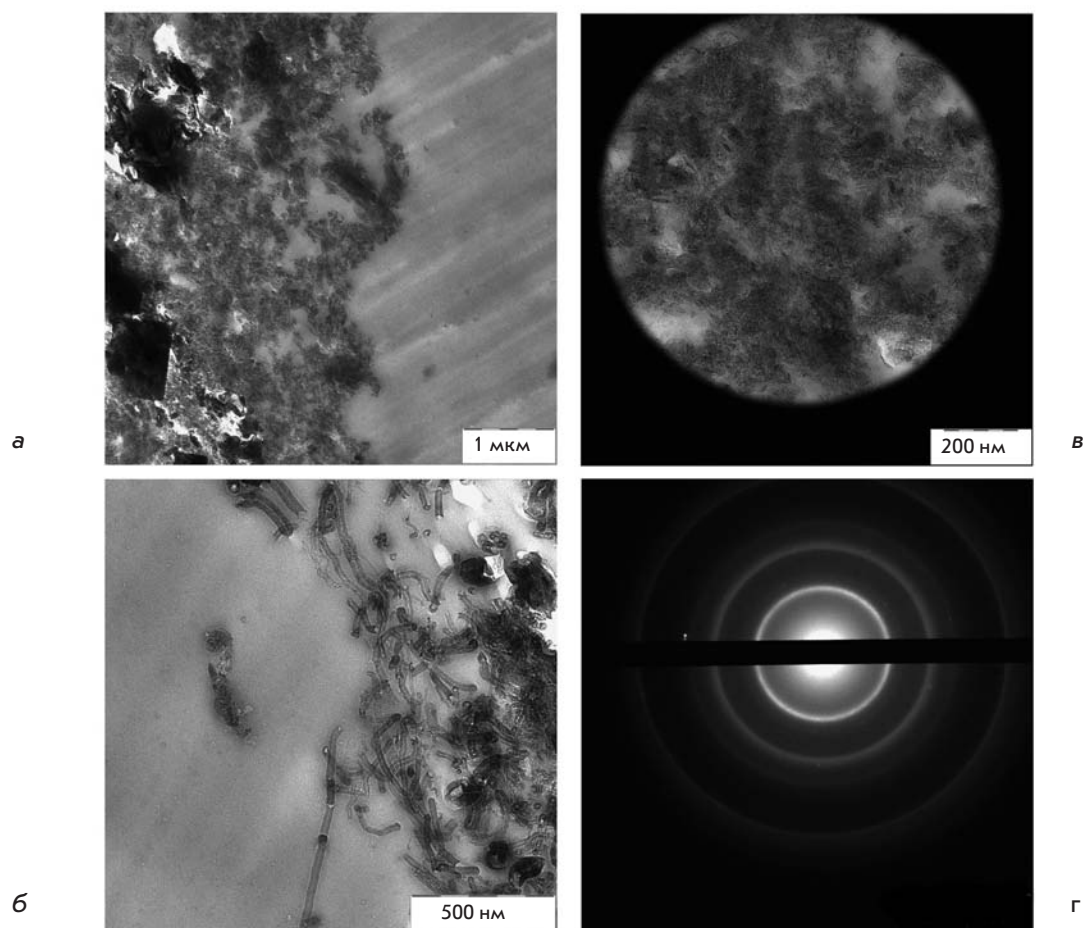


Рис. 4. Электронно-микроскопический анализ образцов УНМ «Таунит». а, б – Ультратонкий срез образца УНМ. в – Участок среза, выбранный для анализа с помощью дифракции электронов. г – Электронограмма анализируемой области.

изменения рассматривают как процесс адаптации растений к стрессовым ситуациям, и важную роль в этом играют растительные гормоны [19]. При механическом стрессе повышается активность гормона «стресса» растений – жасмоновой кислоты, и понижается активность ауксина, который контролирует процессы морфогенеза и роста растений, и причиной этого является усиление активности пероксидаз [20–22]. Пероксидаза принимает участие в целом ряде биологических процессов, таких, как фотосинтез, дыхание, белковый обмен. Это один из антиоксидантных ферментов, обладающий повышенной чувствительностью к внешним воздействиям, что позволяет использовать активности пероксидаз в качестве тестовой характеристики для определения состояния растения. В большинстве случаев повышение активности пероксидаз свидетельствует о включении механизма неспецифического ответа растения на стресс [23]. Можно предположить, что повышение активности пероксидаз связано с окислительным стрессом, вызванным УНМ. В связи с тем, что взаимодействие МУНТ с корнями растений сопровождается нарушением целостности покровных тканей [10] и усилением

активности пероксидаз, такое взаимодействие можно рассматривать как механическое повреждение. По результатам нашего исследования установлено, что уровень активности пероксидаз снижается при повышении концентрации УНМ в исследованном диапазоне. Возможной причиной этого может быть инактивация нанотрубками молекул пероксидаз за счет сорбционных или других химических взаимодействий. Наши исследования показали, что наряду с повышением уровня активности пероксидаз удлиняются подземные и надземные части растений. Для установления причины усиленного роста растений, выращиваемых в присутствии УНМ, требуются дальнейшие исследования.

Анализ взаимодействий УНМ «Таунит» с проростками эспарцета методами микроскопии

При проращивании эспарцета в присутствии УНМ «Таунит» корни, стебли и листья проростков приобретают характерный темно-серый цвет. Анализ тотальных препаратов проростков показал, что конгломераты темно-серого и черного цвета локализируются как на поверхности корней проростков, так и в опре-

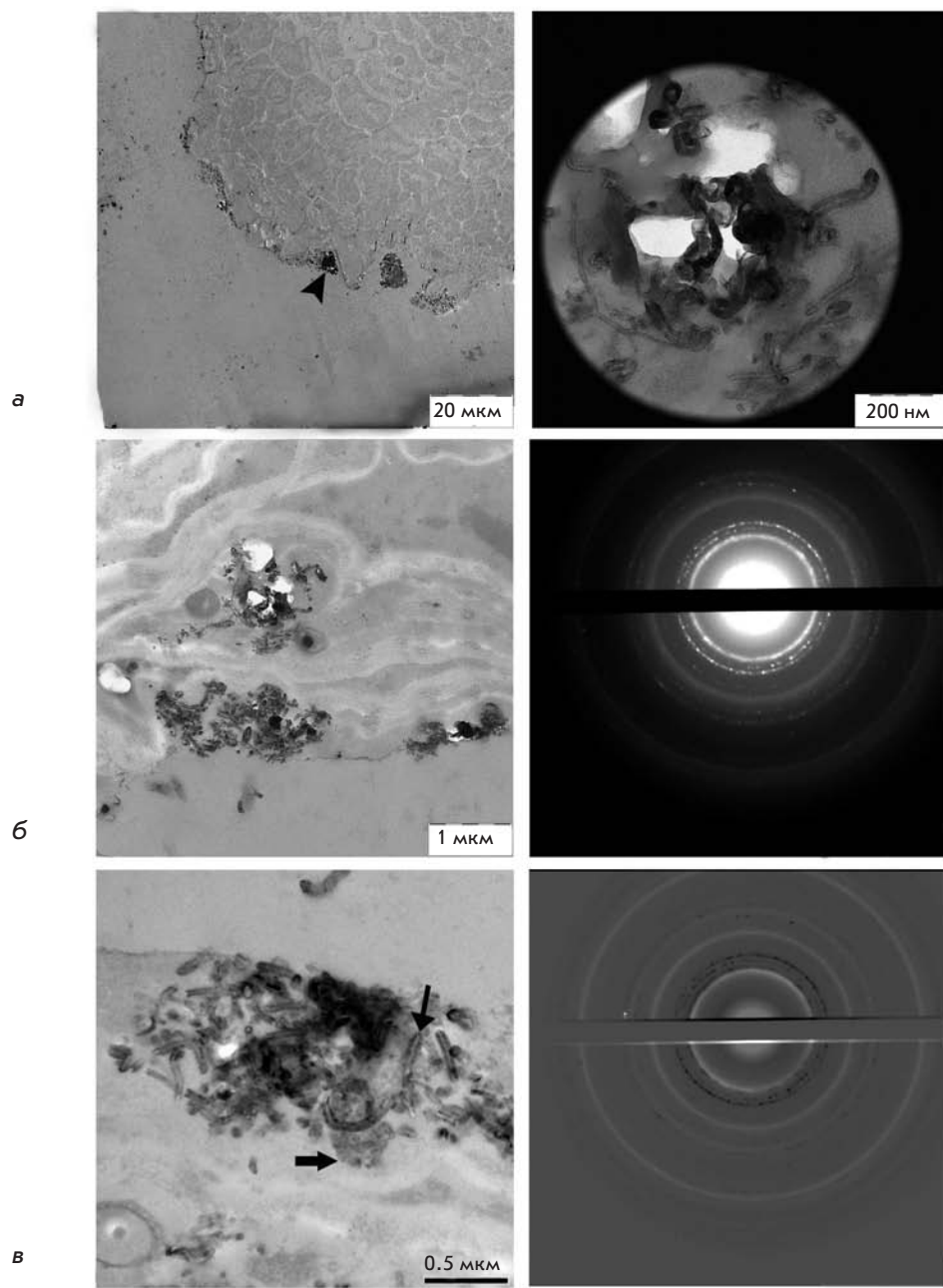


Рис. 5. Электронно-микроскопический анализ ультратонких срезов корня эспарцета после инкубации с УНМ. а – На поверхности корня присутствуют скопления УНМ, одно из них показано стрелкой. б – Скопления УНМ на поверхности и в клетках корня. в – Скопления УНМ в клетках состоят из нанотрубок (тонкая стрелка) и мелкодисперсного электронно-плотного материала (толстая стрелка). г – Участок корня, содержащий УНМ и выбранный для анализа с помощью дифракции электронов. д – Электронограмма анализируемой области. е – Совмещение электронограммы эталона УНМ (рис. 4г) и инвертированного изображения электронограммы УНМ в клетке корня проростка (5д). Совпадающие рефлексы и кольца на этой электронограмме – белые; рефлексы, отсутствующие на электронограмме эталона УНМ, – черные.

деленных внутренних зонах корней, стеблей и листьев, содержатся в клетках и межклеточном пространстве (рис. 2а–в, 3а–в). Ультратонкие срезы, приготовленные из участков органов растений, которые по данным световой микроскопии аккумулировали черные конгломераты, дополнительно исследовали методами электронной микроскопии.

Предварительно был проведен анализ исходного УНМ. На изображениях видна характерная структура УНМ «Таунит» (рис. 4а,б) – конгломераты МУНТ и включения нанодисперсного электронно-плотного материала, вероятно, графитизированного углерода.

Морфологические особенности МУНТ хорошо видны на рис. 4б. Участок с МУНТ, не содержащий графитизированного углерода (рис. 4в), был охарактеризован методом дифракции электронов. Как показано на рис. 4г, МУНТ, благодаря упорядоченной периодической упаковке атомов углерода, формируют на электронограмме кольца, характерные для поликристаллических образцов. Данную электронограмму мы использовали в качестве эталонной для идентификации МУНТ в биологических образцах.

Анализ ультратонких срезов корней и листьев проростков показал, что УНМ находятся как на поверх-

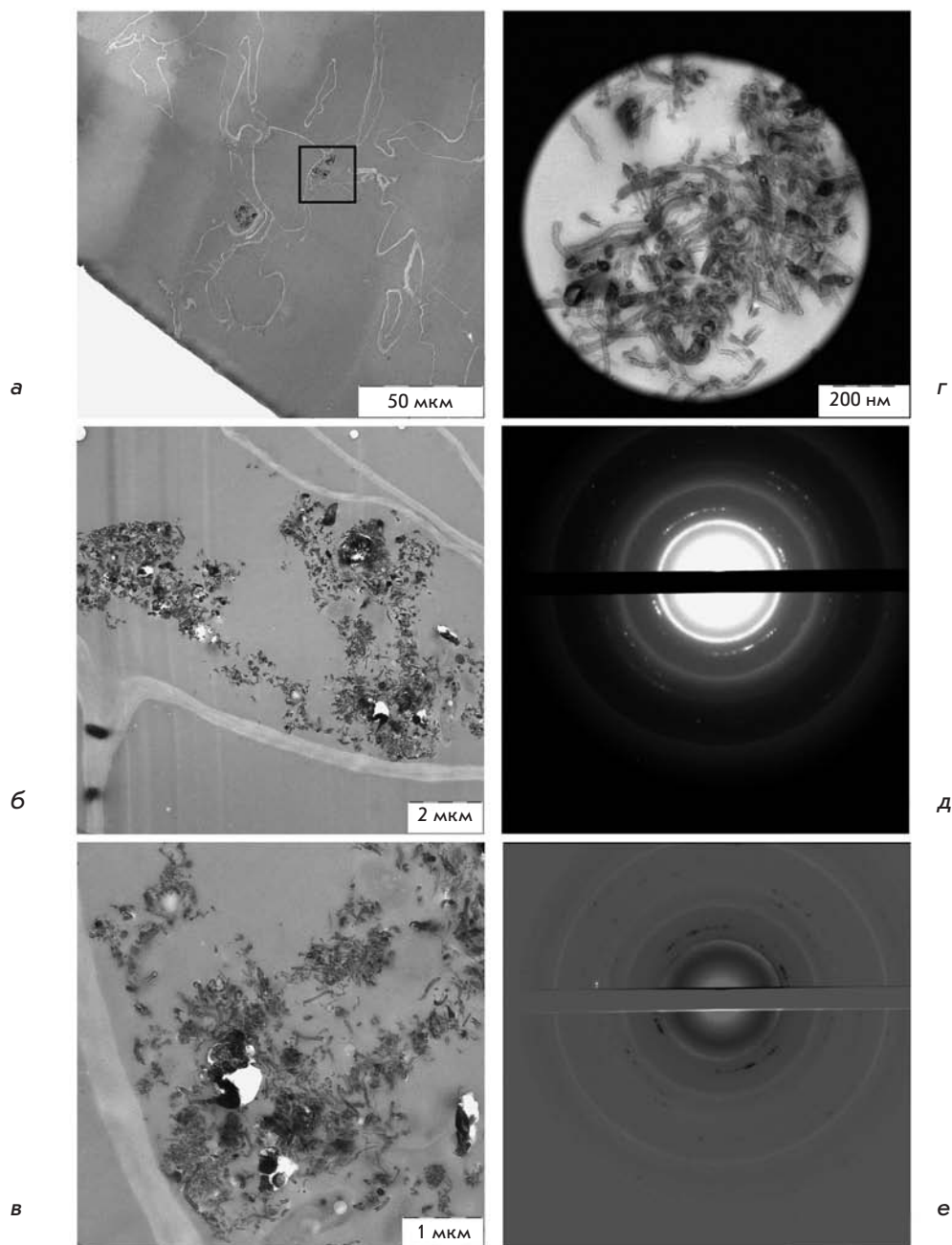


Рис. 6. Электронно-микроскопический анализ ультратонких срезов листа эспарцета после инкубации с УНМ. а – Участок листа с двумя скоплениями УНМ в клетках. Участок, выделенный в прямоугольной рамке, показан на большем увеличении на б и в. б, в – УНМ состоит из нанотрубок и мелкодисперсного электронно-плотного материала. г – Участок листа, выбранный для анализа с помощью дифракции электронов. д – Электронограмма анализируемой области. е – Совмещение электронограмм образца (рис. 4г) и инвертированного изображения электронограммы УНМ в клетке листа проростка (бд). Совпадающие рефлексы и кольца на этой электронограмме – белые; рефлексы, отсутствующие на электронограмме эталона УНМ, – черные.

ности, так и внутри органов проростков. Адсорбция МУНТ на поверхности корешка (рис. 5а) согласуется с данными других исследователей [3, 10, 11]. При этом скопления и одиночные МУНТ разной длины обнаруживаются также в клетках корня (рис. 5б,в) и листа (рис. 6а–в). Нанотрубки, лежащие в плоскости среза, четко распознаются с помощью ПЭМ по характерным морфологическим особенностям. Однако, если МУНТ расположены поперек или под большим углом к плоскости среза, то остающиеся в срезе фрагменты МУНТ трудно отличить от различных электронно-

плотных эндогенных включений. В этих случаях для идентификации МУНТ в тканях растений можно использовать метод дифракции электронов (рис. 5г, 6г). При наложении электронограмм видно, что все дифракционные кольца на электронограмме биологических образцов (рис. 5д, 6д) совпадают с кольцами на электронограмме эталона (рис. 4г), что также подтверждает присутствие МУНТ в клетках растений. Отдельные дополнительные рефлексы на электронограммах объясняются наличием в тканях растений эндогенных кристаллических включений.

Накопление МУНТ на поверхности корней отмечают многие исследователи [3, 9–11], и с этим связывают влияние данного наноматериала на рост и развитие растений [13]. Подавление роста растений объясняют блокированием всасывания воды и питательных веществ из-за адсорбции большого количества МУНТ на поверхности корней [11]. Усиление всхожести семян связывают с тем, что нанотрубки, в частности ОУНТ, протыкают семенную кожуру и увеличивают поступление воды, способствующей прорастанию семян и росту растений [9]. Однако ОУНТ не только протыкают клеточную стенку, но и проникают внутрь клеток, что показано с помощью ОУНТ, меченных FITC (SWNT/FITC) [24]. МУНТ, проникающие сквозь клеточную стенку клеток эпидермиса и корневых волосков на глубину до 4 мкм, наблюдали в проростках пшеницы с помощью двухфотонной микроскопии, но полного проникновения МУНТ в цитоплазму не обнаружили [10]. Авторы предположили, что внутриклеточное накопление МУНТ затруднено из-за большего по сравнению с ОУНТ диаметра нанотрубок [10].

ВЫВОДЫ

Нами впервые на примере эспарцета показано, что МУНТ способны проникать через клеточную стенку, накапливаться в клетках и межклеточном пространстве, и поступать по проводящим системам из корней в стебли и листья растений. Не исключено, что наблюдавшиеся нами усиление роста корней и стеблей эспарцета, а также повышение активности пероксидаз вызваны окислительным стрессом, который развивается из-за накопления МУНТ в клетках и тканях растений. ●

Авторы выражают глубокую благодарность за помощь в выполнении работы С.С. Абрамчуку (Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского).

Работа была поддержана ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (госконтракты П 208 от 23.04.2010 г. и 16.740.11.01-94 от 24.09.2010) и Государственным контрактом № 01.648.11.3003.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Handy R.D., Owen R., Valsami-Jones E. // *Ecotoxicology*. 2008. V. 17. P. 315–325.
- Moore M.N. // *Environ. Internat.* 2006. V. 32. P. 967–976.
- Ma X., Geiser-Lee J., Deng Y., Kolmakov A. // *Sci. Total Environ.* 2010. V. 408. P. 3053–3061.
- Navarro E., Baun A., Behra R., Hartmann N.I.B., Filser J., Miao A.-J., Quigg A., Santschi P.H., Sigg R. // *Ecotoxicology*. 2008. V. 17. P. 372–386.
- Ruffini Castiglione M., Cremonini R. // *Cariologia*. 2009. V. 62. P. 161–165.
- Berhanu D., Dybowska A., Misra S.K., Stanley C.J., Ruenraroengsak P., Voccaccini A.R., Tetley T.D., Luoma S.N., Plant J.A., Valsami-Jones E. // *Environ. Hlth.* 2009. V. 8 (Suppl 1). S3.
- Yuliang Zh., Genmei Xi., Zhifang Ch. // *Nat. Nanotechnol.* 2008. V. 4. P. 191–192.
- Poland C.A., Duffin R., Kinloch I., Maynard A., Wallace W. A., Seaton A., Stone V., Brown S., MacNee W., Donaldson K. // *Nat. Nanotechnol.* 2008. V. 3. P. 423–428.
- Khodakovskaya M., Dervishi E., Mahmood M., Xu Y., Li Z., Watanabe F., Biris A.S. // *ACS Nano*. 2009. V. 3. P. 3221–3227.
- Wild E., Jones K.C. // *Environ. Sci. Technol.* 2009. V. 43. P. 5290–5294.
- Lin S., Reppert J., Hu Q., Hudson J.S., Reid M.L., Ratnikova T.A., Rao A.M., Luo H., Ke P.C. // *Small*. 2009. V. 5. P. 1128–1132.
- Canas J.E., Long M., Nations S., Vadan R., Dai L., Luo M., Ambikapathi R., Lee E.H., Olszyk D. // *Environ. Toxicol. Chem.* 2008. V. 27. P. 1922–1931.
- Lin C., Fugetsu B., Su Y., Watari F. // *J. Hazardous Material*. 2009. V. 170. P. 578–583.
- Ткачев А.Г., Золотухин И.В. *Аппаратура и методы синтеза твердотельных наноструктур*. М.: Машиностроение-1, 2007. 316 с.
- Паду Э.Х. // *Физиология растений*. 1995. Т. 42. № 3. С. 408–415.
- Бояркин А.Н. // *Биохимия*. 1951. Т. 16. № 4. С. 352–355.
- Паушева Э.П. *Практикум по цитологии растений*. М.: Колос, 1974. 288 с.
- Barrena R., Casals E., Colón J., Font X., Sánchez A., Puentes V. // *Chemosphere*. 2009. V. 75. P. 850–857.
- Chehab E.W., Eich E., Braam J. // *J. Exp. Bot.* 2009. V. 60. P. 43–56.
- Hofinger M., Chapelle B., Boyer N., Gaspar T. // *Plant Physiol.* 1979. V. 63. S-52.
- Ostin A., Kowalczyk M., Bhalerao R.P., Sandberg G. // *Plant Physiol.* 1998. V. 118. P. 285–296.
- Woodward A.W., Bartel B. // *Ann. Botany*. 2005. V. 95. P. 707–735.
- Андреева В.А. *Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений*. М.: Наука, 1988. 128 с.
- Liu Q., Chen B., Wang Q., Shi X., Xiao Z., Lin J. Fang X. // *Nano Lett.* 2009. V. 9. P. 1007–1010.