



Н. А. Макаренко
доктор с.-г. наук,
професор Національного
університету біоресурсів і
природокористування України

УДК 504:632.95.024:631.811.98-022.532



Л. В. Рудницька
аспірант, Національний
університет біоресурсів і
природокористування України
lyudmila.rudnscka@gmail.com

ДО ПИТАННЯ ЕКОТОКСИКОЛОГІЧНОЇ ОЦІНКИ НАНОПРЕПАРАТІВ

Анотація. Стаття присвячена питанню безпеки нанопрепаратів і здійснення їх екоотоксикологічної оцінки.

За результати дослідження цитотоксичного ефекту на клітинах *Allium cepa* L. були зареєстровані мутації, які викликані дією наноагрохімікатів і пов'язані з грубим порушенням структури хромосом, пошкодженням мітотичного веретена (веретена поділу), а також зі зміною поведінки хромосом на веретені поділу.

Для оцінки екоотоксичного впливу нанопрепаратів на церіодафніях за величиною медіанно-летальної концентрації встановлено клас небезпечності препаратів: Аватар-1 віднесено до класу «надзвичайно небезпечні», а Nano-Gro - «небезпечні».

В роботі експериментально обґрунтовано і науково доведено, що екоотоксикологічна оцінка безпеки наноагрохімікатів не повинна ґрунтуватися лише на вивченні залежності «доза-ефект» на рівні організму і популяції, вона повинна включати дослідження токсичного процесу, починаючи з рівня клітини та її органел.

Ключові слова: клітина, цитотоксичність, наноагрохімікати, популяція.

Н. А. Макаренко

доктор сільськогосподарських наук, професор
Національний університет біоресурсів і природопользования України

Л. В. Рудницька

аспірант

Національний університет біоресурсів і природопользования України

К ВОПРОСУ ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ НАНОПРЕПАРАТОВ

Аннотация. Статья посвящена вопросу безопасности нанопрепаратов и осуществления их экотоксикологической оценки.

По результатам исследования цитотоксического эффекта на клетках *Allium cepa* L. были зарегистрированы мутации, вызванные действием наноагрохимикатов и связанные с грубым нарушением структуры хромосом, повреждением митотического веретена (веретена деления), а также с изменением поведения хромосом на веретене деления.

Для оценки экотоксического воздействия нанопрепараты на цериодафния по величине медианного-летальной концентрации установлен класс опасности препаратом: Аватар-1 относится к классу «чрезвычайно опасные», а Nano-Gro - «опасные».

В работе экспериментально обоснована и научно доказано, что экотоксикологическая оценка опасности наноагрохимикатов не должна основываться только на изучении зависимости «доза-эффект» на уровне организма и популяции, она должна включать исследование токсического процесса, начиная с уровня клетки и ее органелл.

Ключевые слова: клетка, цитотоксичность, наноагрохимикаты, популяция.

N. A. Makarenko

Doctor of agricultural sciences, professor
National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

L. V. Rudnitska

Post graduate student

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

TO THE ISSUE OF ECOTOXICOLOGICAL ASSESSMENT OF NANOPREPARATIONS

Abstract. The rapid introduction of nanomaterials into agricultural practices not only opens up new prospects, but also bears a threat to natural ecosystems and people. Therefore, the urgent issue is to develop a system of environmental assessment nanopreparations that will allow justifying regulations of their use and determine the best environmentally safe rate of their application to crops.

Taking into consideration the peculiarities of structure and size of nanoparticles of the basic components of nanoagrochemicals registration of negative changes at the cellular level is relevant, as well as of its organelles, processes occurring in it. This will enable preventively assess the risks, extrapolate the obtained results to a higher level of organization of biological systems and avoid possible negative impacts on the ecosystem level.

Results of the study of cytotoxic effect on the cells of *Allium cepa* L. indicate that the use nanoagrochemicals in doses recommended for agricultural production have led to a decrease of mitotic activity.

Mutations have been reported, caused by the impact of agrochemicals and were related to flagrant violation of the structure of chromosomes, damage of mitotic spindle and with the change of behavior of chromosomes on the spindle.

According to the study the application of the preparation Avatar-1 at all concentrations caused 100% death of the female parent specimen of *Ceriodaphnia*. Preparation Nano-Gro in the recommended dose caused the death of 78% of the female parent specimen, however, the increase of the applicable dose was accompanied with a decrease in the number of dead

female parent specimen of *Ceriodaphnia* (44%). Preparation Nano-Gro reduced the number of viable affiliated individuals and the number of eggs the female laid again if compared to the control. However, the toxic effect of Nano-Gro was significantly lower compared to the preparation Avatar-1. The use of the latter, especially in high doses - 4RD (concentration of 1.00 mg/dm³), led to such phenomena as female deaths, birth of dead offspring, throwing eggs out at different stages of development, the birth of the offspring with underdeveloped armor, etc.

Ecotoxicological assessment of the risk of nanoagrochemicals should not be based only on the study of dependence "dose-effect" at the level of the organism and population, it should include the studies of the toxic process, starting from the level of cell and its organelles.

Keywords: cell, cytotoxicity, nanoagrochemicals, population.

Постановка проблеми. Нанотехнології знаходять все більше застосування у різних галузях економіки, створюючи підґрунтя для нових напрямків технологічного розвитку людства. Швидке впровадження наноматеріалів у промисловості, медицині, сільському господарстві не тільки відкриває нові перспективи, але і внаслідок більш тісного контакту з живих організмів може становити загрозу для навколишнього середовища та здоров'я населення [1, 2].

Невеликі розміри та різноманітність форм наночастинок зумовлює відмінності у особливостях їх надходження в організм, біотрансформації та виведення, взаємодії із клітинними структурами, біологічними молекулами. Велика відносна площа наноматеріалів істотно збільшує їх адсорбційну ємність, хімічну реакційну здатність та каталітичні властивості [1]. Наночасточки (НЧ) завдяки своїм малим розмірам погано розпізнаються захисними системами організму і, як наслідок, не піддаються біотрансформації та не виводяться з організму, що сприяє високій їх акумуляції у біосередовищах організму [2]. Наночасточки можуть бути більш токсичними, ніж звичайні мікрочасточки — вони здатні проникати в незміненому вигляді через клітинні та тканинні бар'єри, циркулювати і накопичуватися в органах і тканинах, викликаючи при цьому більш виражені патоморфологічні ураження внутрішніх органів. Вони мають тривалий період напіввиведення.

Отже, нині проблема безпеки наноматеріалів є однією з пріоритетних [3].

У свою чергу, потребує вирішення визначення методології проведення токсикологічної оцінки наноматеріалів, оскільки вони, як зазначалося вище, володіють фізико-хімічними властивостями, відмінними від властивостей мікрочастинок та сполук в іонній формі. Проте, на даний час не розроблено чітких стандартизованих методик для експериментальних досліджень, не встановлено критеріїв безпеки та допустимих меж їх впливу [4]. Застосування методів класичної токсикології у комбінації з альтернативними методами та сучасними технологіями дозволить більш ефективно проводити оцінювання.

Аналіз останніх досліджень. На думку фахівців Королівського товариства і Королівської інженерної академії Великої Британії, дослідження екологічної небезпеки наноматеріалів значно відстають від розвитку нанотехнологічної індустрії [5]. Це у певній мірі стосується наноагрохімікатів, які використовуються в сільському господарстві. Зазвичай, дози їх застосування на кілька порядків нижче, ніж традиційних препаратів (наноагропрепарати застосовуються в мг/га, традиційні препарати – в кг/га). Цей фактор часто буває основним аргументом для прийняття позитивного рішення екологічної експертизи, оскільки в основі розрахунку ризиків лежить класична залежність «доза—ефект».

Однак, у випадку наноагрохімікатів необхідно враховувати не тільки дозу, але й такі їх фізико-хімічні характеристики, як розмір НЧ та структура. Саме вони можуть зумовлювати біодоступність НЧ, їх швидкість досягнення структури-мішені, енергію зв'язку з біорецепторами і, відповідно, рівень небезпечності препарату.

Дослідженнями [2] показано, що НЧ, внаслідок своєї невеликих розмірів, можуть проникати в клітинні органи і тим самим змінювати функції біоструктур.

Мета статті. Враховуючи особливості будови та розмірів НЧ складових компонентів наноагрохімікатів, актуальним є реєстрація негативних змін на рівні

клітини, її органел, процесів, що протікають в ній. Це дасть можливість превентивно оцінити можливі ризики, екстраполювати отримані результати на більш високий рівень організації біосистем і уникнути можливих негативних впливів на рівні екосистеми.

Методика досліджень. Дослідження мутагенного, мітозмодифікувального і цитотоксичного ефектів проводили за допомогою ана-телофазного методу на клітинах цибулі ріпчастої (*Allium cepa* L.). Мітозмодифікувальний ефект (зміни мітотичної активності меристеми), як відповідь тест-системи на дію наноагропрепаратів визначали, використовуючи показник мітотичного індексу (MI) [6].

Токсичність наноагропрепаратів відносно представників популяції водної екосистеми вивчали на стандартизованому тест-організмі – церіодафнії (*Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg), згідно з ДСТУ 4173 [7].

Основні результати дослідження. Вивчення токсичності наноагрохімікатів проводили на різних рівнях організації біологічних систем, об'єктами були наноагрохімікати, до складу яких входять НЧ.

Nano-Gro – стимулятор росту, представляє собою водорозчинні гранули діаметром близько 4 мкм, масою 0,05 г з масовою часткою активних компонентів сульфатів заліза, кобальту, алюмінію, магнію, марганцю, нікелю та срібла 2,84x10⁻⁹ % гранули або 1,43x10⁻¹¹ г.

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

Досліджували концентрації наноагропрепаратів, які відповідали їх нормам внесення під сільськогосподарську культуру, за такою схемою:

Варіант	Доза, мг/кг		Концентрація розчину, мг/дм ³
Контроль	-	-	-
Nano-Gro	100 (рекомендована)	1 РД	0,50
	200	2 РД	1,00
	300	3 РД	1,50
	400	4 РД	2,00
Аватар-1	50 (рекомендована)	1 РД	0,25
	100	2 РД	0,50
	150	3 РД	0,75
	200	4 РД	1,00

Традиційні препарати зазвичай оцінюються за реакцією організмів і популяцій. Наноагропрепарати, у зв'язку з низькими дозами застосування, можуть впливати на біологічні системи таким чином, що ознаки токсичного процесу на рівні популяції будуть проявлятися через тривалий проміжок часу і мати пролонгований характер, що, у свою чергу, може призводити до ускладнення реєстрації і вимірювання токсичної дії і токсичного процесу (рис. 1).

Результати дослідження цитотоксичного ефекту на клітинах *Allium cepa* L. свідчать, що застосування наноагрохімікатів в дозах, які рекомендовані для сільськогосподарського виробництва, призвели до зниження мітотичної активності. Встановлено, що мітотичний індекс меристематичної тканини контролюючого варіанту складав

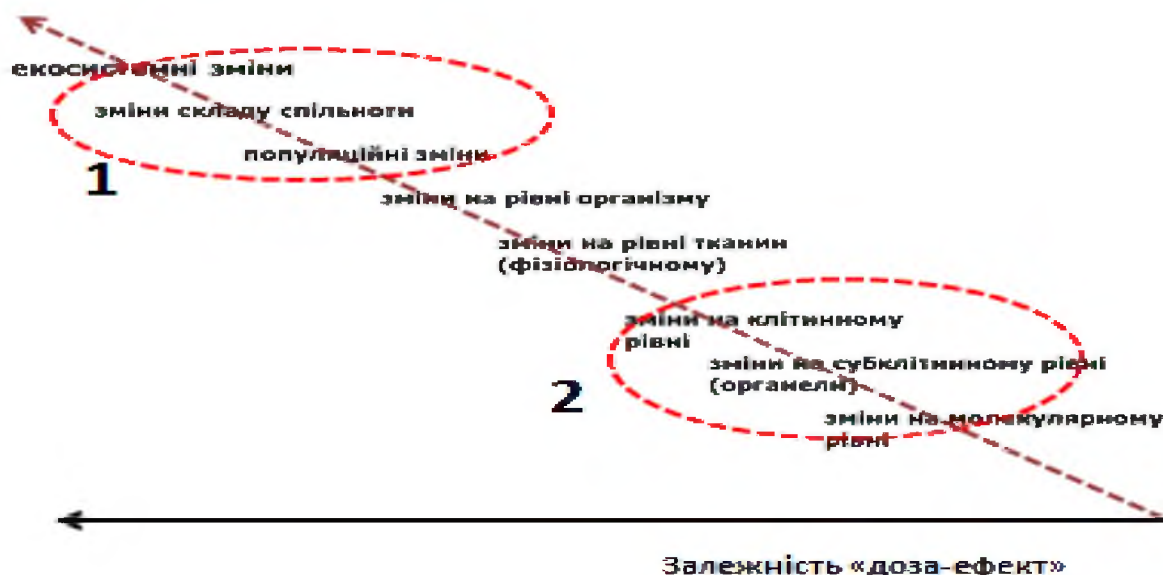


Рис. 1. Реєстрація токсичного процесу на різних рівнях організації біосистем: 1 – для традиційних препаратів, 2 – для нанопрепаратів

534,88 %, у той час, як під впливом Nano-Gro (1 РД) - 519,08 % та Аватар-1 (1 РД) - 514,93 %.

Поруч з характерним поділом клітин на стадії ана- і телофази у контрольному варіанті, були зареєстровані мутації, які виникали під дію наноагрохімікатів і були пов'язані з грубим порушенням структури хромосом, пошкодженням мітотичного веретена (веретена поділу), а також зі зміною поведінки хромосом на веретені поділу.

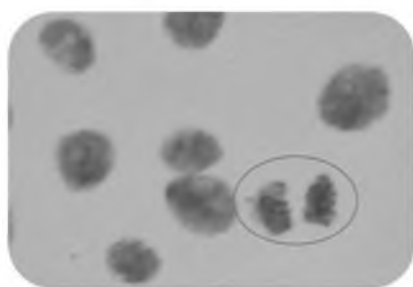
Під дією препарату Аватар-1 спостерігалось відставання ділення хромосом (рис. 2) в анафазі та телофазі, що може бути свідченням часткової втрати генетичної інформації в подальшому.

Застосування наноагрохімікату Nano-Gro призвело до пошкодження мітотичного веретена розподілу, до утворення мостів (рис. 3) і призупинення ділення клітин в анафазі.

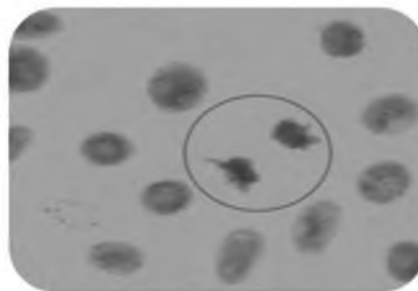
Вивчення цитотоксичного впливу препаратів проводили на клітинах кореневої меристеми *A. Серов L.* (*Allium* - тест) із використання програмного забезпечення Image-ProPremier 9.0 (USA), що дозволило визначити середній розмір клітин під час поділу.

Було встановлено, що препарат Nano-Gro в дозі, яка рекомендована для виробництва, не справляв токсичної дії на клітини меристеми. Однак, збільшення дози в 2 рази призвело до зменшення розмірів клітин на 10,9 % відносно контролю. На відміну від Nano-Gro, застосування препарату Аватар-1 навіть в рекомендованій дозі призвело до зменшення розміру клітин на 14,1 % щодо контролю (табл. 1).

В основу екоотоксикологічної характеристики препаратів нами було покладено класичні підходи В. Шелфорда [8], а саме реакцію організмів-стенобіонтів на такий



Контроль

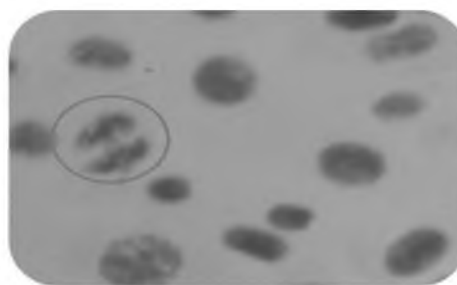


Аватар – 1 (1РД)

Рис. 2. Мітотичний поділ клітин *Allium сера L.* під впливом препарату Аватар-1



Контроль



Nano-Gro (1РД)

Рис. 3. Мітотичний поділ клітин *Allium сера L.* під впливом препарату Nano – Gro

Таблиця 1

Вплив нанопрепаратів на розмір клітин меристематичної тканини *A.сера L.*

Варіант досліджу	Діаметр клітин, мкм	До контролю, %
Вода (контроль)	9,2±0,28	-
Nano-Gro – 1 РД	9,5±0,29	3,3
Nano-Gro - 2 РД	8,2±0,46	-10,9
Аватар-1 – 1 РД	7,9±0,40	-14,1
Аватар-1 – 2 РД	7,8±0,40	-15,2

лімітуючий чинник як концентрація речовини. Згідно чинної класифікації, показник відхилення від контролю (еталону) дає всі підстави віднести препарати Аватар-1 та Nano-Gro до класу «помірно небезпечних» (табл. 2).

Вивчення впливу наноагрохімікатів на популяційно-му рівні водної системи проводили за використанням стандартизованого методу біотестування на церіодафніїх (*Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg).

За результатами дослідження було встановлено, що застосування препарату Аватар-1 у всіх концентраціях призвело до 100% загибелі материнських особин церіодафній. Препарат Nano-Gro в рекомендованій дозі призвів до загибелі 78 % материнських особин, однак, збільшення дози застосування супроводжувалося зменшенням кількості загиблих материнських особин церіодафній (44 %). Препарат Nano-Gro знижував кількість життєздатних дочірніх особин та кількість повторно закладених самкою яєць порівняно з контролем. Проте, токсична дія Nano-Gro була значно меншою в порівнянні з препаратом Аватар-1. Застосування останнього, особ-

ливо у підвищеній дозі - 4РД (концентрація 1,00 мг/дм³), призводило до таких явищ як загибель самки, народження мертвих потомків, викидання яєць на різних стадіях розвитку, народження потомків з недорозвинутим панциром тощо (табл. 3).

Оскільки застосування препарату Аватар-1 у рекомендованій дозі (50 мг/га) призвело до 100 % загибелі самок церіодафній, подальше встановлення середньо летальної концентрації LC₅₀ було недоцільним. Для оцінки екоотоксичного впливу препарату Nano-Gro на церіодафнії було визначено LC₅₀ за 96 годин, вона склала 1,5 мг/дм³ (що відповідає дозі внесення 300 мг/га) (рис. 4).

За величиною медіанно-летальної концентрації встановлюється клас небезпечності препарату (табл. 4).

Згідно чинної класифікації, найменша концентрація препарату Аватар-1 0,25 мг/дм³ призвела до 100 % загибелі церіодафній (LC₁₀₀ ≤ 0,25 мг/дм³), що дає всі підстави віднести його до класу «надзвичайно небезпечні». Для препарату Nano-Gro LC₅₀ становила 1,5 мг/дм³, що дозволяє віднести цей препарат до класу «небезпечні».

Таблиця 2

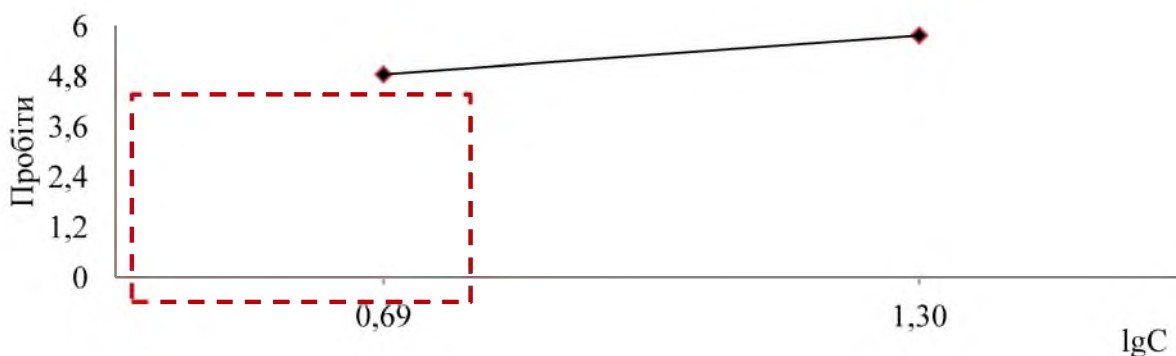
Класифікація екоотоксичності нанопрепаратів за показниками відхилення від контролю

Відхилення від контролю у сторону погіршення показників	Клас небезпечності
51–100 %	Надзвичайно небезпечні
25–50 %	Небезпечні
10–25 %	Помірно небезпечні
<10 %	Мало небезпечні

Таблиця 3

Вплив наноагрохімікатів на популяцію *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg

Варіант досліджу	C, мг/дм ³	Живі материнські особини, шт/% загиблих
Контроль	-	18/10
Nano-Gro	0,50	4/78
	2,00	10/44
Аватар-1	0,25	0/100
	1,00	0/100

Рис. 4. Встановлення середньо-летальної концентрації (LC₅₀) для церіодафній за впливом препарату Nano-Gro

Класифікація нанопрепаратів за показниками гострої токсичності для водних організмів

Клас небезпечності	LC ₅₀ , мг/дм ³
Надзвичайно небезпечні	≤ 1,0
Небезпечні	1,1—10,0
Помірно небезпечні	10,1—100,0
Мало небезпечні	> 100

Висновки. Екотоксикологічна оцінка небезпеки наноагрохімікатів не повинна ґрунтуватися лише на вивченні залежності «доза-ефект» на рівні організму і популяції, вона повинна включати дослідження токсичного процесу, починаючи з рівня клітини та її органел.

Агрохімікати, які містять у своєму складі наночасточки, здатні викликати цитотоксичний ефект, який проявляється у зміні мітотичної активності, порушення структури хромосом, пошкодженням мітотичного веретена (веретена поділу), що свідчить про можливі екологічні ризики під час їх застосування та викликає необхідність більш глибоких екологічних досліджень під час державних випробувань наноагрохімікатів для уникнення негативного впливу на біоту біогеоценозів.

Література

1. Проданчук Н.Г. Нанотоксикология: состояние и перспективы исследований / Н.Г. Проданчук, Г.М. Балан // Современные проблемы токсикологии — 2009, №3 — 4. — С. 4-18.
2. Онищенко Г.Г. Концепция токсикологических исследований, методология оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов / Г.Г. Онищенко, Б.Г. Битько, В.И. Покровский, А.И. Потапов. Электронный ресурс: <http://www.nanonewsnet.ru/blog/nikst/kontseptsiya-toksikologicheskikh-issledovani-nanomaterialov>.
3. Москаленко В. Ф. Екологічні і токсиколого-гігієнічні аспекти біологічної безпеки нанотехнологій, наночастинок та наноматеріалів / В.Ф. Москаленко, О. П. Яворовський // Науковий вісник Національного медичного університету. — 2009. — № 3. — С. 25-35.
4. Гусев А. И. Наноматериалы, наноструктуры, нанотехнологии / А.И. Гусев. — М.: Физматлит, 2007. — 416 с.
5. Toxic potential of material satthe nano level / A. Nel, T. Xia, L. Madler [etal.] // Science. - 2006. - Vol. 311, № 5761. - P. 622-627.

6. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений.- 4 - е изд., перераб. и доп. — М.: Агропромиздат, 1988. — 271 с.
7. Якість води. Визначання гострої летальної токсичності на *Daphnia magna* Straus та *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (Cladocera, Crustacea) (ISO 6341:1996, MOD): ДСТУ 4173-2003. — [Чинний від 2004-07-01].- К.: Держспоживстандарт України, 2004, с. 17.
8. Білявський Г.О., Бутченко Л.І., Навроцький В.М. Основи екології: теорія та практикум. Навчальний посібник.-К.: Лібра, 2002.- 352 с.

References

1. Prodanchuk N.G. Nanotoxicology: state and prospects of researches / N.G. Prodanchuk, G.M. Balan // Modern problems of toxicology - 2009, №3 -4. - P. 4-18.
2. Onishchenko G.G. Concept of toxicological studies, methodology of risk assessment, methods for identifying and quantifying of nanomaterials / G.G. Onishchenko, B.G.Bitko, V.I.Pokrovsky, A.I. Potapov. Source: <http://www.nanonewsnet.ru/blog/nikst/kontseptsiya-toksikologicheskikh-issledovani-nanomaterialov>.
3. Moskalenko V.F. Environmental and toxicological-hygienic aspects of biological safety of nanotechnology, nanoparticles and nanomaterials / V.F. Moskalenko, O.P. Yavorovsky // Scientific Journal of the National Medical University. - 2009. - № 3. - P. 25-35.
4. Gusev A.I. Nanomaterials, nanostructures, nanotechnologies / A.I. Gusev. - M.: FIZMATLIT, 2007. - 416 p.
5. Toxic potential of material satthe nano level / A. Nel, T. Xia, L. Madler [etal.] // Science. - 2006. - Vol. 311, № 5761. - P. 622-627.
6. Pausheva Z.P. Practical course on plant cytology.- 4 - ed., rev. and add. - M: Agropromizdat, 1988. - 271 p.
7. Water quality. Determination of acute lethal toxicity on *Daphnia magna* Straus and *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (Cladocera, Crustacea) (ISO 6341: 1996, MOD): ISO 4173-2003. - [Effective as of 2004-07-01].- K.: State Committee of Ukraine, 2004, p. 17.
8. Bilyavskaya G.A., Butchenko L.I., Navrotskyi V.M. Fundamentals of ecology: theory and practical. Teaching Manual.-K.: Libra, 2002.- 352 p.



Rich educational traditions - modern level of training

Uman National University of Horticulture is a scientific centre of modern agricultural education in Ukraine.

Since the establishment of the educational institution the agriculture has received more than 40 thousand highly qualified specialists, including 32 academicians, 700 doctors of sciences and more than two thousand candidates of sciences.

Now more than 5,500 students are studying at six faculties. There are 13 under-graduate degree programmes and 19 specialties. 363 members of the teaching staff, including 26 doctors, 34 professors and 221 candidates of sciences, 155 associate professors, provide the learning process. The Institute for Post-Diploma Education and Extension Services provides retraining of specialists and consultation services to agricultural producers.

**Educational offer
Faculties:**

- Horticulture, Ecology and Plant Protection
- Agronomy
- Economics & Entrepreneurship
- Management
- Engineering and Technology
- Forestry and Landscape Gardening

Specializations:

- Horticulture and Viticulture
- Agronomy
- Crop Breeding and Genetics
- Plant Protection
- Greenhouse Technologies
- Ecology and Environmental Protection
- Business Economics
- Marketing
- Finance and Crediting
- Accounting and Auditing
- Management of Organization and Administration
- Management of Foreign Economic Activity
- Technology of Grain Storing and Processing
- Technology of Storing, Preserving and Processing of Fruits and Vegetables
- Processes, Machinery and Equipment of Agricultural Production
- Forestry
- Landscape Gardening
- Tourism
- Hotel and Catering Business