

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GAMTOS TYRIMŲ CENTRO BOTANIKOS INSTITUTAS

Brigita Gylytė

VARIO OKSIDO NANODALELIŲ SUSPENSIJŲ SUKELIAMAI BIOLOGINIAI  
EFEKTAI *NITELLOPSIS OBTUSA* (DESV.) J. GROVES LĄSTELĖMS

Daktaro disertacija  
Biomedicinos mokslai, botanika (04 B)

Vilnius, 2015

Disertacija rengta 2010–2014 metais Gamtos tyrimų centro Botanikos institute.

**Mokslinis vadovas:** dr. Levonas Manusadžianas (Gamtos tyrimų centro Botanikos institutas, biomedicinos mokslai, botanika – 04 B).

## TURINYS

ĮVADAS .....	6
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	11
1.1. Nanomedžiagos ir jų patekimas į aplinką.....	11
1.2. Nanomedžiagų toksikologiniai efektai .....	13
1.3. <i>Charophyceae</i> dumbliai fiziologiniuose ir ekotoksikologiniuose tyrimuose .....	18
2. METODIKA .....	21
2.1. Augalinės medžiagos paruošimas.....	21
2.2. CuO nanosuspensijų dalelių dydžių matavimas .....	21
2.3. CuO nanosuspensijų gamyba biologiniams tyrimams.....	22
2.4. Dumblių letalumo tyrimai.....	23
2.4.1. Letaliosios koncentracijos (LC <sub>50</sub> ) nustatymas.....	23
2.4.2. Mirtingumo kinetika, letaliosios ekspozicijos trukmės (LED <sub>50</sub> ) ir poveikio slenksčio nustatymas .....	23
2.5. <i>N. obtusa</i> ląstelių ramybės potencialų matavimas ir elektrofiziologinių tyrimų eiga .....	24
2.6. H <sup>+</sup> -ATPazių aktyvumo mikrosominėje frakcijoje tyrimai .....	27
2.7. Vario kiekio ląstelėse nustatymas.....	27
2.8. Ląstelių fracionavimas.....	29
2.9. Vario identifikavimas <i>N. obtusa</i> ląstelėse skenuojančiu elektroniniu mikroskopu (SEM) .....	31
2.10. nCuO disociacijos tyrimai .....	32
2.11. Statistinė duomenų analizė .....	33
3. REZULTATAI .....	33
3.1. CuO nanosuspensijų charakterizavimas .....	33
3.1.1. Nanodalelių dydžio skirstinių priklausomybė nuo suspensijos koncentracijos ir sonifikavimo.....	33
3.1.2. CuO nanodalelių nusėdimo suspensijoje greitis.....	35
3.1.3. Terpės sudėties ir pH įtaka suspensijos fiziniams parametrams.....	36

3.3. nCuO įtaka <i>N. obtusa</i> ląstelių mikrosomų frakcijos membranų funkciniam aktyvumui .....	40
3.4. nCuO suspensijų įtaka ląstelių mirtingumui.....	42
3.4.1. Sonifikavimo įtaka nanosuspensijų toksiškumui.....	42
3.4.2. Poveikio trukmės įtaka <i>N.obtusa</i> ląstelių mirtingumui.....	42
3.5. Vario kaupimasis <i>N. obtusa</i> ląstelėje ir jos dalyse .....	47
3.5.1. Vario kaupimasis dumblių ląstelėje.....	47
3.5.2. Vario kaupimasis atskiruose ląstelės kompartmentuose.....	49
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	56
IŠVADOS .....	64
LITERATŪRA .....	66

## SANTRUMPOS

APW	kontrolinis (mitybinis) tirpalas ( <i>angl.</i> artificial pond water)
$\Delta\mu\text{H}^+$	nuo ATP priklausomas transmembraninis elektrocheminis potencialas;
IC <sub>50</sub>	slopinančioji (inhibavimo) koncentracija, sukianti 50% testuojamų ląstelių ramybės potencialo depoliarizaciją, t.y. ląstelių RP vidurkio 50% sumažėjimą veikiant tiriamuoju tirpalu,
ICP OES	indukuotos plazmos optinės emisijos spektrometras(spektrometrija);
KDP	kalio difuzinis potencialas;
LC <sub>50</sub>	toksikanto koncentracija, sukianti 50% testuojamų ląstelių žūtį;
LED <sub>50</sub>	ekspozicijos trukmė, kurios pakanka, kad, ląsteles perkėlus į kontrolinę terpę, būtų sukeltas 50% ląstelių mirtingumas;
MES	buferinis tirpalas, 2-(N-morfolino)etansulfoninė rūgštis;
nCuO	vario oksido nanodalelės;
RP	ląstelės ramybės potencialas;
SEM	skenuojantis elektroninis mikroskopas;
SM	sausoji masė;
TEM	transmisinis elektroninis mikroskopas.

## IVADAS

Bendru sutarimu nanomedžiagoms priskiriamos cheminės struktūros, kurių bent vienas matmuo yra nuo 1 iki 100 nm (HANDY et al., 2008). Su nanotechnologijomis susijusios ūkio sritys – elektronika ir chemijos pramonė (pvz., kompleksinės dažų dangos automobilių pramonėje); biomedicina ir farmacija, kai dėl palankaus paviršiaus ploto ir masės santykio nanodalelės panaudojamos kaip katalizatoriai ar dėl savo ypatingos erdvinės atomų konglomeratų struktūros – kaip vaistų nešikliai; aplinką tausojančios technologijos (saulės baterijos) ir, pagaliau, plataus vartojimo sfera – apsauginių kremų gamyba ir kosmetika. Taigi, tiek dėl nekontroliuojamų priežasčių, tiek gamyboje dabar ir dėl ateityje numatomo nanomedžiagų pramonės augimo esama pavojaus, kad nemažai nanodalelių papildomai toms, kurios susidaro gamtoje degant miškams ar po vulkanų išsiveržimų, pateks į hidrosferą, taip pat ir per pramonines bei municipalines nuotekas. Duomenys apie nanojunginių poveikį žmogaus organizmui sistemingai kaupiami kelis dešimtmečius (GEISER et al., 2005; OBERDOERSTER et al., 2005), tuo tarpu duomenų apie vandens biotos nanotoksikologiją esama santykinai nedaug (BLAISE et al., 2008).

Pastaruoju metu, sprendžiant iš publikacijų, atkreiptas dėmesys į metalinių ar metalo oksido nanodalelių sukeltus toksinius efektus įvairiems vandens organizmams. Tarp jų didesnė dalis tyrinėjimų tenka gyvūniniams objektams, vėžiagyviams ir žuvims, ir tik nedidelė – fitotoksiškumo tyrimams. Metalinių nanojunginių sukelti toksikologiniai efektai grindžiami dviem veikimo mechanizmais – pirmas, kai visi stebimi poveikiai yra siejami su pačių nanodalelių, pvz., CuO, tirpumu tam tikroje terpėje paskleidžiant Cu jonus (pvz., HEINLAAN et al., 2008; ARUOJA et al., 2009), ir antras, kai ekotoksiškumo efektai siejami tik arba bent tam tikra dalimi su pačių nanodalelių veikimu (GRIFFITT et al., 2008; MANUSADŽIANAS et al., 2012; PERREAULT et al., 2012). Tiriant dumblių

ląstelių atsaką yra koncentruojamasi į ląstelės sienelės, kaip nanodalelių kaupiklio ir toksiškumo mediatoriaus vaidmenį. VAN HOECKE et al. (2008) pabrėžia žaliadumblių *Pseudokirchneriella subcapitata* ląstelės sienelės svarbą ląstelei sąveikaujant su nanodalelėmis. Kita vertus, skelbiama, kad ne vario jonai, o būtent viduląstelinėje terpėje susikaupę vario nanodalelės ar jų agregatai yra atsakingi už toksinį poveikį aukštesniesiems augalams *Phaseolus radiatus* ir *Triticum aestivum* (LEE et al., 2008). Pagaliau, remiantis žmogaus ląstelių linijos tyrimais, teigiama, kad jose nCuO sukeliama toksiškumo priežastis yra abu minėti poveikio mechanizmai – tiek nanodalelių *per se*, kurios aptiktos įvairiuose ląstelių kompartmentuose, tiek ir dėl vario jonų atsiradimo nanodalelėmis irstant lizosomose (MOSCHINI et al., 2013). Taigi, šiuo metu nCuO poveikio mechanizmo aspektai nėra pakankamai atskleisti.

Šiuo darbu siekiama ištirti CuO nanodalelių suspensijų toksikologinio poveikio ypatybes gėlavandenių dumblių *Nitellopsis obtusa* ląstelėms, registruojant jų atsakus įvairiuose biologinio organizuotumo lygmenyse ir palyginant su vario druskų tirpalų poveikiu. Taip pat, – išnaudojant menturdumblio ląsteles, kaip unikalų tyrimo objektą su aiškia pagrindinių kompartmentų lokalizacija, ištirti vario pasiskirstymą ląstelėje veikiant CuO nanodalelių suspensijoms.

### **Tyrimų hipotezė**

Vario oksido nanodalelių suspensijos toksinis poveikis *Nitellopsis obtusa* ląstelei pobūdis negali būti paaiškinamas vien terpėje esančių ir su ląstelės sienele susijusių CuO nanodalelių disociacija.

### **Tyrimo tikslas**

Ištirti CuO nanodalelių suspensijų toksikologinio poveikio ypatybes gėlavandensio dumblio *Nitellopsis obtusa* ląstelėms ir palyginti jas su CuSO<sub>4</sub> tirpalo poveikiu.

### **Tyrimo uždaviniai**

1. Ištirti nCuO suspensijų, pagamintų menturdumblių kontroliniame tirpale, stabilumą.
2. Ištirti nCuO suspensijomis paveiktų *N. obtusa* ląstelių membranos ramybės potencialo ir iš tų pačių ląstelių išskirtos mikrosomų frakcijos  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ -ATPazinio aktyvumo, nuo ATP priklausomo protonų elektrocheminio potencialo bei kalio difuzinio potencialo pokyčius palyginant juos su vario druskų tirpalų poveikiu.
3. Ištirti ir palyginti trumpalaikės ekspozicijos vario druskų tirpaluose arba vario oksido nanosuspensijose įtaką menturdumblių ląstelių žuvimo kinetikai.
4. Ištirti vario kaupimąsi menturdumblių ląstelėje ir atskirose jos dalyse – sienelėje, citoplazmoje ir vakuolėje, veikiant skirtingoms vario cheminėms formoms.

### **Disertacijos ginamieji teiginiai**

1. Ląstelės sienelė per trumpą, kelių sekundžių trukmės, ekspoziciją vario oksido nanosuspensijoje gali sukaupti vario kiekį, pakankamą sukelti ląstelių mirtingumą, kuris pasireiškia po kelių dienų ar mėnesių.
2. Jei eksponuojant menturdumblių ląsteles CuO nanosuspensijoje arba vario druskos tirpale ląstelėse susikaupia panašios toksinės vario koncentracijos, greita (po keliolikos minučių) ląstelės membranos depoliarizacija pasireišk tik vario druskų tirpalo poveikio atveju, tačiau vėliau mirtingumą sukels tiek vienas, tiek kitas poveikis.
3. Per 3-ų valandų *N. obtusa* ląstelių ekspoziciją vario oksido nanodalelių suspensijoje daugiau nei 60 % asocijuoto su ląstele Cu susikaupia sienelėje, o didžioji viduląstelinio Cu dalis (apie 80 %) aptinkama citoplazmoje.



### **Mokslinio darbo naujumas.**

1. Pirmą sykį tirtas menturdumblio *N. obtusa* ląstelių atsakas įvairiuose biologinio organizuotumo lygmenyse, ląstelės membranos elektrofiziologinės reakcijos ir mikrosomų frakcijos H<sup>+</sup>-ATPazinio aktyvumo bei ląstelės išgyvenamumo, veikiant CuO nanodalelių suspensijoms terpėje, chemiškai artimoje gamtiniams vandenims.
2. Pirmą kartą tirtas sukauptų CuO nanodalelių pasiskirstymas *N. obtusa* ląstelės kompartmentuose – sienelėje, chloroplastuose, citoplazmoje ir vakuolėje.
3. Nustatyta itin trumpa, nuo kelių sekundžių iki kelių minučių trukmės, ekspozicija vario druskų tirpale arba vario oksido nanosuspensijoje, sukianti ląstelių žūtį po kelių dienų ar net mėnesių.

### **Praktinė darbo reikšmė.**

Ištirtas technologiškai svarbaus cheminio junginio, vario oksido nanodalelių poveikumas žvaigždėtojo maurašakio, kuris yra reikšmingas gėlavandenių producentų atstovas, ląstelėms. Šis junginys, nors mažai vandenyje tirpus, gali susikaupti vandens organizmuose ir sukelti toksikologines pasekmes. Gauti rezultatai įrodo vandens taršos šiomis nanodalelėmis potencialų pavojingumą, todėl į juos turi būti atsižvelgta aplinkos kontrolės reikalavimuose.

### **Darbo aprobavimas ir publikacijos.**

Disertacinio darbo tyrimo rezultatai pristatyti ir aprobuoti 1 Lietuvos ir 5 tarptautinėse mokslinėse konferencijose. Disertacijos tyrimų rezultatai paskelbti dviejuose moksliniuose straipsniuose – vienas jų išspausdintas referuojamame ir turinčiame citavimo indeksą Mokslinės informacijos instituto (MII) duomenų bazėje *ISI Web of Science*, kitas – referuojamame MII duomenų bazėje *ISI Master List* leidinyje, neturinčiame citavimo indekso.

## **Darbo apimtis ir struktūra.**

Disertacijoje yra 81 puslapis. Disertaciją sudaro Santrumpos, Įvadas, Literatūros apžvalga, Tyrimų medžiagos ir metodai, Tyrimų rezultatai bei Diskusija, Autoriaus publikacijų sąrašas disertacijos tema. Disertacija iliustruota 26 paveikslais, pateikiamos 2 lentelės. Disertacija parašyta lietuvių kalba, santrauka – anglų kalba.

## **Padėka**

Nuoširdžiai dėkoju savo mokslinio darbo vadovui dr. Levonui Manusadžianui už mokslines idėjas, patarimus, konsultacijas ir pagalbą atliekant mokslinius tyrimus bei rengiant disertacijos rankraštį. Už konsultacijas planuojant darbus bei rengiant disertaciją kuo nuoširdžiausias dėkui doc. dr. Kaziui Sadauskui, dr. Rimantui Vitkui bei dr. Sigitai Jurkonienei. Visą darbo laiką buvusiems šalia laboratorijos kolegoms – dr. Alinai Krevš, dr. Alei Kučinskienei, Marytei Šimelionytei ir dr. Rolandui Karitonui. Taipgi dėkoju Chemijos instituto m. d., dr. Jūratei Vaičiūnienei už galimybę atlikti cheminę mėginių analizę. Gamtos tyrimų centro Giluminės geologijos laboratorijos darbuotojams dr. Gražinai Skridlaitei, dr. Rimantui Petrošiui ir Laurynui Šiliauskui už suteiktą galimybę ir pagalbą dirbant skenuojančiu elektroniniu mikroskopu, Augalų fiziologijos laboratorijos inžinierei Nijolei Bareikienei už pagalbą eksperimentiniuose darbuose, algologijų kolektyvui – dr. Jūratei Kasperovičienei, dr. Jūratei Karosienei, dr. Juditai Koreivienei, ir dr. Irmui Vitonytei už nuolatinį palaikymą ir motyvavimą.

*Merci beaucoup* Prancūzijos Nancy universiteto Aplinkos ir minerologijos laboratorijai už atliktus nanodalelių dydžių matavimus.

Dėkoju Lietuvos Mokslo tarybai už suteiktą paramą, pagaliau – ir visiems puikiems žmonėms, buvusiems šalia manęs visą doktorantūros laikotarpį.

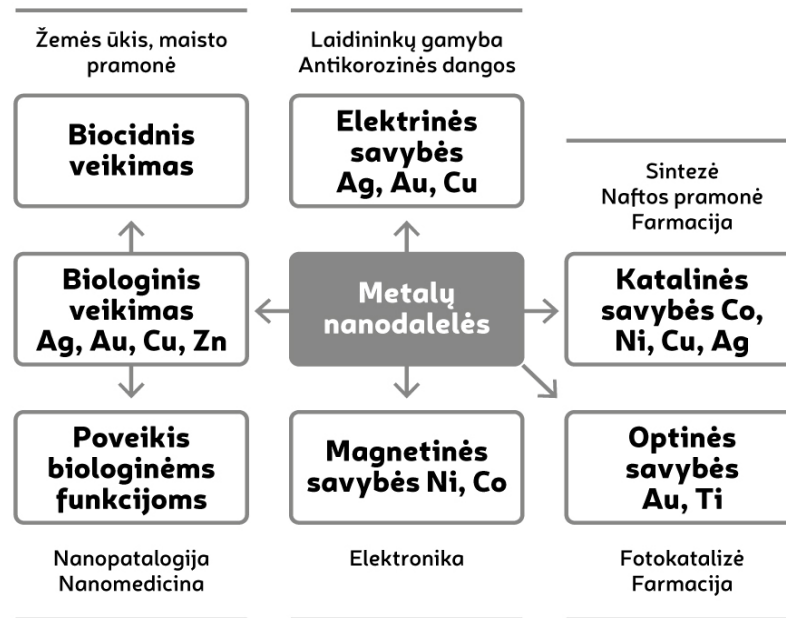
# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Nanomedžiagos ir jų patekimas į aplinką

Bendru sutarimu nanomedžiagoms priskiriamos cheminės struktūros, kurių bent vienas matmuo yra nuo 1 iki 100 nm (HANDY et al., 2008). Dažnai tai gamtoje egzistuojančios natūralios medžiagos, bet plačios komercinio panaudojimo galimybės paskatino dirbtinių nanomedžiagų gamybą (BHATT ir TRIPATHI, 2011). Nanotechnologijomis naudojasi įvairios ūkio sritys – elektronika ir chemijos pramonė, biomedicina ir farmacija bei kitos, kuriose nanodalelės naudojamos dėl joms būdingo ir palankaus paskirčiai paviršiaus ploto ir masės santykio. 2008 m. pabaigoje apie 800 produktų, kuriuos patys gamintojai įvardijo kaip pagrįstus nanotechnologijomis, buvo laisvai platinami rinkoje. Šiuo metu kiekvieną savaitę į rinką pateikiami vidutiniškai 3–4 nauji nanotechnologijomis pagrįsti produktai, t. y. nanotechnologijomis pagrįsti produktai yra gana plačiai prieinami vartotojams. (KIŠKIS, 2010). Nanodalelės panaudojamos kaip katalizatoriai ar kaip vaistų nešikliai dėl savo ypatingos erdvinės atomų konglomeratų struktūros; aplinką tausojančioms technologijoms (saulės baterijose), kompleksinėms dažų dangoms (automobilių pramonėje) ir, pagaliau, plataus vartojimo sferoje – apsauginių kremų gamybai ir kosmetikai. Plečiantis nanomedžiagų panaudojimo galimybėms, kartu plečiasi ir jų gamybos bei vartojimo mastai. (Pav. 1.1).

Vario oksido nanodalelės (nCuO) įeina į metalinių dangų bei jų dažų sudėtį (TURNER, 2010), jos naudojamos baterijų bei jų daviklių gamyboje (YANG et al., 2012; ZHANG et al., 2014), net medicinoje, kaip gydymo antibiotikais alternatyva (SCHRAND et al., 2010), nes nCuO yra viena iš populiariausių antibakterinėmis savybėmis pasižyminčių nanomedžiagų (GOMES et al., 2011). Su nanomedžiagomis gaminami pesticidai bei antimikrobinės medžiagos, jos tinka

tekstilės, maisto, sandėliavimo konteinerių, buitinės technikos, dažu, maisto papildų ir t.t. gamyboje (MAYNARD et al., 2006).



**1.1 pav.** Metalinių nanodalelių savybės ir jų panaudojimo sritys (pagal SOLOVJOV, 2014).

Lietuvoje pramoniniu būdu gaminami dujų jutikliai, skirtais degimo procesui kontroliuoti. Sukurta nanoklasterių auginimo lazerinio garinimo būdu technologija (VAITKUS, 2003). Diegiamos nanotechnologijos maisto žaliavų perdirbimo srityje (VENSKUTONIS, 2013). Sparčiai vystosi tyrimai nanomedicinos bei farmacijos srityse, kuriamos naujos diagnostinės technologijos: panaudojant aukso nanodaleles sukurtas gliukozės biosensorius (GERMANA et al. 2015), vėžinių ląstelių žymėjimui panaudotos deimanto nanodalelės (VAITKUVIENE et al. 2015). Atliekami tyrimai, kaip panaudoti aukso nanodaleles gydyti artritą (LEONAVIČIENĖ et al. 2013).

Plečiama gamyba bei panaudojimas kelia riziką, kad nanojunginiai pateks į gamtinę aplinką, kur nekontroliuojamai galės sąveikauti su biotiniaisiais bei abiotiniaisiais aplinkos komponentais. 2010 metais pasaulyje buvo pagaminta

maždaug 260 000–300 000 tonų metalinių nanodalelių, iš kurių, kaip prognozuojama, 63–91% anksčiau ar vėliau atsidurs sąvartynuose, o iš jų 8–28% palaispniui pateks į dirvožemį, 0,4–7 % – vandens telkinius, 0,1–1,5% atmosferą (KELLER et al., 2013). Nanodalelėmis gali būti užterštos nuotekos (BLAISE et al., 2008). Kaip pažymėta „nanoECO“ konferencijoje Askonoje (2009), jau esama tyrimais patvirtintų duomenų apie statybose naudojamų dažų, kurių sudėtyje yra TiO<sub>2</sub> turinčių pigmentų, išsiplovimą nuo pastatų sienų ir patekimą nanodalelių pavidaļu į gamtinius vandenis (KAEGI et al., 2008). Nuotekose ir nuotekų valymo įrenginiuose rastos 5–15 μg L<sup>-1</sup> titano nanodalelių koncentracijos (KISER et al. 2009).

Kartu su kitais nanojunginiais nCuO papuola į aplinką, kaip kietosios dalelės iš metalo liejyklų, yrančio asfaltuoto paviršiaus, dylant padangoms (Midander et al., 2007). 2010 metų duomenimis, pramoniniu būdu pagaminama apie 200 tonų nCuO per metus (KELLER et al., 2013), tad dalis šių nanodalelių patenka į vandenį ir kelia grėsmę vandens organizmams (LI et al., 2015; ZHAO et al., 2011). Be to, nCuO gali kauptis vandens organizmuose, bei būti perduodamas į aukštesnius trofinius lygmenis tuo sukeldamas pavojų gyvūnų ir žmonių sveikatai (SHAW et al., 2012).

## **1.2. Nanomedžiagų toksikologiniai efektai**

Šiuo metu gausiai skelbiami nauji faktai apie atskirų žinduolių organų vaidmenį kaupiant ir šalinant nanodaleles, atskleidžiami jų veikimo mechanizmai žmogaus ląstelių gyvybingumui ir fiziologijai (GEISER et al., 2005; OBERDOERSTER et al., 2005), tiriamas nanodalelių šalinimo mechanizmas pelėms (SADAUSKAS et al., 2009).

Patekusios į žinduolių ląsteles nanodalelės dažniausiai randamos endosomose ir lizosomose (IVERSEN et al. 2009). Nanodalelės įprastai patenka į ląsteles receptoriais reguliuojamos endocitozės būdu, patekusios į endosomas yra pernešamos endosomų brandos keliu ir galiausiai lizosomose suskaidomos. Endocitozės kelias ir nanodalelių sukelti efektai ląstelėje labai priklauso nuo jų

paviršiaus savybių, ypač nuo krūvio (LUNDQVIST et al., 2008; PARK et al., 2011). Patekusios į ląsteles nanodalelės gali sukelti DNR ir mitochondrijų pažaidas, ląstelėje suaktyvėja reaktyviųjų deguonies formų gamyba, kinta ląstelių metabolinis aktyvumas (ASHARANI et al., 2009, LIMBACH et al., 2007).

nCuO yra galingas citotoksinas, kurio toksiškumas tiesiogiai pasireiškia nuo koncentracijos ir poveikio trukmės. Patekęs į žmogaus alveolių epitelio ląsteles A549 inhibuoja mitochondrijų ir lizosomų funkcijas, sukelia citoplazmos degradaciją, plazminės membranos pažaidas ir ląstelių nekrozę (MOSCHINI et al., 2013).

Sausumos augalus nanodalelės veikia nevienodai. Dalyje eksperimentų toksinis poveikis augalams nenustatytas, kai kuriuose – toksinis poveikis nėra itin didelis, o kitiems augalams pasireiškia ryškūs toksiniai efektai. Pavyzdžiui, paveikus sidabro nanodalelėmis sorgus (*Sorghum bicolor*) ir pupeles (*Phaseolus radiata*), pastebėtas augimo slopinimas (LEE et al., 2012), ryžius (*Oryza sativa*) – ryškūs morfologiniai augalo pakitimai, šaknų apmirimas (MIRZAJANI et al. 2013), o dirvožemyje esant 4,51 mg kg<sup>-1</sup> sidabro nanodalelių jos pateks į salotas (*Lactuca sativa*) per 60 parų ir sudarys 0,02% sausos masės, bet nesukels jokių ženklių biomasės prieaugio ar morfologinių pakitimų (DOOLETTEA et al., 2015).

Nustatyta, kad nanodalelės gali migruoti augale, pačios visiškai nepakisdamos. Titano oksido nanodalelės buvo aptiktos agurkų vaisiuose, po 150 dienų nuo pasėjimo į 750 mg kg<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub> užterštą dirvožemį (SERVIN et al., 2013).

Tyrimai rodo, kad į augalus nanodalelės gali patekti ir per lapus. Buvo parodyta (EICHERT et al., 2008), kad 43 nm skersmens polistireno nanodalelės pateko į pupų (*Vicia faba*) lapus, o didesnės dalelės (1.1 μm) negalėjo praeiti pro lapų žiotelės. Taipgi nustatyta (CORREDOR et al., 2009), kad anglimi dengtos geležies nanodalelės galėjo prasiskverbti į moliūgų (*Cucurbita pepo*) lapus ir toliau migruoti į kitus augalo audinius. WANG et al. (2013) nustatė, kad TiO<sub>2</sub>, MgO, ZnO ir Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanodalelės, kurių skersmuo mažesnis nei 100 nm, patekusios pro arbūzo (*Citrullus lanatus*) lapų žiotelės migruoja į augalo stiebą ir

šaknis. Sidabro nanodalelės gali patekti į salotos (*L. sativa*) lapus, kai šie paveikiami 100 g (g augalo gyvo svorio)<sup>-1</sup> suspensija (LARUE et al., 2014). Vienas iš pagrindinių toksinių poveikių, kurį nanodalelės sukelia augalams – tai augalinės ląstelės sienelės ir membranos pažeidimas. Dideliais kiekiais ant ląstelės sienelės absorbuotos nanodalelės gali sumažinti maisto medžiagų patekimą į ląstelės vidų, nanodalelės pažeidžia augalų ląsteles, sutrikdydamos dujų apykaitą (HONG et al., 2015). Taip pat, toksinis nanodalelių poveikis pasireiškia reaktyviojo deguonies kiekio ląstelėje padidėjimu (REGIER et al., 2015).

Eksperimentiškai patvirtinti šie patekimo į ląstelę mechanizmai:

1) nanodalelės gali patekti į ląsteles mechaniškai pažeisdamos ląstelės membranas, pavyzdžiui sidabro nanodalelės sužadina bakterijos *Escherichia coli* membraną, padidėja membranos poringumas ir pralaidumas nanodalelėms (PAL et al., 2007);

2) nanodalelių fagocitozė bei endocitozė (BAUER, 2008);

3) nanodalelių prasiskverbimas pro ląstelių membranas difuzijos būdu (DUNCAN, 2006).

Ekotoksikologinių duomenų apie nanomedžiagų poveikį hidrobiontams tėra mažai (BLAISE et al., 2008). Negausūs duomenys apie nanomedžiagų toksiškumą rodo, kad kai kurie jų, ir neorganinės, ir organinės kilmės, yra nuodingi vandens organizmams. Situaciją komplikuoja tai, kad net ir vandenyje netirpūs cheminiai junginiai būdami nanoformose gali iš dalies disocijuoti į jonus. Toksiškumo požiūriu, nanodalelių disociacija vaidina dvejopą vaidmenį. Nors labiau tirpios metalų dalelės, pavyzdžiui, ištirpusių metalo jonų pavidalu, gali prisidėti prie didesnio toksinio poveikio, labiau stabilios metalų oksidų nanodalelės gali ilgiau užsilikti biologinėse sistemose ir tokiu būdu kauptis tiek organizmuose, tiek ir aplinkoje (MIDANDER et al., 2007). Taigi, metalinių dalelių toksinį poveikį sąlygoja mažiausiai dviejų rūšių veiksniai: disocijavę metalo jonai ir pačios nanodalelės (AUFFAN et al., 2009). Abu nanotoksiškumo efektai glaudžiai siejami su metalinių nanodalelių suspensijos fizinėmis ir cheminėmis savybėmis (HANDY

et al., 2008). Pavyzdžiui, veikiant  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  koncentracijos CuO nanodalelių suspensiją ultragarsu joje disocijuoja  $0,24 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  vario jonų (LEE et al., 2008). Tokia vario jonų koncentracija jau gali būti toksiška daliai vandens organizmų. Pavyzdžiui, ji sukeltų toksinį poveikį vienaląsčiams dumbliams (*Selenastrum capricornutum*), nes 72 val. augimo slopinimą sukeltanti vario jonų koncentracija  $\text{IC}_{50} = 0,04 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (PERSOONE, 1998), makrofitiniams dumbliams (*Nitellopsis obtusa*) – 4-d.  $\text{LC}_{50} = 0,13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (MANUSADŽIANAS et al., 2002), verpetėms (*Brachionus calyciflorus*) – 24-val.  $\text{LC}_{50} = 0.023 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (CLEMEDSON et al. 1996), krevetėms (*Thamnocephalus platyurus*) – 24-val.  $\text{LC}_{50} = 0.04 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (PERSOONE, 1998). Taigi, vertinant ekotoksinį metalinių nanosuspensijų poveikį, ypač tų, kurios gaminimo metu buvo paveiktos ultragarsu, t. y. sonifikuotos, būtina atsižvelgti į ištirpusių metalų jonų sukulto toksiškumo galimybę.

Šiuo metu įrodyta, kad nCuO pasižymi toksiškumu daugeliui vandens organizmų: vėžiagyviams (HEINLAAN et al., 2008; ROSSETTO et al., 2014), mikro- ir makrodumbliams (ARUOJA et al., 2009; MANUSADŽIANAS et al., 2012), vandens augalams (PERREAULT et al., 2014) ir žuvims (ISANI et al., 2013), tačiau taip pat žinoma, kad  $\text{Cu}^{2+}$  yra žymiai toksiškesnis daugumai šių organizmų. Dar daugiau, kai kurie tyrimai rodo, kad ūminis nCuO toksinis poveikis bakterijoms (BONDARENKO et al., 2012), mikrodumbliams (ARUOJA et al., 2009), pirmuonims (MORTIMER et al., 2010) bei vėžiagyviams (OL ET AL., 2012), pasireiškia būtent dėl iš nCuO disocijavusių vario jonų.

Visgi, kiti tyrėjai teigia, kad ne visas stebimas reakcijas galima paaiškinti vien iš nanodalelių ištirpusiais vario jonais ir todėl yra įmanomas kombinuotas nanodalelių ir jonų poveikis (GRIFFITT et al., 2008; JIANG et al., 2009; MANUSADŽIANAS et al., 2012; PERREAULT et al., 2012).

Aluminio, silicio, titano, cinko oksidų nanoformų toksinis poveikis bakterijoms aiškinamas ne tik ištirpusių metalo jonų toksiniu poveikiu, bet ir nanodalelių gebėjimu kauptis ant ląstelės sienelės (VAN HOECKE et al., 2008). Pateikiami duomenys, kad  $\text{SiO}_2$  nanodalelės adsorbuojasi ant *P. subcapitata*



ląstelės sienelės ir sukelia toksinį poveikį per ląstelės paviršių (LEE et al., 2008). Panašiai aiškinamas Cu nanodalelių toksinis poveikis *Phaseolus radiatus* ir *Triticum aestivum* sodinukams, pasireiškiantis augimo slopinimu – autorių nuomone sukeliamas pačių nanodalelių, o ne joms tirpstant atsiradusių jonų, nes buvo aptikti vario nanodalelių agregatai ant augalinės ląstelės. Tačiau, apžvelgiant dabartinių eksperimentų vis dar fragmentiškus rezultatus, negalima aiškiai atskirti abiejų – nanodalelių ir jonų poveikiu aiškinamų – toksiškumo mechanizmų.

Nedaug nagrinėtas lėtinis nCuO poveikis. Neseniai išspausdintame viename iš pirmųjų straipsnių, nagrinėjamas lėtinis veikimas – pakitusios *Daphnia magna* reprodukcijos savybės po 21 paros nanodalelių poveikio (ADAM et al., 2015b). Autoriai nustatė, kad nanodalelės buvo daug mažiau toksiškos negu vario druskos, jei vertinti nominalias (suvienodintas pagal Cu kiekį) medžiagų koncentracijas. Terpėje disocijavusi iš nanodalelių vario dalis buvo tokia, kuri galėtų sukelti toksinį poveikį vėžiagyviams, tačiau, kita vertus, dafnijose sukaupiami žymiai didesni vario kiekiai jas veikiant nanodalelėmis nei CuCl<sub>2</sub> tirpalu.

Vario jonų lėtinio toksiškumo tyrimai parodė, kad vandens augalų *Ceratophyllum demersum* augimas sumažėja, kai Cu jonų koncentracija išorės terpėje viršija 0,6 μg·L<sup>-1</sup> (THOMAS et al., 2013), o vidinė koncentracija augale padidėja virš 20 ppm SM. T. WANG nagrinėjo vario sulfato ir nCuO poveikį jūrinėms žuvims *Epinephelus coioides* ir parodė, kad veikiant vienodomis pagal vario kiekį koncentracijomis (7 mg L<sup>-1</sup>) abi jos neigiamai veikia žuvų augimą, fermentų veiklą, bet vėl gi – nanodalelių atveju žuvyse sukaupiami kur kas didesni vario kiekiai (WANG et al., 2014).

Vienaląsčių organizmų, dumblių atveju, nanodalelės tam, kad patektų į ląstelės vidų turi pereiti du barjerus – ląstelės sienelę ir plazminę membraną. Makrofitinių dumblių *Chara corallina* ląstelės porų skersmuo 2,1 nm (BERESTOVSKY et al., 2001). Kitame tyrime, analizuojant polisacharidų patekimą į tų pačių dumblių ląsteles, nustatyta, kad ląstelių sienelių poros yra 4,6 nm skersmens (PROSEUS et BOYER, 2005). Įvairių aukštesniųjų augalų ląstelių

kultūrose, sienelės porų skersmuo, ribojantis molekulių patekimą į ląstelę svyruoja tarp 3,5–5,2 nm (CARPITA et al., 1979) arba 6,6–8,6 nm (BARON-EPEL et al., 1988). Be to, teigiama, kad sienelės porų dydis gali kisti dėl ląstelės metabolizmo (CARPITA et GIBEAUT, 1993) arba dėl sąveikos tarp ląstelių ir nanodalelių (NAVARRO et al., 2008), taip palengvindamas nCuO patekimą į ląstelę (MELEGARI et al., 2013). Taip pat, vienas iš būdų nanodalelėms patekti į ląstelės vidų – endocitozė, pavyzdžiui, į cianobakterijų *Microcystis aeruginosa* (WANG et al., 2011) ir vienaląsčių žaliųjų dumblių *Chlamydomonas reinhardtii* (MELEGARI et al., 2013). Šiuo dumblių ląstelėse esantis vario kiekis buvo du kartus didesnis ląsteles 6 val. paveikus nCuO suspensija nei tuo atveju, kai ląstelės buvo veikiamos tirpia vario forma (PERREAULT et al., 2012).

Taigi, nCuO suspensijų poveikis vis dar nėra detalizuotas: toksiškumas gali būti siejamas ir su nanodalelių disociacija į vario jonus terpėje bei ląstelės sienelėje, su pačių nanodalelių tiesioginiu poveikiu, o taip pat ir abiejų šių poveikių kompleksu (GYLYTĖ et al., 2015).

### **1.3. Charophyceae dumbliai fiziologiniuose ir ekotoksikologiniuose tyrimuose**

Per pastarąjį šimtmetį įrodyta, kad gigantiškos dumblių, priklausančių *Characeae*, *Nitellaceae* ir *Nitellopsidaceae* šeimoms, ląstelės yra itin tinkamos tyrinėti ląstelių bioelektrines savybes ir jonų transportą augalinių ląstelių membranose (WAYNE, 1994). Dėl didelių matmenų (skersmuo 0,6–2,0 mm, ilgis 4–30 cm) ir savybės generuoti veikimo potencialą menturdumblių ląstelės vadinamos augaliniu kalmaro aksono analogu (KATAEV, 2008). Menturdumblių veikimo ramybės potencialo ir veikimo potencialo amplitudės absoliutinė vertė žymiai didesnės nei gyvūninių ląstelių. Ypač patogūs elektrofiziologiniai tyrimams tos maurabragiečių rūšys, kurių sienelė neturi žievės – *Chara corallina*, *Nitellopsis obtusa* ir smulkesni *Nitella* genties atstovai. Dideli ląstelės matmenys leidžia ne tik nesunkiai įvesti į ląstelę mikroelektrodus membranos potencialo matavimui

ir fiksacijai, bet ir visiškai pakeisti ląstelės vidinį turinį užpildant jas eksperimentiniais tirpalais (vidinė perfuzija). Tai leido išaiškinti maurabragiečių ramybės potencialo veikimo mechanizmus (TAKESHIGE et al., 2002; LEFEBVRE et al., 1970).

Augalinėse ląstelėse membranineį transportą bei elektrocheminę pusiausvyrą, o taip pat citoplazmos pH homeostazę ir kitas svarbias fiziologines ląstelės funkcijas didžiaja dalimi užtikrina plazminės membranos  $H^+$ -ATPazės (SMITH IR REID, 1991; 1998). Ląstelės membrana yra pirmasis indikatorius, parodantis organizmo reakciją į toksikantą, jutiklis, kurio cheminiai ir fiziniai signalai per daugiapakopes ląstelių reakcijas nukreipiami į tikslinę ląstelės sritį. Viduląstelinis neigiamas elektrinių potencialų skirtumas (nuo -150 iki -250 mV) rodo ląstelę esant integralia ir palaikančia normalią fiziologinę būklę. Dalis membranos potencialo (iki 100 mV), taip pat K jonų difuzijos transmembraninis potencialas, yra glaudžiai susijęs su fermentiniais protonų siurbliais, ypač  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  jonams specifiskomis  $H^+$ -ATPazėms (MIMURA, 1995). Fermentinis  $H^+$ -siurblys užtikrina ATP hidrolizės reakciją ir  $H^+$  tranlokaciją iš citoplazmos per membranas, taip sukurdamas nuo ATP priklausomą ląstelių membranos potencialą (SHIMMEN et TAZAWA, 1977).

Dėl minėtų priežasčių bioelektriniai membranos parametrų pokyčiai gali būti naudojami kaip integralus neigiamų poveikių ląstelėms rodiklis. Buvo parodyta, kad veikioji koncentracija, sukelianti 50% vidutinio *Nitellopsis obtusa* ląstelių ramybės potencialo (RP) depoliarizaciją per 45–90 min., gali būti laikoma patikimu toksinio poveikio įverčiu ( $IC_{50}$ ), vertinant bendrą cheminių medžiagų ir nuotekų mėginių toksiškumą (MANUSADŽIANAS et al., 1995 – 2000).

*N. obtusa* ląstelė yra pirmasis biologinis objektas, kurio, nuo  $Ca^{2+}$  kanalų priklausomas elektrinis potencialas buvo detalai išstudijuotas (LUNEVSKY et al., 1983; SHINA et TAZAWA, 1987) Pirmakart iš augalinio organizmo išskirtas kalciją fisuojantis baltymas kalmodulinas taip pat buvo išskirtas iš *N. obtusa* ląstelių (GRISHCHENKO, 1994).

Menturdumblių ląstelės gausiai naudojamos įvairiuose augalų fiziologijos tyrimuose: citoplazmos srautų (KAMIYA, 1981; WILLIAMSON, 1975), nuo druskingumo priklausančio streso (HOFFMANN ir BISSON, 1988; . KATSUHARA et TAZAWA, 1988), apšvietimo įtakos (PLIETH et al., 1998), gravitacinio jautrumo (HEJNOWICZ IR SIEVERS, 1981; KISS, 1994) mechanoreceptinio sužadavimo (HOPE et FINDLAY, 1964; SHIMMEN, 1997) toksikologiniuose (YURIN, 1979; HEUMANN, 1987; KIYOSAWA et ADACHI, 1990; TAKABATAKE et SHIMMEN, 1997) tyrimuose. Žvaigždėtasis maurašakis (*N. obtusa*) taip pat yra vienas iš etaloninių testinių augalų jonizuojančios spinduliuotės sukeltiems efektams tyrinėti (SEVRIUKOVA et al., 2014). Menturdumblių ląstelių plazminės membranos H<sup>+</sup>-ATPazės tiesiogiai dalyvauja generuojant membranos potencialų skirtumą, kuris, savo ruožtu, yra susijęs su ląstelių gyvybingumu (MANUSADŽIANAS et al., 1995; TAKABATAKE et SHIMMEN, 1997), todėl tokio pobūdžio tyrimai itin naudingi nagrinėjant įvairių medžiagų fitotoksiškumą. Yra nustatyta tiesioginė koreliacija tarp *N. obtusa* ramybės potencialo inhibavimo ir ląstelių mirtingumo, veikiant ląsteles sunkiaisiais metalais (MAUSADŽIANAS et al., 2002).

Sekliuose ežeruose menturdumblių sąžalynai yra pagrindiniai maisto medžiagų absorbuotojai. Palankiomis sąlygomis tankiose priedugninėse pievose sukaupiamą didžioji ežero maisto medžiagų dalis, tuo pačiu susikaupia ir sunkieji metalai. Per menturdumblius yra koreguojama neorganinių medžiagų pusiausvyra vandens telkiniuose (KUFEL et al., 2002; 2013). Tiriant sunkiųjų metalų kaupimosi, bei jų migracijos ir lokalizacijos augale dėsningumus menturdumbliai taipgi yra populiarus tyrimų objektas (CLABEAUX et al., 2013), (LI ZIJIE et al., 2008). Aiški didelės ląstelės struktūra leidžia atskirai tyrinėti kompartmentų cheminę sudėtį taip suskaidant vykstančius biologinius procesų analizę (TAZAWA et al., 1976; 2001).

Apžvelgus naujausią mokslinę literatūrą (ScienceDirect duomenų bazė <http://www.sciencedirect.com/> ), galima pastebėti, kad vėl gausėja atliekamų su maurabragiečiais tyrimų, o tai šį tyrimo objektą daro išskirtiniu.

## 2. METODIKA

### 2.1. Augalinės medžiagos paruošimas

Tyrimams žvaigždėtojo maurašakio (*Nitellopsis obtusa* (Desv.) Gr.) medžiaga buvo surinkta Obelijos ežero (Lazdijų rajonas) augimvietėse. Į laboratoriją dumbliai atgabenti konteineriuose su ežero vandeniu. Šviežiai surinkti dumbliai apdoroti pašalinant rizoidines bei negyvas ląsteles nuo gniužulo. Elektrofiziologiniams ir letalumo tyrimams naudotos tarpubamblinės ląstelės. Iki tyrimo pradžios dumbliai laikomi vandentiekio vandens ir kontrolinio (mitybinio) tirpalo (APW, *angl.* artificial pond water) mišinyje santykiu 1:1. Terpės sudėtis (mM): 0,1  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1,0  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,4  $\text{CaCl}_2$ ; 0,1  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  ir 0,1  $\text{MgSO}_4$ , pH 7–7,8, distiliuotas ar dejonizuotas vanduo, be buferinio tirpalo (VOROBIEV et MANUSADŽIANAS, 1983). Terpė keičiama pirmą ir septintą dieną po dumblių išrūšiavimo, vėliau kas mėnesį. Dumbliai laikomi vėsioje patalpoje arba inkubatoriuose, 15°C temperatūroje.

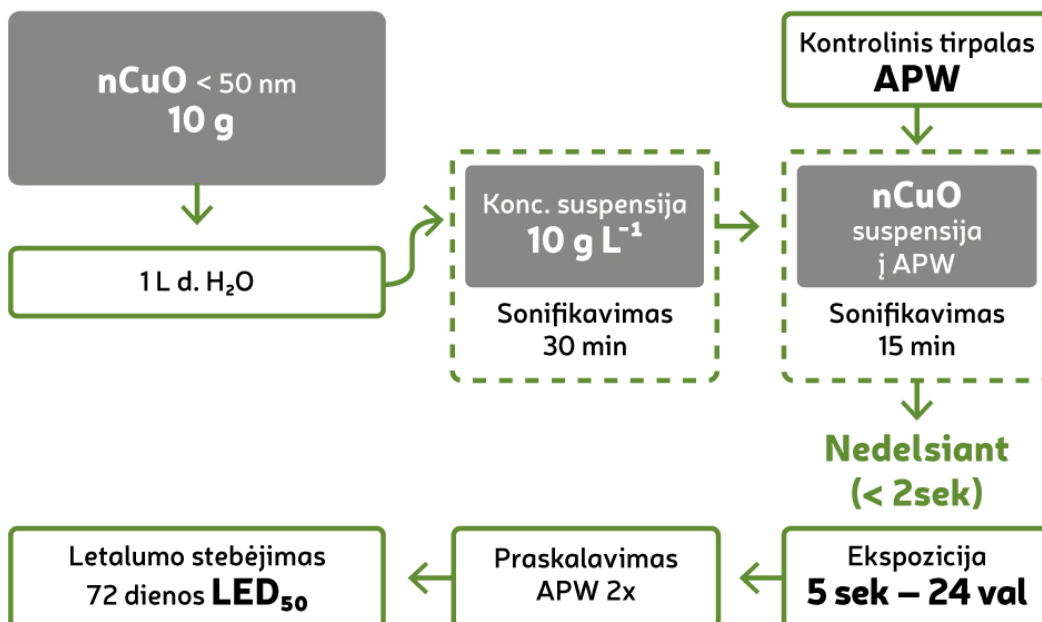
### 2.2. CuO nanosuspensijų dalelių dydžių matavimas

Vario oksido nanodalelių (nCuO, <50nm, vidutinis dydis ~ 30 nm, Sigma/Aldrich) suspensija buvo tiriama lazerinės difrakcijos būdu dalelių dydžio analizatoriumi (Helos, Sympatec GmbH). Koncentruota nanosuspensija 10 g L<sup>-1</sup> pagaminta praskiedžiant dejonizuotu vandeniu. Po 30 min. sonifikavimo zondo tipo (3 mm) sonikatoriumi (Bioblock Scientific, Vibracell) koncentruota nanosuspensija laikyta tamsoje keturias dienas iki panaudojimo, esant 4 °C. Tiriamų koncentracijų (3, 10, 30 ir 100 mg·L<sup>-1</sup>) nesonifikuotos ar sonifikuotos suspensijos pagamintos praskiedžiant APW prieš 24 val. (24-val. grupė) iki matavimų pradžios arba prieš pat juos (0-val. grupė). 24-val. grupės suspensijos stikliniuose mėgintuvėliuose sonifikuotos 30 min. (Bandelin Electronics RK510, 160–320 W, 35 kHz). Norint iširti sonifikavimo įtaką 0-val. grupės suspensijoms, nesonifikuotos atitinkamos koncentracijos buvo nenutrūkstamai pumpuojamos į analizatorių, ten sonifikuojamos (60 sek.) ir atlikus matavimus, sistema

praplaunama. Kiekviena suspensija analizuota du kartus po 10 sek., padarant 5 sek. pertrauką tarp matavimų.

### 2.3. CuO nanosuspensijų gamyba biologiniams tyrimams

Koncentruota nanosuspensija gaminama 10 g nCuO praskiedžiant 1 L dejonizuoto vandens. Suspensija sonifikuojama 15 min. ultragarsinėje vonelėje (Intersonic, IS-2, 300 W, 35 Hz). Laikoma sandariai, tamsoje ne aukštesnėje nei 6°C. Prieš eksperimentą koncentruotas tirpalas dar kartą sonifikuojamas ultragarsinėje vonelėje 30 min. (2.1pav.). Darbui reikalingos nanodalelių suspensijų koncentracijos ruoštos suspensiją praskiedžiant dumblių kontroliniu tirpalu APW. Kiekvienas suspensijos mėginys ruošiamas atskirame inde, sonifikuojama 15 min., po to greitai (ne ilgiau nei per 2 sek.) suspensija užpilama ant dumblių ląstelių. Siekiant išvengti nanodalelių suspensijos užkaitimo, į ultragarsinę vonelę dedama ledo, laikas nuo laiko matuojama temperatūra vandens vonelėje, palaikoma 13–18°C.



2.1 pav. nCuO suspensijos gamybos letalumo tyrimams eiga.

## **2.4. Dumblių letalumo tyrimai**

### **2.4.1. Letaliosios koncentracijos ( $LC_{50}$ ) nustatymas**

Tyrimo tikslas – nustatyti toksikanto koncentraciją, sukeliančią 50% testuojamų ląstelių žūtį. Standartinių ūminių biotestų trukmė 4 ar 8 dienos, tačiau menturdumblių ląstelių mirtingumo kitimas gali būti stebimas ir ilgiau, iki dviejų mėnesių. Tuo atveju, terpė atnaujinama kas dvi savaites.

Standartinės trukmės testas atliekamas sudedant 3–10 cm ilgio tarpubamblines ląsteles į Petri lėkštutes po dešimt, kiekvienai koncentracijai imant po 30–40 ląstelių t. y. 3–4 nepriklausomais pakartojimais ( $n = 3–4$ ), kas dieną patikrinama kiek ląstelių žuvo. Apie ląstelės žuvimą sprendžiama iš turgoro praradimo: pakėlus mentele ląstelę, ji subliūkšta. Tyrimo metu ląstelės laikomos inkubatoriuose, 15 °C temperatūroje, tamsoje. Gavus duomenis ir apskaičiavus mirusių ląstelių skaičių procentais, brėžiama koncentracijos–atsako kreivė.  $LC_{50}$  vertė gaunama taikant logistinę aproksimaciją su nekintančiomis asimptotėmis (0 ir 100).

### **2.4.2. Mirtingumo kinetika, letaliosios ekspozicijos trukmės ( $LED_{50}$ ) ir poveikio slenksčio nustatymas**

Šiais tyrimais siekta nustatyti dumblių ląstelių mirtingumo kinetiką kontrolinėje terpėje prieš tai jas paveikus  $CuSO_4 \times 5 H_2O$  (Merck) tirpalu ( $3,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) ar  $nCuO$  suspensijomis (4, 10, 30 ir  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) skirtingą laiką: 5 sek., 15 sek., 30 sek., 1 min., 3 min., 5 min., 15 min., 30 min., 1 val., 3 val., 6 val. ir 24 val. Kiekvienai ekspozicijos trukmei imama po 30–60 ląstelių (10 ląstelių Petri lėkštutėje), t. y. 3–6 nepriklausomi pakartojimai ( $n = 3–6$ ). Reikiamos koncentracijos  $nCuO$  suspensija kiekvienos lėkštutės ląstelėms (pakartojimui) gaminama atskirame inde. Suspensija po 15 min. sonifikavimo ultragarsinėje vonelėje nedelsiant užpilama ant ląstelių (2.1.pav.). Petri lėkštutėje, pasibaigus ekspozicijos trukmei suspensija nupilama, ląstelės du kartus išskalaujamos APW ir perduodamos į šviesią lėkštutę su APW. Ląstelių mirtingumo

dinamika eksperimento pradžioje tikrinama kas keletą valandų, pirmą mėnesį – kas 1–2 dienas, vėliau – kas 3–4 dienas. Ląstelių būklė stebima iki 70 dienų nuo tyrimo pradžios. Kartą per savaitę pakeičiama kontrolinė terpė.

Įvertinama LED<sub>50</sub>, t.y. ekspozicijos trukmė, kurios pakanka, kad, ląsteles perkėlus į kontrolinę terpę, būtų sukeltas 50% ląstelių mirtingumas. LED<sub>50</sub> vertė apskaičiuojama taip, kaip ir LC<sub>50</sub> atveju, tik analizuojant tam tikru laiko momentu (po ekspozicijos) gautą mirtingumo ir ekspozicijos trukmės priklausomybę.

Poveikio slenkstis arba minimali poveikio trukmė – trumpiausias ekspozicijos laikas, sukiantis statistiškai reikšmingą mirtingumo efektą perkeltoms į kontrolinę terpę ląstelėms, palyginus su nanosuspensija nepaveiktų dumblių ląstelių mirtingumu, nustatoma iš mirtingumo kinetikų kreivių, tam tikru laiku palyginant mirtingumo tikimybes.

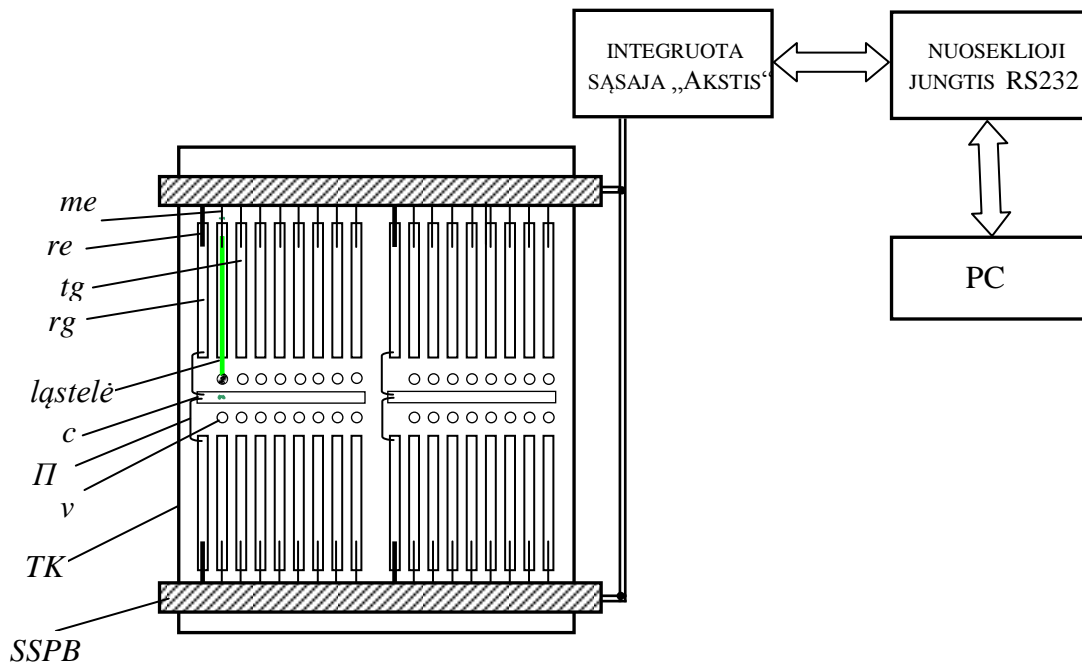
## **2.5. *N. obtusa* ląstelių ramybės potencialų matavimas ir elektrofiziologinių tyrimų eiga**

Ląstelės ramybės potencialas (RP) buvo matuojamas taikant K-anestezijos metodą, kai nedidelį ląstelės fragmentą paveikus 100 mM KCl tirpalu pasiekiamas elektrinis kontaktas su citoplazma (SHIMMEN et al., 1976). Abipus plazmolemos, t. y. tarp citoplazmos ir kontrolinės terpės ląstelės išorėje, susidarantis elektrinių potencialų skirtumas buvo matuojamas išoriniais (ekstraląsteliniais) sidabro chloridu padengtais sidabro (Ag/AgCl) elektrodais (EVANS et LEAL, 1980). Toksiškumas siejamas su ląstelių ramybės potencialo depoliarizacija, t. y. jo absoliutinio dydžio mažėjimu veikiant tiriamuoju tirpalu (MANUSADŽIANAS et al., 1999).

Biotestavimo procedūros buvo atliekamos kambario temperatūroje, esant pastoviam išsklaidytam apšvietimui. Iš organinio stiklo pagamintos testavimo kameros viršutinė dalis suskirstyta į keturias vienodų segmentų dalis (2.2 pav.) Atskirą testavimo segmentą sudaro testavimo geldelė ir vazelinu užpildytas izoliacinis griovelis. Dvi viena priešais kitą išsidėsčiusios ir centriniu grioveliu



atskirtos grupės (po 8 testavimo geldelės grupėje) sudaro vieną iš dviejų bloką. Registravimo elektrodai tvirtinami virš kiekvienos geldelės ir talpinami šalia ląstelės. Papildomai kiekvienoje grupėje yra po vieną identišką testiniam referentinį segmentą, kurio geldelėje talpinamas referentinis Ag/AgCl elektrodas. Elektrinis ryšis tarp referentinės geldelės ir centrinio griovelio, kuris, savo ruožtu, siejasi su citoplazma, yra gaunamas per II pavidalo tiltelį, užpildytą 2% agaru, ištirpinto 3 M KCl tirpale. Vienas tiltelio galas talpinamas centriniame griovelyje, kitas - referentinėje geldelėje. Ląstelių bioelektriniai signalai sustiprinami ir perduodami per išorinę integruotą daugiakanalę sąsają „Akstis“ į kompiuterį, kurio monitoriuje yra atspindimi kreivėmis (2.3 pav.). Kompiuterinių programų „Elf“ ir „Viewer“ pagalba gali būti stebima ląstelių elektrofiziologinių reakcijų kinetika eksperimento metu arba vykdoma sukauptų duomenų peržiūra ir analizė po bandymo, pasirenkant tiek bet kurios iš 32 ląstelių, tiek grupių, sudarytų iš 8, 16 ar 32 bioelektrinius duomenis.



**2.2 pav.** Testavimo kamera ir signalų perdavimo bei registravimo schema. *TK* – testavimo kameros viršutinė dalis; *tg* – testavimo geldelė; *SSPB* – signalų stiprinimo ir perdavimo blokas; *Π* –  $\Pi$ -formos tiltelis; *c* – centrinis griovelis; *rg* – referentinė geldelė; *re* – referentinis elektrodas; *v* – izoliacinis vazelino griovelis; *me* – registravimo elektrodas.

Prieš paveikiant ląsteles tiriamuoju tirpalu ar suspensija, jos 1,5–2 val. adaptuojamos kontroliniame tirpale, kol nusistovi kiekvienos grupės ląstelių RP vidutinė reikšmė, t. y., kai ši reikšmė per 30 min. pakinta ne daugiau  $\pm 2$  mV. Keičiant tirpalus kiekviena geldelė buvo praplaunama po du kartus kontroliniu tirpalu taip pašalinant prieš tai veikusio tirpalo likučius. Ląstelių RP kinetika buvo matuojama iki 28 val., veikiant 10, 30, 100, 500 ir 1000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  nCuO suspensijomis.



**2.3 pav.** Elektrofiziologinio testavimo sistema.

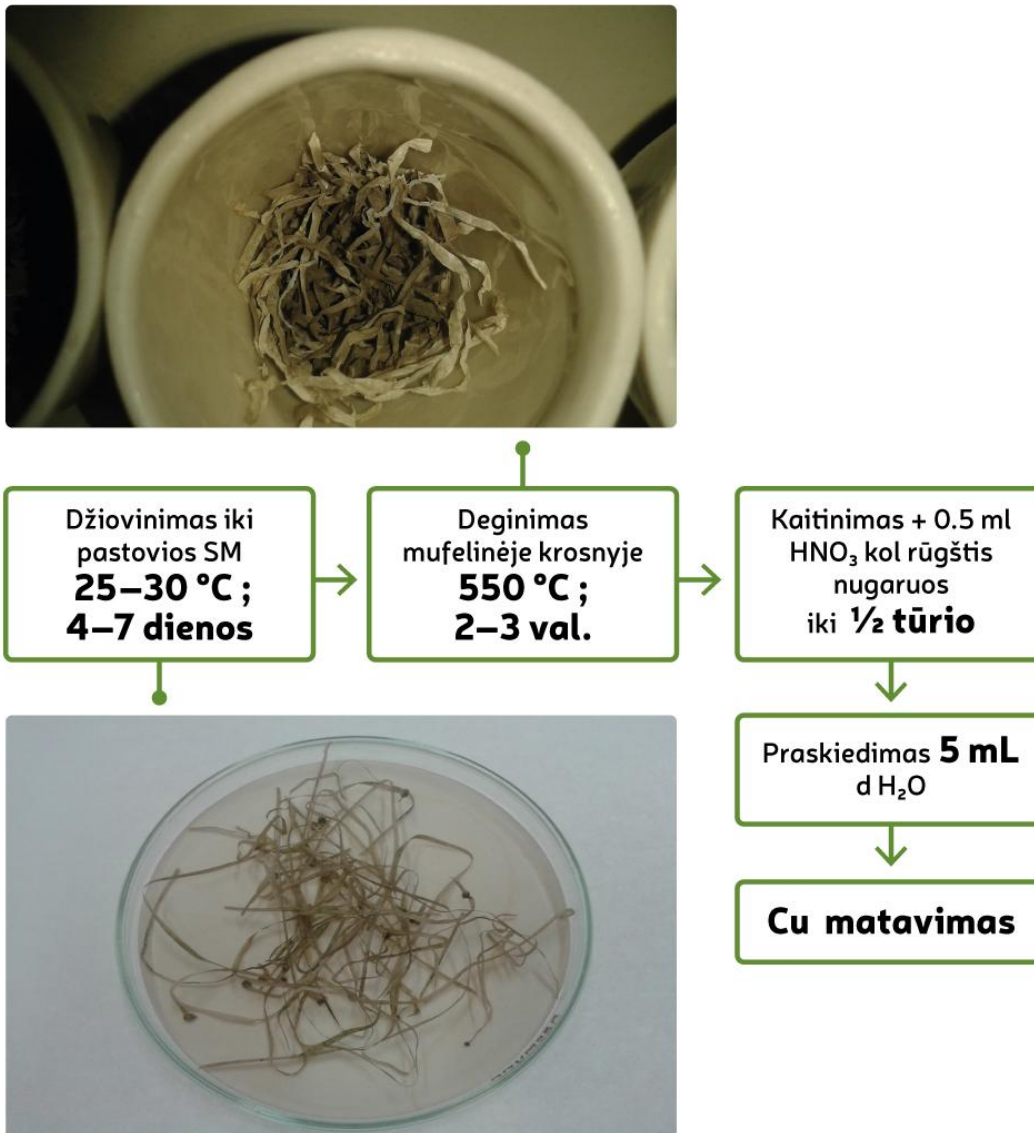
## 2.6. H<sup>+</sup>-ATPazių aktyvumo mikrosominėje frakcijoje tyrimai

Ląstelių mikrosominės frakcijos išskyrimui naudotas *N. obtusa* gniužulas be rizoidinių ląstelių. Frakcija išskiriama diferencinio centrifugavimo būdu (MANUSADŽIANAS et al., 2002). Specifinis K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> - ATPazės aktyvumas membranų preparatuose siejamas su ATP hidrolizės metu susidarancio neorganinio fosfato (P<sub>i</sub>) kiekiu, išreikštu μmol/mg baltymo/h. P<sub>i</sub> nustatomas spektrofotometriškai pagal spalvinę reakciją (λ = 750 nm).

Vezikulių pralaidumas jonams ir geba generuoti transmembraninį potencialą buvo matuojamas spektrofluorimetriniu metodu, panaudojant potencialui jautrų zondą diS-C<sub>3</sub>-(5) (0,33 μM). Fluorescencijos matavimas buvo atliekamas spektrofluorimetru SFR-1, kuris turi epiobjektyvą ir eliminuoja šviesos išsklaidymo poveikį, kadangi signalas šioje sistemoje registruojamas tiesiogiai nuo analizuojamos terpės paviršiaus. Kiekvienam bandymui buvo nustatomas optimalus vezikulių ir zondo santykis, titruojant zondo tirpalą vezikulių suspensija. Kalio difuzinis potencialas (KDP) buvo generuojamas specifiniu jonoforu – valinomicinu (8,33·10<sup>-9</sup> M). Rezultatai pateikti, laikant KDP = 100% ir nuo jo skaičiuojant indukuojamą monensino natrio difuzinį potencialą bei nuo ATP-priklausomą ΔμH<sup>+</sup> (MAKSIMOV et al., 2002).

## 2.7. Vario kiekio ląstelėse nustatymas

Šiam tikslui naudotos ilgos menturdumblių ląstelės (maždaug po 20 vnt.). Ant ląstelių užpilama 4, 30 ar 100 mg·L<sup>-1</sup> koncentracijos nCuO suspensija, laikoma nuo 5 sek. iki 24 val. Pasibaigus ekspozicijai, suspensija nupilama, ląstelės 2 kartus praskalaujamos APW, po to ląstelės perkeliamos į sausą Petri lėkštelę su įklotu filtriniu popieriumi ir paliekama džiūti kambaryje ar inkubatoriuje 4–7 dienas, esant 25–30°C, iki orausės medžiagos masės – ląstelės



**2.4 pav.** Vario kiekio nustatymo *N.obtusa* ląstelėse procedūra.

išdžiuvusiomis laikomas tuomet, kai dvi dienas iš eilės tikrinant sudžiuvusių dumblių svorį jis yra pastovus (2.4 pav.).

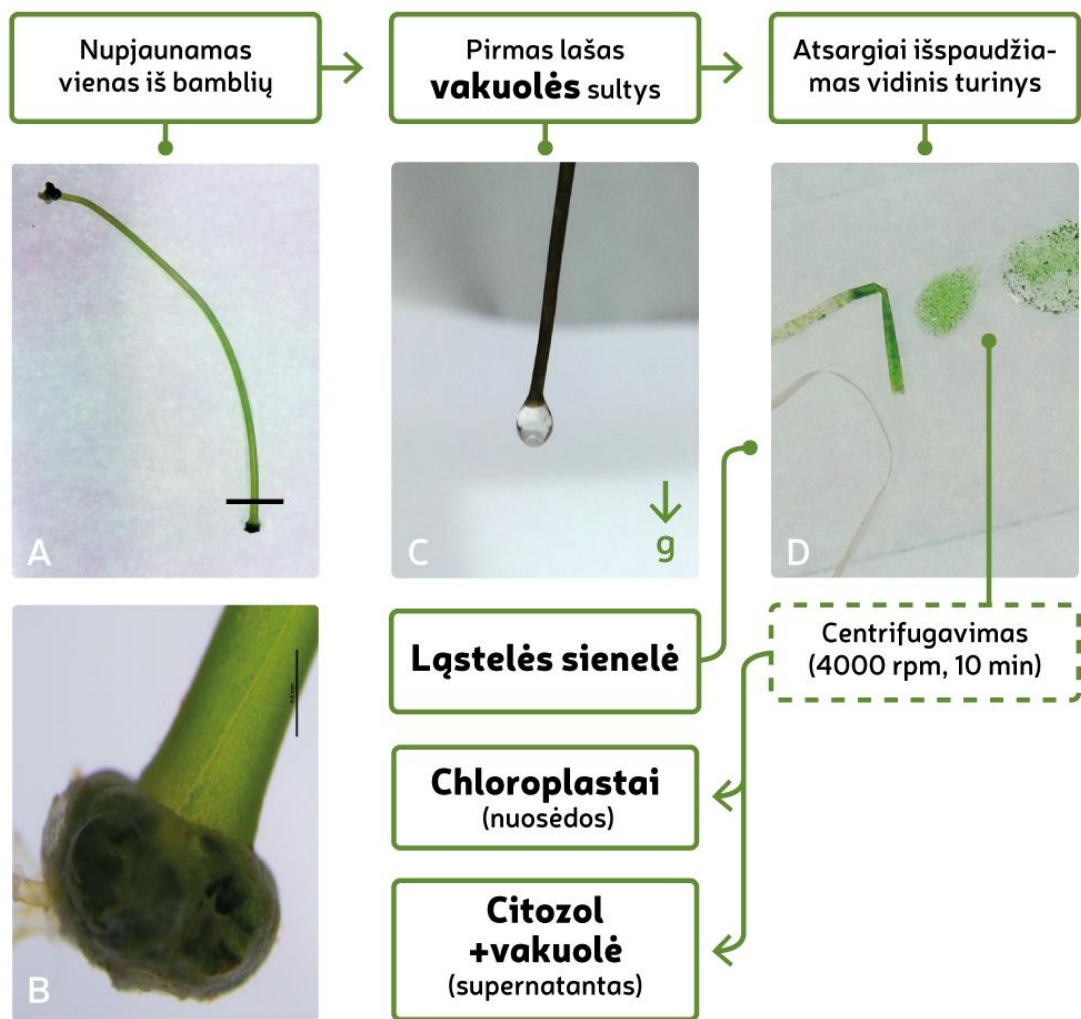
Vėliau dumbliai pasveriami, sudedami į porcelianinius tiglius ir deginami mufelinėje krosnyje 30 min., esant 450°C, vėliau dar 2–3 val. 550°C temperatūroje. Gauti pelenai užpilti 0,5 mL koncentruotos azoto rūgšties, tirpalas

garinamas ant elektrinės plytelės iki pusės tūrio. Po to mėginys praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 5 mL.

Bendrasis vario kiekis (Cu) išmatuotas indukuotos plazmos optinės emisijos spektrometru (ICP-OES) (Perkin Elmer Optima 7000DV, JAV), esant  $\lambda_{\text{Cu}} = 327,393 \text{ nm}$ . Prietaiso kalibracijai naudoti standartiniai 0,100; 1,00 ir 10,0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Cu druskų tirpalai (Perkin Elmer, JAV). Kalibracinės kreivės koreliacijos koeficientas 0,999997. Išmatuotas vario kiekis perskaičiuojamas 1 g sausos medžiagos.

## 2.8. Ląstelių frakcionavimas

Žvaigždėtojo maurašakio ląstelės paveikiamos  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  nCuO suspensija 3 val. Pasibaigus ekspozicijai, ląstelės du kartus perplaunamos kontroline terpe. Vėliau imama po vieną ląstelę ir dedama ant filtrinio popieriaus. Ląstelei kiek apdžiuvus (apie 1 min.), t. y., kol jos paviršius tampa matinis, ji dedama ant stiklinės plokštelės, aštriu skalpeliu nupjaunamas ląstelės galas (apie 4 mm nuo bamblio) (2.5 pav.). Atsargiai laikant už kito galo ląstelė pakeliama vertikaliai virš Eendorfo mėgintuvėlio. Pirmi vienas ar du lašai, ištekantys iš ląstelės – vakuolės frakcija. Jos grynumas įvertinamas vizualiai (visiškai skaidrus lašas) bei išmatuojamas pH. Rūgštingumas *N. obtusa* ląstelių vakuolėje turi būti apie 5,5 (GYANES et AL., 1978). Jei reikšmė didesnė, vadinasi vakuolės frakcija užteršta citoplazma. Priklausomai nuo apšvietimo menturdumblių citoplazmos pH svyruoja nuo 7,3 tamsoje iki 7,8 apšvietus (MIMURA et KIRINO, 1984).



**2.5 pav.** *N. obtusa* ląstelės skirstymas į atskiras dalis: A – visa ląstelė, B - ląstelės bamblys, C – ištekanči vakuolė, D – bendras ląstelės vidaus turinys. Brūkšnys (B) lygus palyginamajam matmeniui 0,5 mm.

Likęs ląstelės turinys, atsargiai stumiant pirštais, yra išspaudžiamas į kitą mėgintuvėlį – jį sudaro likusi didesnioji vakuolės dalis ir citoplazma su joje esančiais organoidais. Spaudžiama nuo sveikojo ląstelės bamblio per visą ląstelės ilgį iki maždaug 1 cm nuo pjūvio vietos. Iki pjūvio vietos nespaudžiama, kad varis nuo ląstelės paviršiaus nepatektų į vidinį ląstelės turinį. Surinktas citoplazmos ir

vakuolės mišinys centrifuguojamas 7 min., 10000 aps.·min.<sup>-1</sup>. Nusiurbus supernatantą gaunama citoplazmos-vakuolės mišinio frakcija, surinkus nuosėdas – chloroplastų frakcija (WHITEHOUSE et MOORE, 1993).

Kiekvienas mėginys iš trijų ląstelės frakcijų (kiekvienos frakcijos po tris mėginius, n = 3) praskiedžiamas dejonizuotu vandeniu iki 4 mL ir spektrofotometriškai (žr. 2.7) išmatuojamas vario kiekis (mg·mL<sup>-1</sup>).

Vario kiekiui įvertinti ląstelės sienelėje mėginiai ruošiami pagal tą pačią metodiką, kaip ir visos ląstelės atveju. Vario kiekis sienelėje normuojamas 1 g sausos medžiagos.

## **2.9. Vario identifikavimas N. obtusa ląstelėse skenuojančiu elektroniniu mikroskopu (SEM)**

Dumblių ląstelės, eksponuojamos 3 val. 100 mg·L<sup>-1</sup> nCuO suspensijoje, du kartus nuplaunamos kontroliniu tirpalu, po to frakcionuojamos aukščiau aprašytu būdu. Šlapiosios ląstelės dalys – vakuolė, chloroplastai, citoplazmos ir vakuolės mišinys užlašinami ant inertiškos anglies juostele padengto metalinio stalelio, palaukiama, kol mėginys išdžius. Sausos ląstelės sienelės fragmentas klijuojamas ant inertiškos anglies juostelės. Bandiniai, ruošiant juos cheminių elementų sudėties tyrimui rentgeno spindulių išsklaidymo (EDX) analizės sistema, yra padengiami 15–25 nm storio anglies sluoksniu, panaudojant CA7625 Carbon Accessory (Emitech) priedelį. Stereometrinės nuotraukos gautos naudojant FL (fluorescencijos) ir šoninės šviesos sklaidos (BSE, back-scattered electrons) detektorius. Pavyzdžiai nufotografuoti ir analizuoti skenuojančiu elektroniniu mikroskopu (FEI Quanta 250, The Netherlands), esant 100–10000 kartų didinimui. Elementų sudėties analizės taškelių skersmuo 5 μm.

## 2.10. nCuO disociacijos tyrimai

Vario oksido disociacija, t. y. išmatuojamos  $\text{Cu}^{2+}$  koncentracijos atsiradimas terpėje, tirta taikant ultrafiltravimą ir bendrojo Cu matavimą ultrafiltrate bei netiesiogiai – matuojant terpės optinį tankį.  $\text{Cu}^{2+}$  koncentracijai išmatuoti nanosuspensijoje, bendrame viduląsteliniam ląstelės turinyje bei vakuolės ir citoplazmos-vakuolės mišinio frakcijose, mėginiai buvo centrifuguojami 1 val., 5000 g (ROSSETTO et al., 2014) specialiuose ultrafiltravimui pritaikytuose mėgintuvėliuose (Microsep™ Advance Centrifugal Devices, Pall Corporation, USA) su 1 kDa pralaidumo filtrais, nes visiškai ištirpusių metalų dalelių dydis yra mažesnis nei 1 nm (~1 kDa) (ODZAK et al., 2014). Gauti filtratai ( $n = 3$ ) praskiedžiami distiliuotu vandeniu iki 4 mL ir juose išmatuojamas Cu kiekis ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) (žr. 2.7 skyrių).

Parūgštinus vario oksido nanosuspensiją tikėtasi dalies nCuO disociacijos (STUDER et al., 2010) – tokiu atveju nanosuspensijos optinis tankis turėtų sumažėti. Pagaminus  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  nCuO suspensijas dejonizuotame vandenyje arba kontroliniame tirpale pagal standartinę schemą, optinis tankis matuotas tris kartus: pirmą, iškart po pagaminimo (laikas tarp sonifikavimo pabaigos ir optinio tankio išmatavimo maždaug 2 min.); antrą – po 3 val. (įvertinus nCuO nusėdimą, sukračius kiuvetę ir pasonifikavus 15 min.) ir trečią – po 24 val. kartojant prieš tai vykdytą procedūrą. pH matuotas iškart pagaminus suspensijas, po 3 ir 24 val. pagal standartinę schemą. Tyrimo variantai – pirmas, kontrolinis tirpalas (realus pH, be buferinio tirpalo); antras ir trečias – rūgštingumas artimas menturdumblių ląstelės vakuolės pH = 5,5, gautas arba parūgštinus terpę pridedant 0,1 mM HCl ir nenaudojant buferinio tirpalo, arba pH stabilizacijai panaudojant MES buferinį tirpalą ( $10 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Mėginių optinis tankis ( $\lambda = 327 \text{ nm}$ ) matuotas spektrofotometru Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies).



## 2.11. Statistinė duomenų analizė

Letaliosios koncentracijos  $LC_{50}$  ir letaliosios ekspozicijos trukmės  $LED_{50}$  reikšmėms apskaičiuoti taikyta probit regresinė analizė. Dvi iš atitinkamų priklausomybių gautos jų medianų reikšmės laikytos skirtingomis, jei nepersikloja šių reikšmių pasikliautiniai intervalai, kitu atveju, kad būtų patvirtintas statistinis skirtingumas, taikytas Ličfildo-Vilkoksono testas. Siekiant palyginti mirtingumo dalines tikimybes tam tikru laiko momentu (iš mirtingumo kinetikos kreivių), buvo taikomas tikslusis Fišerio testas. Statistinėms palyginimo procedūroms taikytas 0,05 reikšmingumo lygmuo. Duomenys analizuoti statistiniais programiniais paketais SPSS 13.0 ir OriginPro 8.

## 3. REZULTATAI

### 3.1. CuO nanosuspensijų charakterizavimas

#### *3.1.1. Nanodalelių dydžio skirstinių priklausomybė nuo suspensijos koncentracijos ir sonifikavimo*

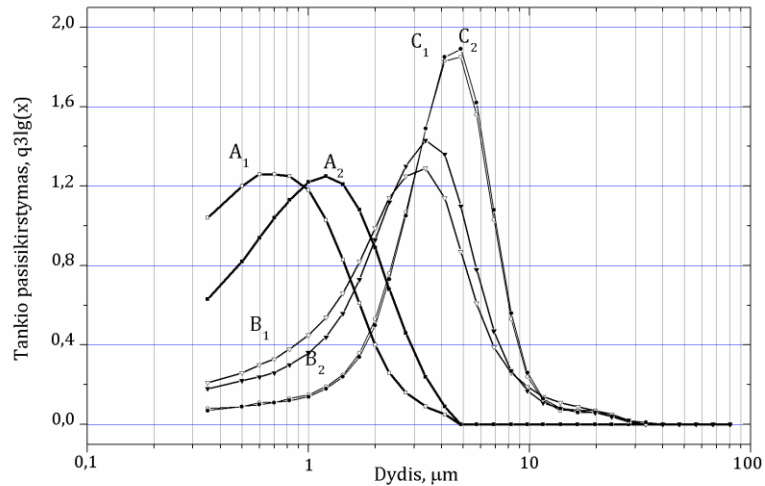
Nanosuspensijas ( $3\text{--}100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  nCuO) sudarančių dalelių ar jų aglomeratų dydžių skirstinių duomenys pateikti 3.1 lentelėje. Mažiausios dalelės, kurios buvo išmatuotos tiek bandymo pradžioje, tiek po 24 val. buvo 200 nm ar mažesnio dydžio. Tačiau jos nėra vyraujančios visų tirtų koncentracijų nanosuspensijose, išskyrus 0-val. grupėje, esant  $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (nesonifikuotai ir sonifikuotoms) suspensijoms ir esant  $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (sonifikuotai) suspensijai, – pastarųjų dalelių dydžių pasiskirstymų moda 500 nm. Aglomeratų dydis įvairavo nuo mikrometro iki dešimčių mikrometrų. Po 24 val. skirtumai tarp sonifikuotų ir nesonifikuotų suspensijų buvo nežymūs – atitinkamų koncentracijų dalelių dydžio skirstinių modos beveik nesiskyrė, priešingai nei ką tik pagamintų suspensijų (išskyrus dviejų  $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  suspensijų). Didžiausioje tirtoje  $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  tiek nesonifikuotoje, tiek sonifikuotoje suspensijose po 24 val. susidarė didesni nei 85  $\mu\text{m}$  aglomeratai

ir, norint atlikti dalelių dydžių analizę, teko papildomai 60 sek. sonifikuoti – tuomet dominuojantis dalelių dydis buvo 4,5–5  $\mu\text{m}$ . Net po papildomo sonifikavimo, jau po 3 min. matavimas ir vėl buvo neįmanomas, nes nanodalelių aglomeratai viršijo analizatoriaus matuojamų dalelių dydžių diapazoną. Taigi, suardyti sonifikacijos metu nCuO aglomeratai labai greitai vėl susiformuoja. Kaip matome 3.1.1 pav., atlikus pirmąjį matavimą iškart po sonifikavimo, moda jau po 5 sek. padidėjo nuo maždaug 700 nm iki 1200 nm (3.1.1 pav. A<sub>1</sub> ir A<sub>2</sub>). Skirstinių modų slinktis rodo, kad šios koncentracijos (30 mg·L<sup>-1</sup> nCuO) nanosuspensijoje reaglomeracijos procesas baigėsi po 3–5 min. (3.1.1 pav. B<sub>1</sub> ir B<sub>2</sub>, C<sub>1</sub> ir C<sub>2</sub>).

**3.1.1 lentelė.** Nanodalelių aglomeratų dydžio (nm) skirstinių duomenys nesonifikuotose (ns) ir sonifikuotose (s) CuO nanosuspensijose.

Matavimo parametrai	Skirstinių parametrai 0 val.			Skirstinių parametrai po 24 val.		
	Mažiausia reikšmė	Moda	Didžiausia reikšmė	Mažiausia reikšmė	Moda	Didžiausia reikšmė
3 mg·L <sup>-1</sup> (ns)	200	500	2000	200	5000	10000
3 mg·L <sup>-1</sup> (s)	200	500	5000	200	5000	15000
3 mg·L <sup>-1</sup> (s, po 3 min.)	200	500	5000	–	–	–
10 mg·L <sup>-1</sup> (ns)	200	3000	20000	200	4000	15000
10 mg·L <sup>-1</sup> (s)	<200	500	2000	200	4000	15000
30 mg·L <sup>-1</sup> (ns)	200	5000	40000	200	5000	30000
30 mg·L <sup>-1</sup> (s)	<200	1000	25000	200	4500	15000
30 mg·L <sup>-1</sup> (s, po 3 min.)	200	3500	30000	–	–	–
30 mg·L <sup>-1</sup> (s, po 5 min.)	200	5000	30000	–	–	–
100 mg·L <sup>-1</sup> (ns)	200	6000	40000	200*	5000*	15000*
100 mg·L <sup>-1</sup> (s)	200	4000	40000	200*	4500*	15000*
100 mg·L <sup>-1</sup> (s, po 3 min.)	200	5000	80000	–	–	–

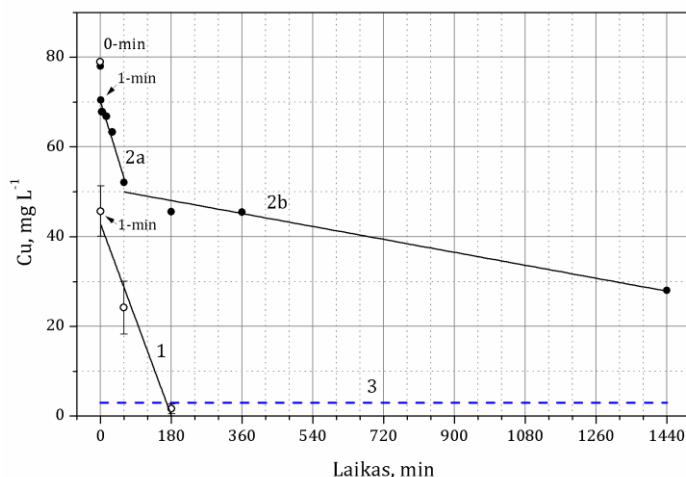
\* matavimas atliktas po sonifikavimo.



**3.1.1 pav.** Nanodalelių matmenų skirstiniai, išmatuoti  $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  nCuO suspensijoje iškart po sonifikavimo ( $A_1$  ir  $A_2$ ), po 3 min. ( $B_1$  ir  $B_2$ ) ir po 5 min. ( $C_1$  ir  $C_2$ ). Pertrauka tarp dviejų gretimų matavimų 5 sek., vieno matavimo trukmė 10 sek.

### 3.1.2. CuO nanodalelių nusėdimo suspensijoje greitis

Per tris valandas suspensijoje, kurios nominali koncentracija iškart po jos sonifikavimo buvo  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  nCuO (arba  $79.9 \text{ mg Cu}\cdot\text{L}^{-1}$ ), stebimas spartus CuO nanodalelių nusėdimas – Petri lėkštelėse ( $h = 1,5 \text{ cm}$ ,  $d = 11 \text{ cm}$ ), kuriose atliktos ląstelių ekspozicijos ląstelių mirtingumui įvertinti, suspensijos ( $h = 1,0\text{--}1,2 \text{ cm}$ ) paviršiniame sluoksnyje ( $0\text{--}0,2 \text{ cm}$ ) lieka vos 2 % pradinės Cu koncentracijos, išmatuotos ICP-OES (3.1.2 pav.). Matuojant vario nusėdimą 50 mL tūrio mėgintuvėlyje ( $h = 10 \text{ cm}$ ,  $d = 2,7 \text{ cm}$ ), kuriuose buvo atliekami Cu matavimai, Cu koncentracija 0,5 cm aukštyje nuo dugno po 3 val. sudarė 58 % pradinės koncentracijos. Praėjus pirmai minutei po suspensijos sonifikavimo, paviršiniame Petri lėkštelės sluoksnyje pradinė koncentracija sumažėjo 42,8 %-ais, o mėgintuvėliuose



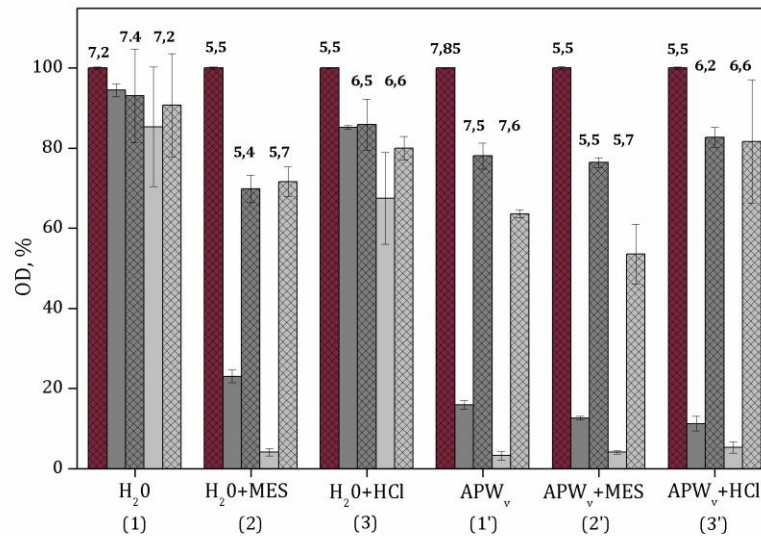
**3.1.2 pav.** CuO nanodalelių aglomeratų nusėdimo kinetika paviršiniame suspensijos (pagamintos kontroliniame tirpale) sluoksnyje Petri lėkštutėse (1) ir mėgintuvėliuose prie dugno (2), matuojant Cu koncentraciją ICP-OES. 3 – vario koncentracija, išmatuota 3,18 mg Cu·L<sup>-1</sup> vario sulfato tirpale.

prie dugno – 10,4 %-ais (3.1.2 pav.). Nusėdimo greitis Petri lėkštelėse 1–180 min. buvo pastovus 0,24±0,04 mg Cu min<sup>-1</sup> (3.1.2 pav. 1 tiesė), tuo tarpu prie dugno Cu koncentracija 1–60 min. mažėjo 0,28 mg Cu min<sup>-1</sup> (2a tiesė), o 60–1440 min. – 0,016±0,002 mg Cu min<sup>-1</sup> (2b tiesė).

### 3.1.3 *Terpės sudėties ir pH įtaka suspensijos fiziniams parametrams*

Terpės pH įtaka tirta 100 mg·L<sup>-1</sup> nCuO suspensijoms, pagamintoms dejonizuotame vandenyje arba APW (3.1.3 pav.). Visais atvejais, tiek po 3val., tiek po 24 val. nuo suspensijos pagaminimo ir sonifikavimo, išskyrus (1) variantą su dejonizuotu vandeniu ir neutraliu pH, optinis tankis sumažėjo (neužbrūkšniuoti stulpeliai 3.1.3 pav.), o tai rodo nCuO dalelių nusėdimą. Po pakartotinio šių suspensijų sonifikavimo 15 min. optinis tankis (OD, λ = 327 nm) vėl padidėjo (2, 1', 2', ir 3' variantai), tačiau ne iki pradinio lygio. Jei OD sumažėjimą po 3 ar 24 val. galima susieti su nusėdimu, tai suspensijų mažesnes OD reikšmes nei pradinės po pakartotinio sonifikavimo turėtume sieti su dalies nCuO dalelių

ištirpimu arba jų aglomeratų susmulkėjimu, darančiu įtaką suspensijos optinėms savybėms.



**3.1.3 pav. .** CuO nanosuspensijų, pagamintų dejonizuotame vandenyje (H<sub>2</sub>O, 1–3) ir kontroliniame tirpale (APW, 1'–3'), optinio tankio (OD) priklausomybė nuo pH. MES – buferinis tirpalas; s – sonifikuota.

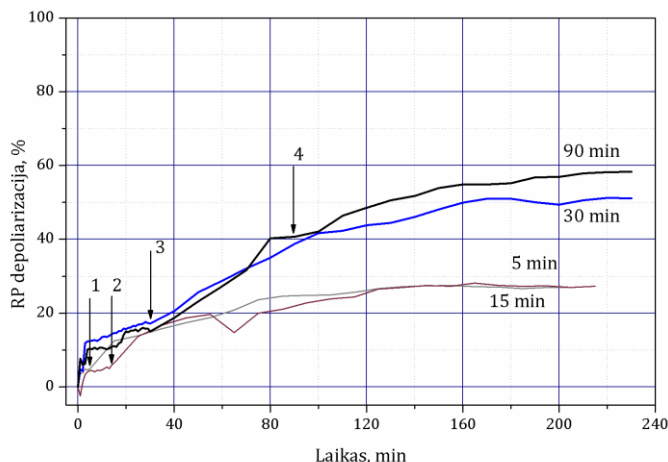
■ – 0-val. (s); ■ – 3-val.; ▨ – 3-val. (s); ▩ – 24-val. ir □ – 24-val. (s).

Dejonizuotame vandenyje pagamintose suspensijose optinio tankio kaita priklausė nuo pH. Dėl MES pridėjimo į suspensijas jų pH buvo gana stabilus ir nuo pradinio 5,5 pakito nedaug ir po 3–24 val., t. y. 5,4–5,7 (3.1.3 pav. variantas 2), jose OD sumažėjo daugiausiai (30 %), palyginus su pH 6,5–6,6 (variantas 3), kai rūgštingumas buvo stabilizuotas tik HCl (20 %) ir su pH 7,2–7,4 (variantas 1), kai pradinė pH vertė nebuvo keičiama – OD reikšmė statistiškai nesiskyrė nuo pradinės. Priešingai, tirpumas kontroliniame tirpale pagamintose suspensijose iš esmės nepriklausė nuo pH suspensijose, išlaikytose 3 val. (3.1.3 pav. variantai 1', 2', ir 3'), nors po 24 val. suspensijose su MES (variantas 2') OD sumažėjimas buvo didžiausias (46,5 %). Jei suspensijose vykstantį dalelių nusėdimą pagrįstai galima vertinti pagal OD sumažėjimą, tai sieti suspensijų OD sumažėjimą su nCuO disociacija galima tik su išlygomis, nes OD pokyčiai yra didesni nei Cu<sup>2+</sup>

koncentracijos pokyčiai. nCuO suspensijos (nominali koncentracija  $79,9 \text{ mg Cu}\cdot\text{L}^{-1}$ , išmatuota –  $76,40 \pm 0,51 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), pagamintos kontroliniame tirpale (pH 7,8), disociaciją įvertinus ultrafiltravimo ir tiesiogiai ICP-OAE metodu išmatuojant vario, kuris po filtravimo pro  $1 \text{ kDa} \sim 1 \text{ nm}$  poros dydžio filtrą prilyginamas vario jonams, koncentraciją, gauta  $0,025 \pm 0,006 \text{ mg Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$  reikšmė, kuri atitinka vos 0,033 % pradinio vario kiekio suspensijoje.

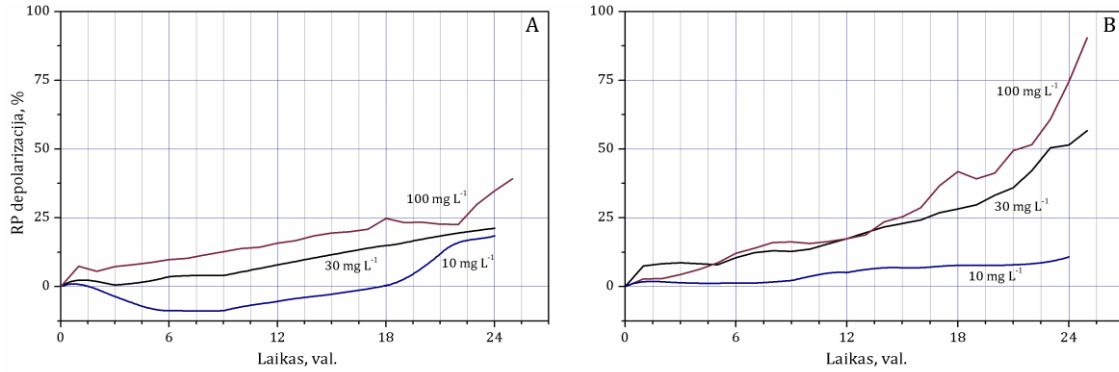
### **3.2. *N. obtusa* ląstelių, veikiamų $\text{CuSO}_4$ ir nCuO, elektrofiziologinis atsakas**

2006–2015 m. buvo periodiškai atliekami elektrofiziologiniai testai su referentine medžiaga,  $\text{CuSO}_4$ . Šių testų atskaitos taškas yra  $\text{IC}_{50}$ , t.y. koncentracija, per 90 minučių sukianti ląstelių vidutinio ramybės potencialo vidurkio 50 % depoliarizaciją. Pagal reguliariai atliekamų testų įvertį yra patikrinama ląstelių funkcinė būklė, nes jų elektrofiziologinis atsakas priklauso nuo dumblių surinkimo sezono ar išlaikymo laboratorijoje trukmės (VITKUS et al., 1998). Nustatyta tokia 90-min  $\text{IC}_{50}$  reikšmė vario sulfato druskai (mediana  $\pm$  se; n):  $4,3 \pm 0,46 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (n = 12 referentinių testų). Ląstelių bioelektrinio atsako kinetika, paveikus  $3,18 \text{ mg Cu}^{2+}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $\text{CuSO}_4$  tirpalas), parodyta 3.2.1 pav. Ši koncentracija darbe panaudota įvairiems tyrimams  $\text{CuSO}_4$  ir nCuO poveikiams palyginti.  $\text{CuSO}_4$  sukelta depoliarizacija prasideda tuojau pat, paveikus ląsteles, per pirmąsias penkias minutes *N. obtusa* ląstelių RP pakinta maždaug 7 % nuo pradinio lygio, po 15 min. ~ 10%, po 30 min. ~ 20 %, o po 90 min. ~ 40 %. Ši koncentracija ląstelėms toksiška, nes net ir po trumpos ekspozicijos ląsteles perkėlus į kontrolinę terpę depoliarizacija išlieka bei stiprėja (po 30 ir 90 min. ekspozicijos).

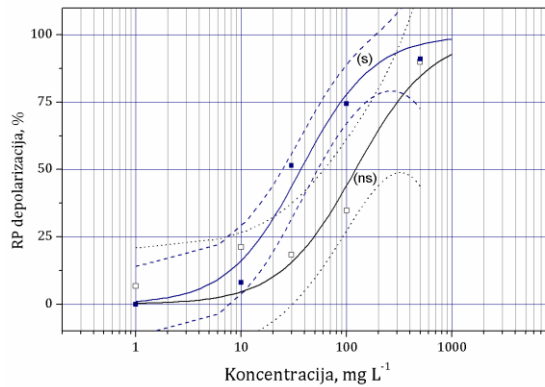


**3.2.1 pav.** *Nitellopsis obtusa* ląstelių ramybės potencialo kinetika, veikiant  $3,18 \text{ mg Cu}^{2+} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $\text{CuSO}_4$ ). Rodyklės žymi poveikio, kuris prasidėjo 0-minutę, pabaigą ir atplovimo kontroliniame tirpale pradžia, po 5 min. (1), 15 min. (2), 30 min. (3) ir 90 min. (4). Kiekviena kreivė gauta iš 14–16 ląstelių atsakų.

Priešingai vario druskų tirpalams, eksperimentų metu išryškėjo savitas  $\text{nCuO}$  suspensijų poveikis menturdumblių ląstelių membranai. Jo negalima charakterizuoti standartine 90-min  $\text{IC}_{50}$  verte, kadangi per šį laiką ląstelės membrana depoliarizuojasi mažiau nei 10 %, net ženkliai didinant  $\text{nCuO}$  koncentraciją. Per ilgesnį laiką išryškėja stipresnis sonifikuotų suspensijų veikimas (3.2.2. pav.), todėl prailginus ekspozicijos trukmę iki paros bei padidinus suspensijos koncentraciją iki  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  buvo įmanoma apskaičiuoti  $\text{IC}_{50}$  iš koncentracijos-atsako kreivių (3.2.3 pav.). Pateikti 24-val.  $\text{IC}_{50}$  įverčiai sonifikuotoms (s) ir nesonifikuotoms (ns) suspensijoms (mediana ir 95 % PI), atitinkamai,  $36,7 (24,8\text{--}53,3) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ir  $122 (58,2\text{--}) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (skirtumas statistiškai reikšmingas).



**3.2.2 pav.** Žvaigždėtojo maurašakio ląstelių vidutinio ramybės potencialo (RP) kinetika, veikiant 10–100 mg·L<sup>-1</sup> nesonifikuotomis (A) ir sonifikuotomis (B) vario oksido nanodalelių suspensijomis. Kiekviena kreivė gauta iš 12–16 ląstelių atsakų.



**3.2.3 pav.** Žvaigždėtojo maurašakio ląstelių, paveiktų 24 val. sonifikuotomis (s) ir nesonifikuotomis (ns) nCuO suspensijomis, vidutinio ramybės potencialo depolarizacijos priklausomybė nuo koncentracijos. Kiekviena kreivė gauta iš 12–16 ląstelių atsakų. Brūkšninėmis ir taškinėmis kreivėmis parodyti atitinkami 95 % pasikliautiniai intervalai.

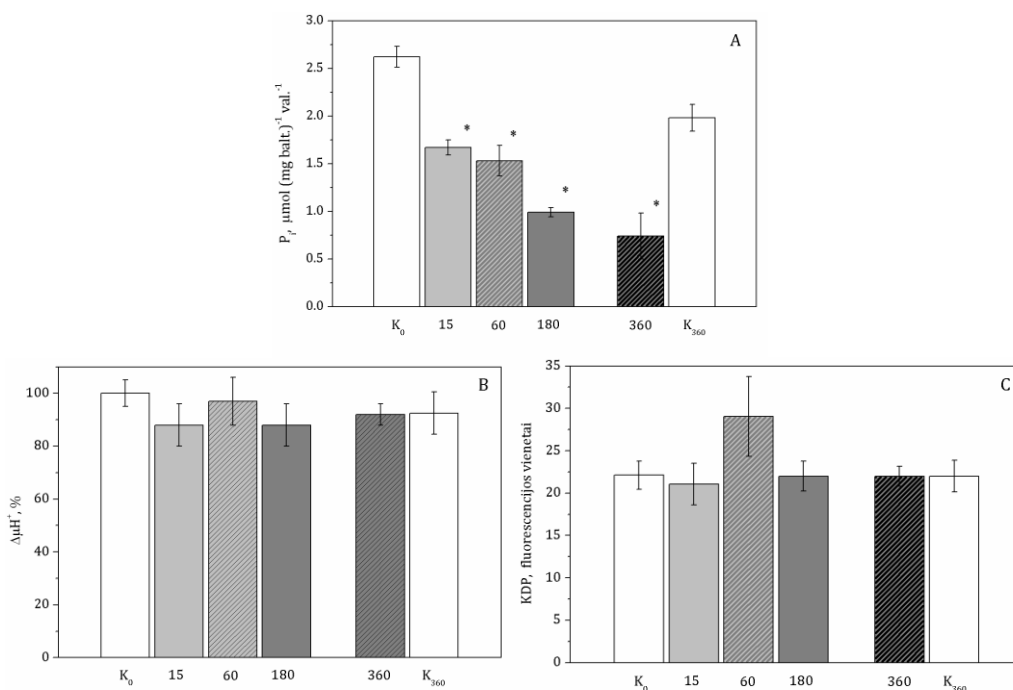
### 3.3. nCuO įtaka *N. obtusa* ląstelių mikrosomų frakcijos membranų funkciniam aktyvumui

Tiriant nCuO nanosuspensijų poveikį *N. obtusa* ląstelės membranose funkcionuojančiai K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-H<sup>+</sup>-ATPazei ir katijonų pernašai, mikrosominė frakcija iš dumblių išskirta ir analizuota iškart po 15, 60, 180 ir 360 min. trukmės išlaikymo 100 mg·L<sup>-1</sup> koncentracijos nCuO suspensijoje. Paveiktų ląstelių H<sup>+</sup>-ATPazės hidrolitinis aktyvumas slopinimas didėjo ilgėjant poveikio trukmei (3.3.1 pav. A). Ilgiausios trukmės (360 min.) poveikis slopino H<sup>+</sup>-ATPazės



aktyvumą 72 %, palyginant su antrąja kontrole ( $K_{360}$ ), t.y., nepaveiktų dumblių ląstelių mikrosomų frakcijos  $H^+$ -ATPazės aktyvumu po 360 min. Per šį laiką mikrosominės frakcijos  $H^+$ -ATPazės aktyvumas kontrolėje sumažėjo ~ 25%.

Priešingai  $H^+$ -ATPazės aktyvumo kaitai, veikiant nCuO suspensijai nebuvo užregistruota žymiai nuo kontrolės besiskiriančių nuo ATP priklausomo transmembraninio elektrocheminio potencialų skirtumo ( $\Delta\mu H^+$ ) (3.3.1 pav. B) ir valinomicino pagalba generuoto kalio difuzinio potencialo (KDP) (3.3.1 pav. C) pokyčių mikrosomų frakcijose, išskirtose iškart po ekspozicijos. Tai rodo, kad, nors paveikus nCuO suspensija, iš *N. obtusa* ląstelių išskirtos mikrosomų frakcijos vezikulėse funkcionuojanti  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ - $H^+$ -ATPazė yra slopinama, tačiau protonų transmembraninis transportas ir pasyvus  $K^+$  pralaidumas nėra sutrikdomi.



**3.3.1 pav.** nCuO suspensijos ( $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) veikimo trukmės (minutėmis) įtaka *N. obtusa* ląstelių membranos  $H^+$ -ATPazės aktyvumui (A), transmembraniam elektrocheminiam potencialui ( $\Delta\mu H^+$ ) (B) bei kalio difuziniam potencialui (KDP) (C).  $K_0$  ir  $K_{360}$  atitinka matavimus kontrolėje, atliktus ekspozicijos pradžioje ir pabaigoje. Mikrosomų frakcija išskirta iškart po inkubacijos su nCuO. Pateikta vidurkis  $\pm$  sn, n = 3.  
\* Statistiškai reikšmingi skirtumai nuo kontrolės ( $p < 0.05$ ).

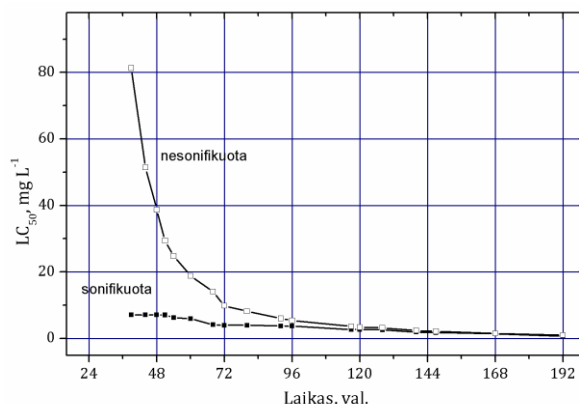
### 3.4. nCuO suspensijų įtaka ląstelių mirtingumui

#### 3.4.1. Sonifikavimo įtaka nanosuspensijų toksiškumui

Nagrinėjant nCuO suspensijos poveikį *N.obtusa* ląstelių mirtingumui pirmiausia nustatyti skirtumai tarp sonifikuotų ir nesonifikuotų nanodalelių suspensijų. Letaliųjų koncentracijų reikšmės pateiktos 3.4.1 lentelėje. Skirtumai tarp sonifikuotų ir nesonifikuotų suspensijų poveikio itin ryškūs pirmąsias 3–4 dienas, vėliau poveikis suvienodėja ir po 8 dienų skirtumas tampa statistiškai nepatikimas.

**3.4.1 lentelė.** *N. obtusa* ląstelių, paveiktų sonifikuotomis ir nesonifikuotomis nCuO suspensijomis, letalumo duomenys (mediana  $\pm$  se), esant įprastoms ūminių biotestų trukmėms. 50 % letaliosios koncentracijos išreikštos  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

nCuO	96 val. LC <sub>50</sub>	192 val. LC <sub>50</sub>
nesonifikuota	4,36 $\pm$ 0,35	0,79 $\pm$ 0,10
sonifikuota	2,81 $\pm$ 0,24	0,59 $\pm$ 0,23



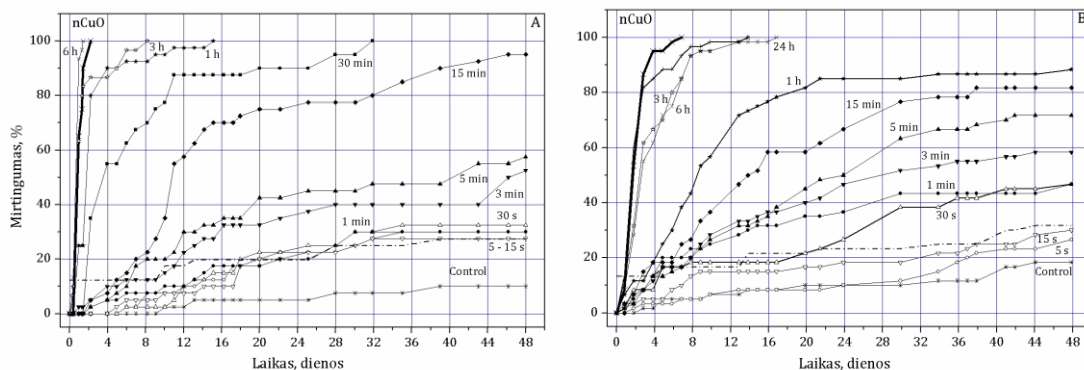
**3.4.1 pav.** Žvaigždėtojo maurašakio ląstelių LC<sub>50</sub> reikšmių kinetika paveikus sonifikuotomis ir nesonifikuotomis vario nanodalelių suspensijomis.

#### 3.4.2 Poveikio trukmės įtaka *N.obtusa* ląstelių mirtingumui

Trumpalaikių ekspoziciją įtaka *N. obtusa* ląstelių mirtingumui tirta panaudojus vario druskos koncentraciją  $3.18 \text{ mg Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$  ir nCuO suspensijų koncentracijas 3,2; 7,99; 23,97 ir 79,9;  $\text{mg Cu L}^{-1}$ . Didžiausia suspensijos ir

tirpalo koncentracijos padidintos ~ 150 kartų, palyginus su 8 dienų letaliosiomis koncentracijomis. Darbe nustatyta vario sulfato 8-d.  $LC_{50} = 0.024 \pm 0.007 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  reikšmė (mediana  $\pm$  se). Palyginimui, atitinkama 4-d.  $LC_{50} = 0.128 \pm 0.027 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (MANUSADŽIANAS et al., 2002). Padidintos koncentracijos pasirinktos siekiant tenkinti ląstelėse sukaupto per trumpą ekspoziciją vario cheminės analizės jautrumo reikalavimus.

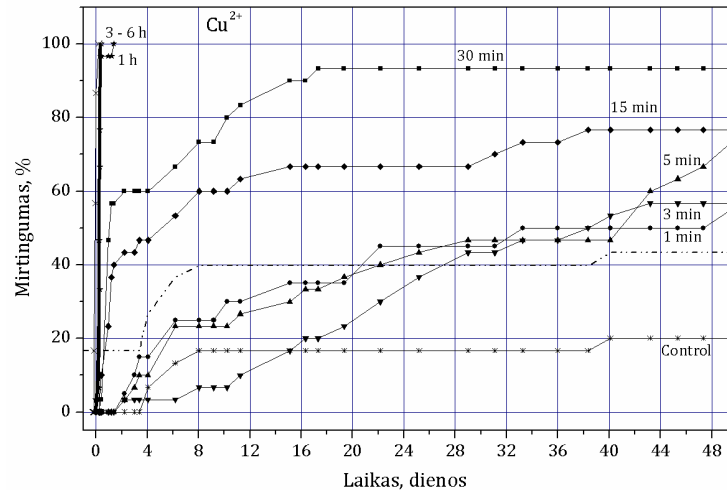
Paveikus ląsteles  $n\text{CuO}$   $79,9 \text{ mg Cu}\cdot\text{L}^{-1}$  koncentracija greitas (iki 2 dienų) 50 % viršijantis mirtingumas sukeliamas per vienos valandos ir ilgesnės trukmės ekspozicijas (3.4.2 pav. A). Po 4 dienų 50% mirtingumą jau viršija 30 min. poveikio trukmė, tuo tarpu 15 min trukmės ekspozicija sukelia 50% mirtingumą tik dešimtą dieną nuo atplovimo pradžios. Tuo pačiu metu, ir statistiškai reikšmingai ( $p < 0,05$ ) palyginant su kontroline ląstelių grupe, mirtingumas padidėja ir 3–5 min. eksponuotose ląstelėse. Nanosuspensijoje 5 sek.–1 min. eksponuotos ląstelės nepasiekė 50% mirtingumo, tačiau statistiškai reikšmingas skirtumas nuo kontrolinės ląstelių grupės išryškėjo po 1 mėn. nuo atplovimo pradžios.



**3.4.2 pav.** *N. obtusa* ląstelių mirtingumo kinetika kontrolinėje terpėje, po 5 sek.–24 val. ekspozicijos. A –  $79.89 \text{ mg Cu}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} n\text{CuO}$ ) ir B –  $23.97 \text{ Cu}^{2+} \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} n\text{CuO}$ ) suspensijose. Pastorintos kreivės žymi nuolatinę ekspoziciją  $n\text{CuO}$  suspensijoje. Brūkšninė taškinė linija žymi statistiškai reikšmingą skirtumą nuo kontrolinės ląstelių grupės ( $\alpha = 0.05$ );  $n = 40$  ir  $60$  ląstelių kiekvienam variantui, atitinkamai (A) ir (B).

nCuO koncentraciją sumažinus tris kartus iki  $23.97 \text{ mg Cu}\cdot\text{L}^{-1}$  (3.4.2 pav. B) nuolatinė ekspozicija 100 % mirtingumą sukelia po 7 dienų. 3–6 val. ekspozicijos trukmės paveiktos ląstelės 50 % mirtingumą viršija po 2 dienų nuo poveikio pradžios. 1 val. ekspozicijos trukmės įtaka ląstelių žuvimui statistiškai reikšmingai nuo kontrolinės grupės atsiskiria 4-ą dieną, 1–5 min. paveiktos ląstelės 6-ą dieną nuo atplovimo kontrolinėje terpėje pradžios, o 30 sek. – 20-ą dieną. 5–15 sek. eksponuotų nCuO  $23.97 \text{ mg Cu}\cdot\text{L}^{-1}$  koncentracijos suspensijoje *N. obtusa* ląstelių mirtingumas statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo kontrolinės ląstelių grupės mirtingumo, taigi šioje koncentracijoje 30 sek. poveikio trukmę galima laikyti poveikio slenksčiu – tokiu trumpiausiu ekspozicijos laiku, kuris sukelia statistiškai reikšmingą mirtingumo efektą perkeltoms į kontrolinę terpę ląstelėms, palyginus su nanosuspensija nepaveiktų dumblių ląstelių mirtingumu.

Mažesnių koncentracijų, 4 ir  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $3,2$  ir  $7.99 \text{ mg Cu}\cdot\text{L}^{-1}$ , atitinkamai), nCuO suspensijos veikia panašiai esant nuolatinei ekspozicijai, sukeldamos 95 % mirtingumą po 24–26 dienų. Toks panašus poveikis buvo stebėtas ląsteles išlaikius 24–48 valandas  $7,99 \text{ mg Cu}\cdot\text{L}^{-1}$  suspensijoje, tačiau  $3,2 \text{ mg Cu}\cdot\text{L}^{-1}$  koncentracijos suspensijoje išlaikytų 24 valandas ląstelių 95 % mirtingumas stebėtas jau po 36 dienų. Pastarosios koncentracijos suspensijoje trumpiau, 15 min.–6 val., eksponuotų ląstelių 50 % mirtingumas užregistruotas po 36 parų nuo ekspozicijos pabaigos. Šiai  $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  nCuO suspensijai poveikio slenkstis – trys minutės (žūties tikimybė statistiškai patikimai skiriasi nuo kontrolės po 48 dienų).  $7,99 \text{ mg Cu}\cdot\text{L}^{-1}$  suspensijoje trumpiau, 1 min.–1 val., veiktų ląstelių 50 % mirtingumas stebėtas po 48 dienų nuo ekspozicijos pabaigos. 5 sek.–30 sek. trukmės ekspozicija nesukėlė statistiškai reikšmingos žūties, palyginant su kontroline ląstelių grupe, todėl poveikio slenkstis, paveikus  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  nCuO suspensija – viena minutė (po 48 dienų).

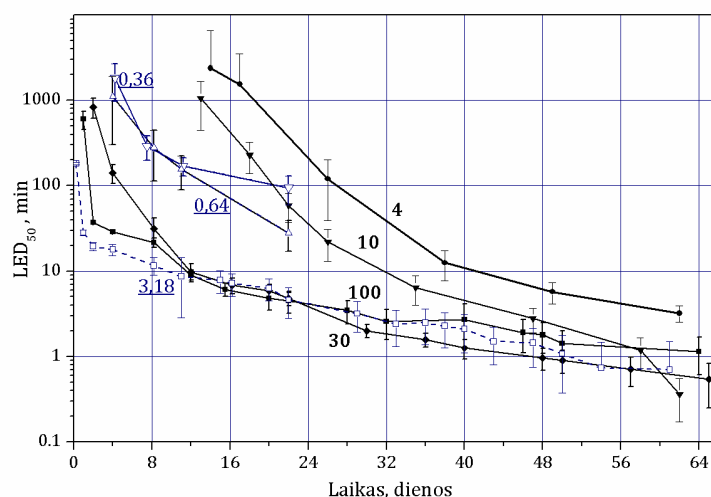


**3.4.3 pav.** *N. obtusa* ląstelių mirtingumo kinetika kontrolinėje terpėje, po 1 min.–6 val. ekspozicijos  $3.18 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$ . Pastorinta kreivė žymi pastovią ekspoziciją tirpale. Brūkšninė taškinė linija žymi statistiškai reikšmingą skirtumą nuo kontrolinės ląstelių grupės ( $\alpha = 0.05$ );  $n = 30$ .

Menturdumblių ląsteles paveikus  $3,18 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$  tirpalu 15 min.–6 val., statistiškai reikšmingai nuo kontrolės besiskiriantis mirtingumas kontrolinėje terpėje stebimas jau pirmąją parą (3.4.3 pav.). Tuomet žūsta visos nuolatinį  $\text{CuSO}_4$  poveikį patiriančios ląstelės bei 3–6 val. eksponuotos ląstelės. Per antrą parą 100% mirtingumą pasiekia ir 1 val. eksponuotos ląstelės. 15-os min. poveikis po 4 dienų sukelia 45 % mirtingumą, po 8 dienų – 60 %. Po 27 dienų atplovimo statistiškai reikšmingai nuo kontrolinės ląstelių grupės atsiskiria 1 min ekspozicijos trukmė, todėl  $3.18 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  vario sulfato poveikio slenksčiu laikome 1 min.

Palyginę vario sulfato (3.4.3 pav.) bei vario oksido nanosuspensijų (3.4.2 pav.) poveikius matome, kad, esant ilgesnėms poveikio trukmėms (1–6 val.)  $n\text{CuO}$  suspensijos sukelia vėlesnę ląstelių žūtį (pasižymi atidėtu toksiniu poveikiu). Trumpesnės ekspozicijos stebėtoju 48 dienų po poveikio metu sukelia panašaus dydžio ląstelių letalumą.

Letaliosios ekspozicijos trukmės ( $LED_{50}$ ) vertės apskaičiuotos įvertinus ląstelių letalumo kinetikos duomenis eksponavus keturių koncentracijų nCuO suspensijomis, bei trijų koncentracijų vario druskų tirpalais. Didesnių – 30 ir 100  $mg \cdot L^{-1}$  nCuO suspensijų sukeltas poveikis skirtingas tik pirmas 12 dienų, po to iki eksperimento pabaigos  $LED_{50}$  reikšmės kinta nedaug ir reikšmingai nesiskiria. Mažesnės koncentracijos nCuO suspensijos (4 ir 10  $mg \cdot L^{-1}$ ) per pirmas dvi savaites nuo atplovimo pradžios nesukėlė didesnio nei 50 % ląstelių mirtingumo ląstelėms pasirinktame ekspozicijų intervale, todėl  $LED_{50}$  reikšmės neapskaičiuotos. Po 35 dienų nuo ekspozicijos pabaigos 10  $mg \cdot L^{-1}$  nCuO suspensijoje (atplovimo kontrolinėje terpėje pradžios) apskaičiuota  $LED_{50}$  reikšmė ( $6,4 \pm 2,5$  min.) statistiškai nesiskiria nuo 100  $mg \cdot L^{-1}$  nCuO  $LED_{50}$ .



**3.4.4 pav.** 50% letaliosios ekspozicijos trukmės ( $LED_{50}$ , mediana  $\pm$  se) kinetika paveikus *N. obtusa* ląsteles vario druskų tirpalais (0,36; 0,64; 3,18  $Cu \text{ mg} \cdot L^{-1}$ , pabraukti skaičiai) ir nCuO suspensijomis (4; 10; 30; 100  $mg \cdot L^{-1}$  CuO, paryškinti skaičiai).

reikšmės ( $2,7 \pm 1,4$  min.). Eksperimento pabaigoje (62 dieną) jau ir 4  $mg \cdot L^{-1}$  nCuO suspensija sukelia mirtingumą, kurio  $LED_{50}$  reikšmė  $3,2 \pm 0,7$  min., o tai, palyginus su 100  $mg \cdot L^{-1}$  suspensijai gauta  $LED_{50}$  reikšmė  $1,14 \pm 0,5$  min., skiriasi tik apie 3 kartus.

Vario druskų tirpalų atveju apskaičiuotos šios LED<sub>50</sub> reikšmės: 0,36 mg·L<sup>-1</sup> vario druskos tirpale 94,5 ± 35 min., 0,64 mg·L<sup>-1</sup> – 27, 9 ± 11 min. ir 3,18 mg·L<sup>-1</sup> – 4,6 ± 1,8 min., (3.4.4 pav.). Didžiausia CuSO<sub>4</sub> tirpalo koncentracija paveiktų ląstelių LED<sub>50</sub> reikšmės nuo 12 iki 64-os dienos nesiskyrė nuo LED<sub>50</sub> reikšmių, gautų 30 ir 100 mg Cu·L<sup>-1</sup> nCuO suspensijoms.

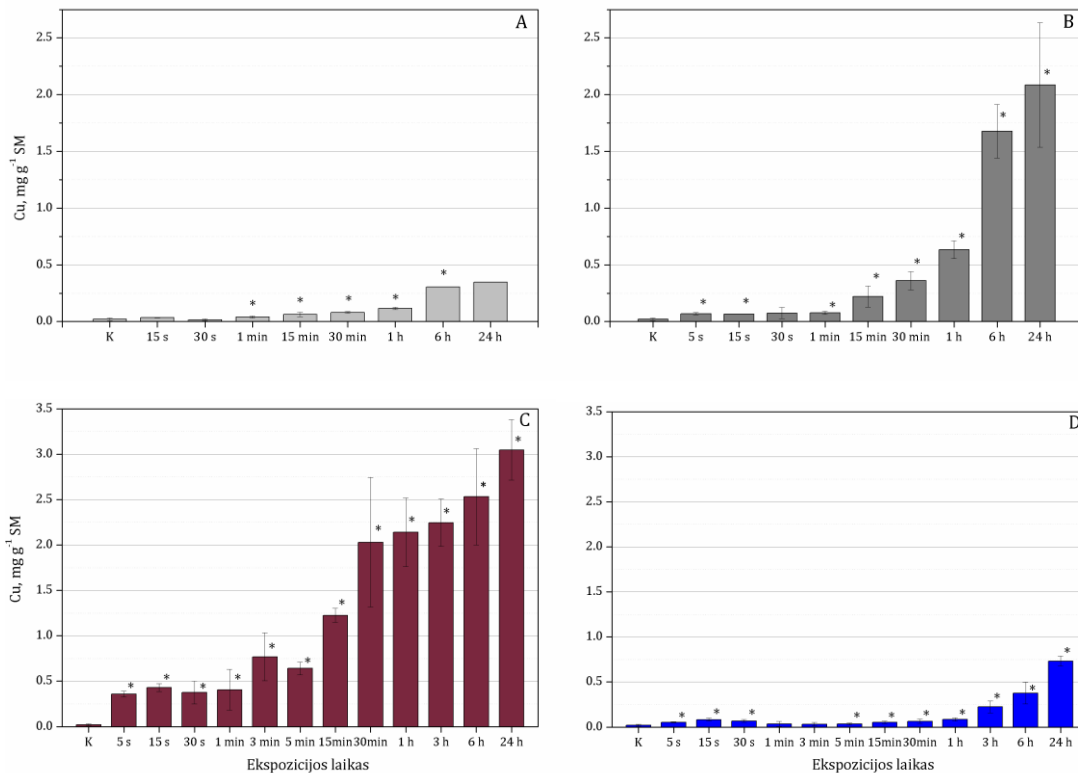
### **3.5. Vario kaupimasis *N. obtusa* ląstelėje ir jos dalyse**

#### **3.5.1. Vario kaupimasis dumblių ląstelėje**

Vario kaupimosi dinamika dumblių ląstelėse matuota ląsteles paveikus 4, 30, ir 100 mg·L<sup>-1</sup> nCuO suspensijomis (atitinkamai 3,20, 24,0 ir 79,9 mg Cu·L<sup>-1</sup>) bei 5 10<sup>-5</sup> M vario sulfato tirpalu (3,18 mg Cu<sup>2+</sup> L<sup>-1</sup>) (3.5.1 pav.). Nustatyta aiški sukaupto vario kiekio ląstelės sausos sausojoje masėje (SM) priklausomybė nuo nCuO suspensijos koncentracijos visame tirtame ekspozicijų diapazone (3.5.1A–C pav.). Veikiant 4 ir 30 mg·L<sup>-1</sup> koncentracijų suspensijoms artimas eksponentiniam vario kaupimo didėjimas buvo stebimas 15 min.–6 val.; po ilgiausios 24 val. trukmės ląstelių ekspozicijos, Cu kiekis ląstelėje padidėjo santykinai nedaug, atitinkamai, 13,5 ir 24,3 % nuo kiekio, sukaupto po 6 val. (3.5.1 A ir B pav.). Veikiant 100 mg·L<sup>-1</sup> suspensijai, Cu kiekio eksponentinio augimo dumblių ląstelėse fazė prasidėjo 3–5 min. ir baigėsi po 3–6 val.; panašiai, kaip ir mažesnių koncentracijų atveju, po 24 val. Cu kiekis padidėjo santykinai nedaug, palyginus su sukauptu kiekiu po 6 val., 20,4 % (3.5.1C pav.). Po 5–15 sek. sukaupto ląstelėse vienam SM vienetui Cu kiekis nebekito per pirmąją ekspozicijos minutę visais tirtų nCuO suspensijų koncentracijų atvejais. Statistiškai patikimas vario kiekių skirtumas nuo kontrolės sukaupiamas ląsteles išlaikius 30 ir 100 mg·L<sup>-1</sup> nanosuspensijose vos 5 sekundes (3.5.1 pav. B ir C). Vario kiekis, sukauptas ląstelėse po 6 val. ekspozicijos 4, 30 ir 100 mg·L<sup>-1</sup> nCuO suspensijose buvo, atitinkamai, (vidurkis±sn, n): 0,31±0,001 (2); 1,68±0,24 (2) ir 3,11±2,53 mg Cu g<sup>-1</sup> SM (3) (vidurkis±sn, n=3).

Dumblių ląsteles veikiant  $\text{CuSO}_4$  tirpalu, ( $3,18 \text{ mg Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$ ) artimas eksponentiniam vario kaupimo didėjimas buvo stebimas, esant ilgesnės trukmės ekspozicijoms, nuo 1 iki 24 val. (3.5.1 pav. D). Palyginę kaupimosi ląstelėje kinetiką išlaikant ją  $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  nCuO suspensijoje ( $3,20 \text{ mg Cu} \cdot \text{L}^{-1}$ ) ir vario sulfato tirpale matome, kad sukaupti vario kiekiai tais pačiais laiko momentais labai panašūs, pvz., po 30 min, 1 val. ir 6 val. vario kiekiai suspensijoje ir tirpale nesiskiria (t-testas,  $\alpha = 0,05$ ), nors po 24 val. eksponavimo vario jonų tirpale eksponuotose ląstelėse buvo išmatuotas didesnis sukaupto vario kiekis (3.5.1 pav. A ir D). Panašų palyginimą atlikdami ne pagal vienodą nominalų vario kiekį suspensijoje ir tirpale, o pagal suspensijos ir tirpalo sukeliama vienodą toksikologinį atsaką, turime palyginti atitinkamų veikliųjų koncentracijų sukeliama įtaką vario kaupimuisi. Mūsų atveju, dvi koncentracijos, kurios sukelia pusės veikiamų per 8 dienas ląstelių žūtį –  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  nCuO ir  $3,18 \text{ mg Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$  (kiekviena jų maždaug 150 kartų viršija veikliąsias, 8-d.  $\text{LC}_{50}$  reikšmes). Nanosuspensijos atveju buvo sukaupti žymiai didesni vario kiekiai – per visas tirtas ekspozicijos trukmes sukaupto ląstelėse Cu santykis, paveikus skirtingų cheminių formų variu,  $\text{Cu}_{\text{nano}} / \text{Cu}_{\text{druska}}$  buvo mažiausiai 5 (išskyrus 24 val.), o maksimalus santykis 19 ir 9 gautas, atitinkamai, po 1 ir 3 val. ekspozicijos, t. y. eksponentinio Cu kaupimo fazėje.



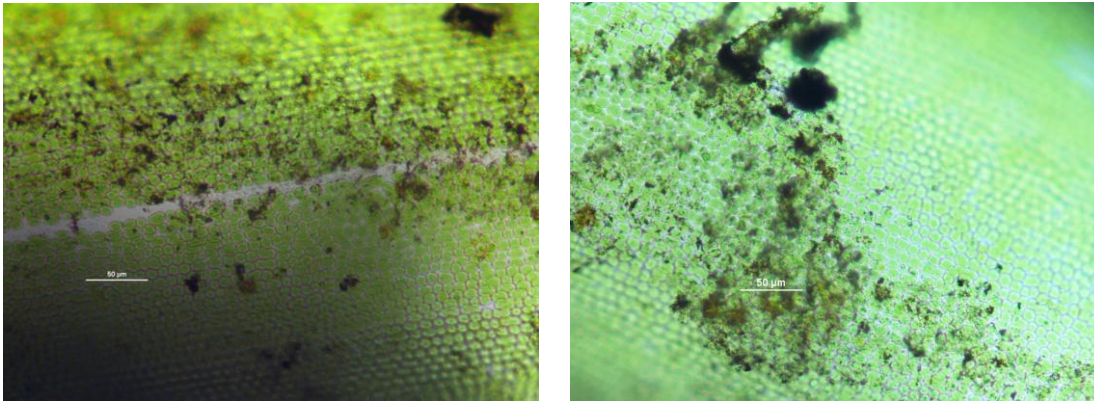


**3.5.1 pav.** Vario kaupimasis *N. obtusa* ląstelėse ( $\text{mg g}^{-1}$  SM), jas išlaikius nuo 5 s iki 24 h skirtingos koncentracijos CuO nanosuspensijose –  $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (A),  $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (B) ir  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (C) bei  $\text{CuSO}_4$  tirpale –  $3,18 \text{ mg Cu L}^{-1}$  (D). Žvaigždute pažymėti statistiškai reikšmingi skirtumai nuo kontrolės ( $\alpha = 0,05$ ).

### 3.5.2. Vario kaupimasis atskiruose ląstelės kompartmentuose

Vario kiekio sukaupimas atskiruose ląstelės dalyse tirtas po 3 val. eksponavimo vienodų veiklių koncentracijų,  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  nCuO suspensijoje bei  $3,18 \text{ mg Cu}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$  tirpale. Suspensijos atveju šviesiniu mikroskopu matomi *N. obtusa* ląstelių paviršiuje susikaupę vario oksido nanodalelių aglomeratai (3.5.2 pav.). Paveiktą nanosuspensija ląstelių paviršių tiriant skenuojančiu elektroniniu mikroskopu taip pat matomi didesni ar mažesni nCuO agregatai (šviesūs grūdėliai 3.5.3 pav.), netolygiai padengiantys ląstelės paviršių. Atskiruose matavimo taškuose Cu koncentracija gali siekti iki 70 % (spektras Nr. 1). Palyginimui, zonose, padengtose netirpaus  $\text{CaCO}_3$  nuosėdomis (spektras Nr. 2) ar

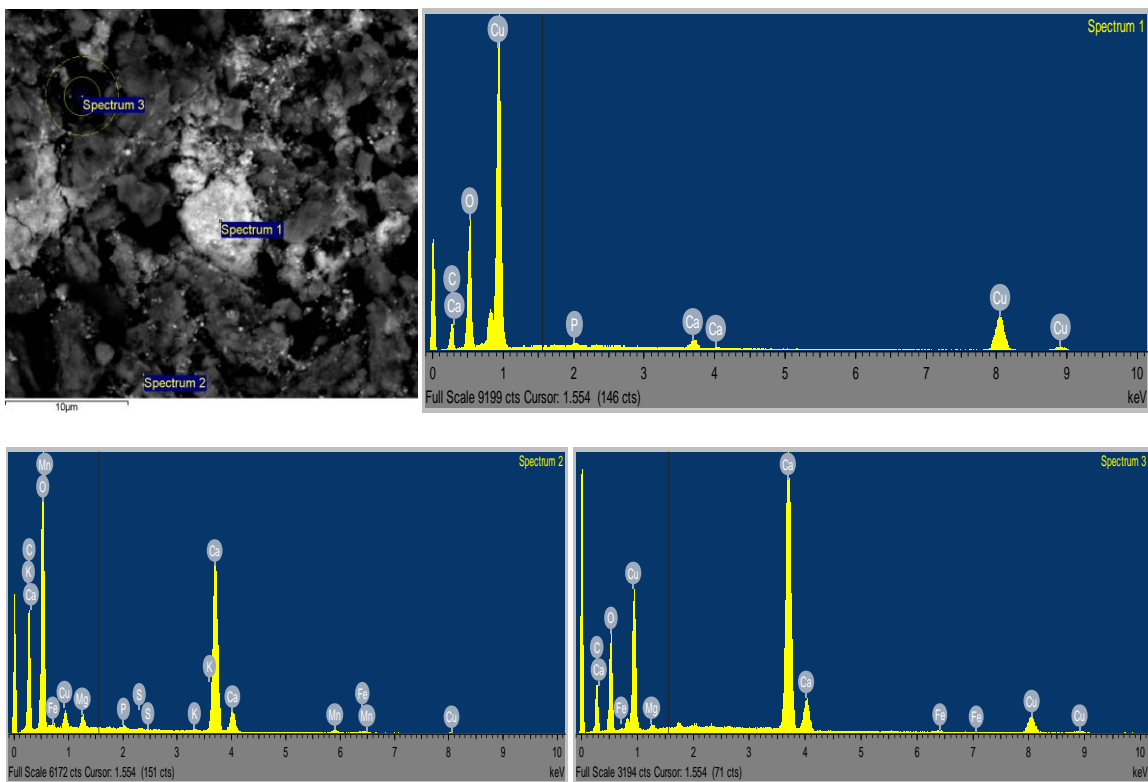
nepadengtose ląstelės sienelės vietose (tamsios zonos, spektras Nr. 3) ryškus Ca įnašas.



**3.5.2 pav.** nCuO aglomeratai žvaigždėtojo maurašakio ląstelės paviršiuje. Nuotraukoje kairėje matosi skiriamoji chloroplastų eilėmis nepadengta riba tarp dviejų priešinga kryptimi judančių citoplazmos srautų. Baltas brūkšnyš žymi 50 μm palyginamąjį matmenį.

3.5.4 paveiksle gerai matomas *N obtusa* ląstelės paviršius, padengtas nCuO dalelių aglomeratais ir dėl ląstelės sienelėje esančių šarminių zonų susidariusiomis netirpiomis CaCO<sub>3</sub> nuosėdomis (HOMBLÉ et AL., 1990). Šioje SEM nuotraukoje aiškiai išsiskiria ir nekalciniotos ląstelės sienelės paviršiaus plotas (tamsios lygios zonos), kuriame nusėdusios nCuO dalelės.

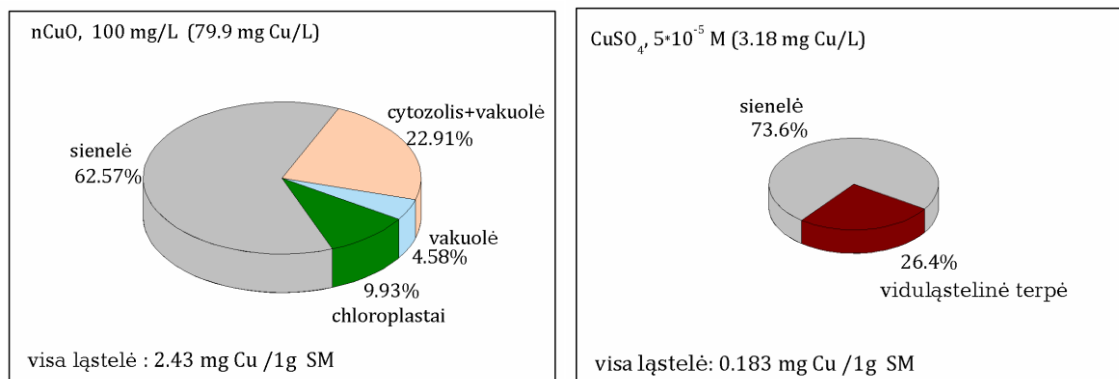
Tiek nCuO suspensijos, tiek vario sulfato tirpalo atveju didžioji vario dalis sukaupiama ląstelės sienelėje, atitinkamai,  $1,52 \pm 0,29$  (3) ir  $0,22 \pm 0,012$  (3) mg Cu g<sup>-1</sup> SM, o tai sudaro 62,1 % ir 73,6 % nuo vario kiekio, išmatuoto visoje ląstelėje (3.5.5 pav.). Skirtumai tarp visoje ląstelėje ir ląstelės sienelėje išmatuoto Cu abiejų poveikių atvejais buvo reikšmingi ( $\alpha = 0,05$ ) (3.5.5 pav.), rodantys, kad dalis Cu patenka į viduląstelinę terpę. Tiriant ląstelių vidiniame turinyje (be ląstelės sienelės) susidariusią Cu koncentraciją, nustatyta, kad suspensijos atveju ji yra maždaug tris kartus didesnė nei ląsteles paveikus CuSO<sub>4</sub> tirpalu, atitinkamai,  $0,54 \pm 0,19$  (3) ir  $0,16 \pm 0,038$  (3) mg·L<sup>-1</sup> (3.5.6 pav.).



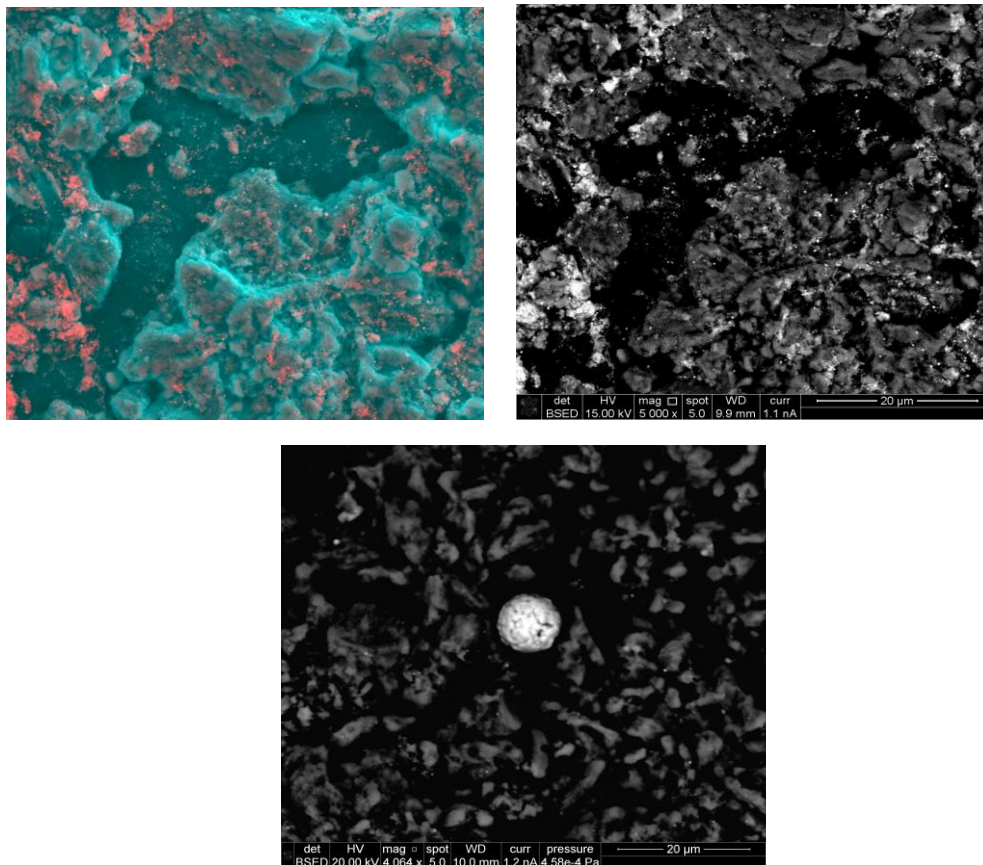
**3.5.3 pav.** Dumblių ląstelės paviršiaus SEM nuotrauka su pažymėtomis vietomis, kuriose rentgeno spindulių išsklidymo (EDX) analizės sistema nustatytas elementinės sudėties spektras (tiriamąjį taškelio skersmuo 5 μm). Brūkšnys nuotraukos apačioje kairėje žymi 10 μm atstumą.

Sukauptas nanosuspensija paveiktose ląstelėse varis pasiskirsto taip: 26 % chloroplastuose, 12 % vakuolėje ir apie 60% citoplazmos-vakuolės mišinyje. Darant prielaidą, kad vakuolė užima 90–95 % ląstelės tūrio, buvo apskaičiuotos Cu koncentracijos atskirai citoplazmos ir vakuolės kompartmentams – citoplazmai kartu su chloroplastais  $0,488 \pm 0,02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (3) arba 90 % viso sukaupto viduląstelinio Cu.

CuSO<sub>4</sub> koncentraciją padidinus 10 kartų (iki  $31,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) ir esant tai pačiai 3 val. ekspozicijos trukmei, vidiniame ląstelės turinyje Cu koncentracija pasiekia  $0,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Tokios koncentracijos Cu<sup>2+</sup> poveikis sukelia neišvengiamą ląstelių žūtį, jei ekspozicija prailginama vos keliomis valandomis.

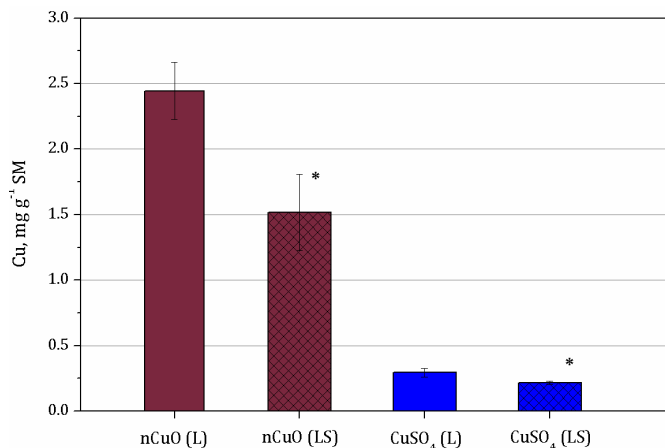


**3.5.4 pav.** Vario procentinis pasiskirstymas ląstelėje po 3 val. poveikio nCuO suspensijoje (100 mg·L<sup>-1</sup>) ir CuSO<sub>4</sub> tirpale (3,18 mg Cu L<sup>-1</sup>).



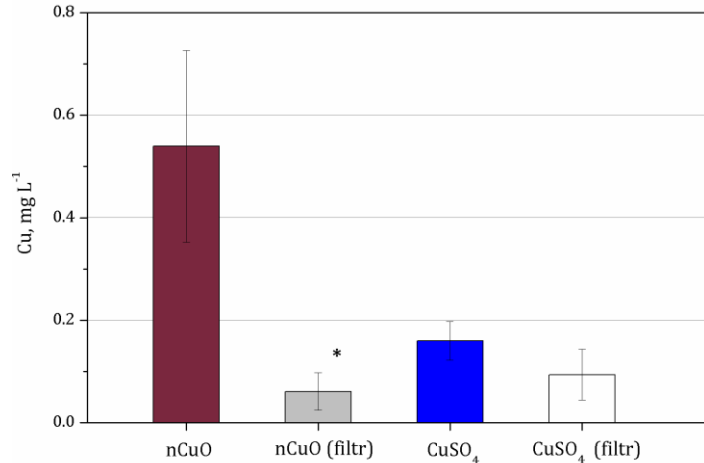
**3.5.5 pav.** Dumблиų ląstelės paviršiaus SEM nuotraukos. Rausva spalva pažymėti nCuO aglomeratai. Apačioje – maždaug 10 μm skersmens nCuO aglomeratas; atskirų aglomerato dalelių skersmuo 0,8–1,2 μm. Brūkšnys apačioje dešinėje žymi 20 μm palyginamąjį matmenį.

Tirpioji vario jonų frakcija viduląsteliniame turinyje įvertinta panaudojus ultrafiltravimą (1 kDa). Nanosuspensija paveiktose ląstelėse nustatyta  $0,061 \pm 0,037 \text{ mg Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$  ( $n = 3$ ) koncentracija, maždaug dešimtadalis nuo visos Cu koncentracijos, t. y.  $0,539 \pm 0,187 \text{ mg Cu} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $n = 3$ ) (3.5.6 pav.).  $\text{CuSO}_4$  atveju išmatuota  $0,094 \pm 0,050 \text{ mg Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$  ( $n = 3$ ) koncentracija, maždaug 60 % nuo visos Cu koncentracijos, t. y.  $0,160 \pm 0,038 \text{ mg Cu} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $n = 3$ ) (3.5.6 pav.).



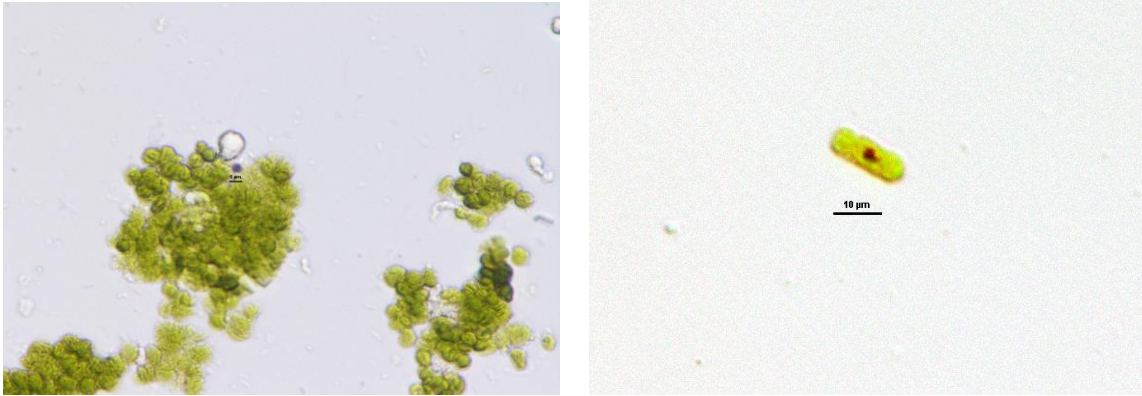
**3.5.6 pav.** Vario kaupimasis visoje *N. obtusa* ląstelėje (L) ir atskirai ląstelės sienelėje (LS) ( $\text{mg g}^{-1} \text{ SM}$ ), jas išlaikius 3 val. nCuO suspensijoje ( $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) ar  $\text{CuSO}_4$  tirpale ( $3,18 \text{ mg Cu L}^{-1}$ ). Pateikta vidurkis  $\pm$  sn ( $n=3$ ).

Išmatavus paveiktų nanosuspensija ląstelių viduląstelinio turinio atskirose frakcijose susikaupusį varį, gauta, kad jo koncentracija ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) vakuolėje yra  $0,039 \pm 0,006$  ( $n = 3$ ), vakuolės-citoplazmos mišinyje  $0,20 \pm 0,10$  (3) ir chloroplastuose  $0,072 \pm 0,037$  (6).  $\text{Cu}^{2+}$  koncentracija vakuolės ultrafiltrate sudarė  $0,013 \pm 0,023$  (3) vakuolės-citoplazmos mišinio –  $0,139 \pm 0,069$  (3). Atsižvelgus į vakuolės užimamą ląstelės tūrio dalį menturdumblių ląstelėse (90–95 %) bei į tai,

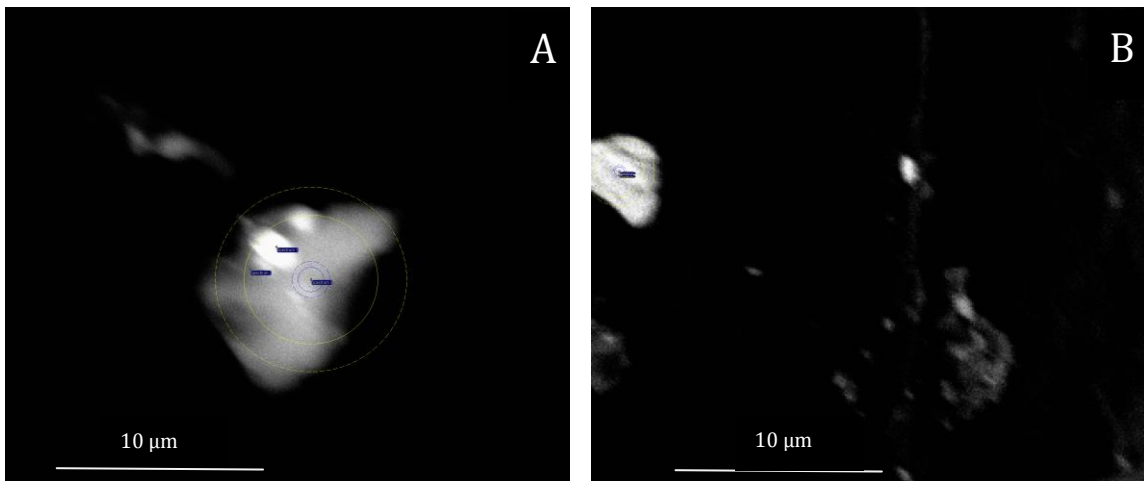


**3.5.7 pav.** Viduląstelinio Cu koncentracija *N. obtusa* ląstelėje ir viduląstelinės terpės filtratuose ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), jas išlaikius 3 h nCuO suspensijoje ( $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) ar  $\text{CuSO}_4$  tirpale ( $3,18 \text{ mg Cu}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Pateikta vidurkis  $\pm$  sn ( $n=3$ ).

kad citoplazma sumišusi su vakuole, įvertintas  $\text{Cu}^{2+}$  pasiskirstymas ląstelės kompartmentuose – vakuolėje 50 %, citoplazmos-vakuolės mišinyje 27 %. Chloroplastų frakcija dėl savo struktūros filtruota nebuvo. Nors šių ląstelės dalių  $\text{Cu}^{2+}$  koncentracijos nuo atitinkamų bendrųjų Cu koncentracijų skyrėsi statistiškai nereikšmingai, negalima atmesti, kad nCuO nepateko į ląsteles. Šviesinio mikroskopo ir SEM nuotraukose matome prie chloroplastų (3.5.7 pav.) ir vakuolės ar citoplazmos-vakuolės fragmentų prikibusių nCuO (3.5.8 pav.) aglomeratų. Pataraisiais atvejais elementinės sudėties spektre esama ir vario smailių (iki 20 % bendrojo kiekio).



**3.5.8 pav.** Vario oksido aglomeratai chloroplastų suspensijoje (A) ir asocijuoti su atskiru chloroplastu (B). Brūkšniai žymi 5 µm (A) ir 10 µm (B) palyginamuosius matmenis.



**3.5.9 pav.** Vario oksido agregatai ląstelės vakuolėje (A) ir citoplazmos-vakuolės mišinyje (B). Melsvais brūkšniais pažymėtos elementų sudėties analizės vietos. Brūkšniai žymi 10 µm palyginamuosius matmenis.

#### 4. REZULTATŲ APTARIMAS

Dirbtinai sukurtų vario oksido nanodalelių poveikio ekotoksikologinių aspektų tyrinėjimus paskatino jų aptikimo hidrosferoje faktas (BLAISE et al., 2008; TURNER, 2010). Yrant šioms nanodalelėms atpalaiduojami vario jonai, kurie, nors yra būtini mikroelementai, pasižymi dideliu toksiškumu vandens organizmams. Didesnis vario druskų nei nCuO toksiškumas konstatuotas apibendrinus įvairioms trofinėms grandims atstovaujančių organizmų jautrumus šių skirtingų cheminių vario formų junginiams duomenis, tarp jų vienaląsčių dumblių, vėžiagyvių, verpečių, bakterijų, pirmuonių, žuvų (ADAM et al., 2015a). Mūsų darbe tirtos makrofitinio dumblio žvaigždėtojo maurašakio (*Nitellopsis obtusa*) ląstelių letalumo reakcijos taip pat patvirtino šį dėsnį – 8-d. LC<sub>50</sub> reikšmių, gautų paveikus nCuO ir CuSO<sub>4</sub> (0,69 ir 0,024 mg Cu·L<sup>-1</sup>, atitinkamai), santykis 23. Panašus dydis (35) buvo nustatytas iš 3-d. augimo slopinimo tyrimo duomenų vienaląsčiams dumbliams *Pseudokirchneriella subcapitata* (ARUOJA et al., 2009).

Ankstesniuose tyrimuose pastebėta, kad menturdumblių ląsteles paveikus nepalankiais cheminiais ar fizinkiniais faktoriais pasireiškia greita elektrofiziologinė reakcija, charakterizuojama išorinės ląstelės membranos (plazmolemos) ramybės potencialo (RP) pokyčiu. Toksiškumas čia siejamas su ląstelės RP depoliarizacija, t.y. jo absoliutinio dydžio sumažėjimu paveikus tiriamuoju tirpalu. Unifikuotame menturdumblių bioteste naudojamas per 45–90 min. įvykstančios RP 50% depoliarizacijos atskaitos taškas (IC<sub>50</sub>). (MANUSADŽIANAS et al., 1999, 2010; BARTUSEVIČIENĖ et MANUSADŽIANAS, 2003) Palyginti greitai stebimi menturdumblių elektrofiziologinės reakcijos pokyčiai yra laikomi ūminio poveikio požymiu. Šiame teste gaunamos 90-min. IC<sub>50</sub> reikšmės paprastai yra didesnės nei 4-d. LC<sub>50</sub> reikšmės. Sunkiųjų metalų druskų atveju IC<sub>50</sub> reikšmės esti iki 3-jų eilių didesnės nei LC<sub>50</sub> reikšmės (*N. obtusa* ląstelėms) (MANUSADŽIANAS et al., 2002), organiniams junginiams – nuo kelių kartų iki 1 eilės, o kompleksiniams tirpalams, pvz., nuotekoms, šie du rodikliai maždaug vienodi



(MANUSADŽIANAS et al., 2007). Mūsų darbe nustatytas 90-min.  $IC_{50}$  ir 8-d.  $LC_{50}$  santykis (atitinkamai,  $4,3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ir  $0,024 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) vario sulfatui yra  $\sim 180$ , todėl, žinant, kad nCuO suspensijai 8-d.  $LC_{50} = 0,69 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (vidurkis tarp sonifikuotos ir nesonifikuotos suspensijų, 3.4.1 lentelė), galima buvo tikėtis, jog 90 minučių veikiant ląsteles maždaug  $120 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  nCuO koncentracijos suspensija bus stebima žymi elektrofiziologinė reakcija. Tačiau per 90 min. nebuvo pasiekta žymi, sietina su toksiniu poveikiu, RP depoliarizacija, net nCuO suspensijos koncentraciją padidinus iki  $500$  ar net  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (MANUSADŽIANAS et al., 2012), tuo tarpu tokia vyksta paveikus, pvz.,  $3,18 \text{ mg Cu}\cdot\text{L}^{-1}$  koncentracijos  $\text{CuSO}_4$  tirpalu (3.2.1 pav.). Pailginus poveikio trukmę, 50% RP depoliarizacija buvo pasiekta po maždaug paros, esant  $30\text{--}100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  nCuO suspensijai (3.2.2 pav. B). Viena iš tokio neįprastai silpno poveikio RP kitimui, esant minėtai ekspozicijai (trukmei ir koncentracijai) *N. obtusa* ląstelėms priešasčių galėjo būti nepakankamas kiekis santykinai mažų ir galimai aktyvių nanodalelių dėl jų sparčios agregacijos suspensijoje.

Vienas iš biologinių nanodalelių prieinamumą vandeninėje dispersijoje didinimo būdų, tuo pačiu minimaliai paveikiant terpės cheminę sudėtį, yra nanodalelių vandeninio mišinio homogenizavimas ultragarsu (sonifikavimas) (HANDY et al., 2012). Dažniausiai nurodoma sonifikavimo trukmė – iki 1 valandos. Nanodalelių dispersija termodinamiškai nėra stabili, nes joje nuolat vyksta du priešingi procesai – agregacija ir dalelių atsiskyrimas. Visgi dispersija gali išlikti santykinai pastovi nuo kelių valandų iki kelių dienų, tačiau iš mažesnių nei  $100 \text{ nm}$  dalelių sudarytos dispersijos santykinis stabilumas yra daug mažesnis – nuo kelių minučių iki kelių valandų (HANDY et al., 2008). Be to, dispersijos būseną priklauso nuo terpės cheminių ir fizinių parametrų (SMITH et al., 2007). Mūsų darbe, ištyrus suspensijų, pagamintų kontroliniame tirpale, nanodalelių dydžius lazerinės difrakcijos metodu, pastebėta, kad tirtose  $3\text{--}100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  koncentracijų nCuO suspensijose susiformuoja agregatai, kurie gali būti išardomi vėl suspensijas sonifikuojant, tačiau jį nutraukus, vyksta sparti reaglomeracija,

pastebima jau po 15 sek. (3.1.1 pav.). Taigi, nors reaglomeracijos sparta priklausė nuo suspensijų koncentracijos, sonifikacijos poveikis buvo trumpalaikis – po 24 val. agregatų dydžio skirstinių modų priklausomybės nuo koncentracijų iš esmės nebeliko (3.1.1 lentelė). Skirstinių parametrai rodo, kad tyrimuose naudotos kontroliniame tirpale pagamintos nCuO suspensijos yra greičiau stambesni nanodalelių agregatai (> 200 nm) nei atskiros nominalaus dydžio nanodalelės (~ 50 nm), vis dėlto neatmetama ir dalies smulkių nanodalelių buvimo suspensijoje galimybė. Atsižvelgus į sparčiai po sonifikavimo vykstančią nanodalelių reaglomeraciją, ląsteles paveikti bandomuoju mišiniu buvo stengiamasi iškart po sonifikavimo, griežtai laikantis pasirinktos procedūros. Tai buvo ypač svarbu ieškant poveikio nanosuspensijomis slenksčio.

Sonifikavimo metu nedidelė dalis CuO ar Cu nanodalelių dėl didelės poveikio energijos jonizuojasi, todėl suspensijoje gali atsirasti toksiškos vario jonų koncentracija. Tirpaus vario kiekis priklauso nuo sonifikavimo trukmės ir intensyvumo, nanodalelių koncentracijos ir terpės, kurioje suspensija pagaminta, sudėties. Pavyzdžiui, iš 1000 mg·L<sup>-1</sup> Cu nanodalelių suspensijos dejonizuotame vandenyje po 1 val. sonifikavimo išsiskyrė 0,3 mg·L<sup>-1</sup> (0,03%) Cu<sup>2+</sup> (LEE et al., 2008), kitu atveju – iš 50 mg·L<sup>-1</sup> CuO nanodalelių suspensijos mitybinėje 25%-Hoagland terpėje po 1 val. išsiskyrė 0,06 mg·L<sup>-1</sup> (0,12%) Cu<sup>2+</sup> (ZHANG et al., 2014). Mūsų duomenimis, 30 min. sonifikuojant 100 mg·L<sup>-1</sup> CuO suspensiją maždaug dvigubai skurdesnėje terpėje nei pastarųjų autorių naudotose, matuojant po 3 val., susidaro 0,033 mg·L<sup>-1</sup> (0,033%) Cu<sup>2+</sup> (GYLYTĖ et al., 2015). Tokios vario jonų koncentracijos tirpalas per minėtą 3 val. laikotarpį (ši ekspozicijos suspensijoje trukmė buvo naudojama atliekant nCuO kaupimosi ląstelėje tyrimus) nesukelia nei *N. obtusa* ląstelių mirtingumo (bent 4 dienas), nei ląstelės membranos depoliarizacijos.

Nagrinėdami nCuO suspensijos sonifikavimo įtaką *N. obtusa* ląstelių elektrofiziologinei reakcijai ir mirtingumui matome, kad, kaip ir galima buvo tikėtis, visų tirtų koncentracijų nesonifikuotų suspensijų poveikis buvo silpnesnis

negu tų pačių koncentracijų sonifikuotų. Visgi, ir ultragarsu neapdorotų vario oksido suspensijų poveikis menturdumblių gyvybingumui buvo pakankamai stiprus (8-d.  $LC_{50} = 0,79 \pm 0,10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ nCuO}$ ), o tai įrodo, kad gamtinėmis sąlygomis antropogeninės kilmės nanodalelės, taip pat, gali būti toksiškos. Tai turėtų kelti nerimą, nes anksčiau buvo skelbta, kad kartu su dažais nuo namų fasadų į paviršinius vandenį išsiplauna  $\text{TiO}_2$  dalelės, kurių koncentracija siekė  $0,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (KAEGI et al., 2008), todėl nėra pagrindo manyti, kad aplinkoje panašiomis koncentracijomis negalėtų atsirasti ir plačiai technologijose naudojamų kitokių, pavyzdžiui, vario ar vario oksido nanodalelių.

Tiriant pradines toksinio poveikio stadijas, ląstelės buvo paveikiamos skirtingų cheminių formų vario junginiais trumpą laiką, po to perkeliamos į kontrolinę terpę ir stebimas jų išgyvenamumas. Pasirinktos tokios vario druskos tirpalo ir nanosuspensijos koncentracijos, kurios, kad tenkintų cheminės analizės jautrumo reikalavimus, buvo maždaug 150 kartų didesnės nei atitinkamos 8-d.  $LC_{50}$  reikšmės. Mirtingumo kinetikos kreivių, gautų per 15 min–6 val. trukmės ekspoziciją (3.4.2 pav. A ir 3.4.3 pav.), palyginimas atskleidė akivaizdžiai stipresnį vario jonų nei CuO nanodalelių poveikį per pirmąsias dvi dienas po ląstelių perkėlimo į kontrolinę terpę, tačiau vėliau, po 12-os dienos mirtingumai jau iš esmės nesiskyrė, kas gerai iliustruojama letaliosios ekspozicijos trukmės medianos reikšmės ( $LED_{50}$ ) kinetikos kreivėmis, reprezentuojančiomis  $3,18 \text{ mg Cu}^{2+}\cdot\text{L}^{-1}$  ir  $30\text{--}100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ nCuO}$  poveikius (3.4.4 pav.). Tai reiškia, kad 10 minučių ekspozicija  $3,18 \text{ mg Cu}^{2+}\cdot\text{L}^{-1}$  koncentracijos  $\text{CuSO}_4$  tirpale arba  $79,9 \text{ mg Cu}\cdot\text{L}^{-1}$  koncentracijos nCuO suspensijoje sukelia tokį patį toksinį poveikį nuo 12-os dienos ir vėliau. Viena iš įmanomų vėlyvesnio nanodalelių poveikimo priežasčių gali būti nCuO dalelių sorbcija ląstelės sienelėje, iš kur jos, veikiamos išmetamų per išorinę ląstelės membraną  $\text{H}^+$  ar kitų medžiagų apykaitos produktų, palaiapsniui yra emituodamos vario jonus. nCuO agregatų buvimą *N. obtusa* ląstelių paviršiuje patvirtina skenuojančiu elektroniniu mikroskopu padarytos nuotraukos ir elementų sudėties tyrimas (3.5.3 ir 3.5.4 pav.). Nanodalelių geba

aplįpti ląstelės sienelę buvo skelbta mokslinėje literatūroje anksčiau, pavyzdžiui SiO<sub>2</sub> ir vienaląsčių žaliųjų dumblių *P. subcapitata* atveju (VAN HOECKE et al., 2008). Nanodalelių prikibimas prie ląstelės sienelės ir buvimas rūgštesnėje nei kontrolinės terpės ląstelės sienelės aplinkoje sudaro palankias sąlygas CuO nanodalelių irimui. Iš tiesioginių menturdumblių ląstelės paviršiaus matavimų pH-mikroelektrodais yra žinoma, kad *Chara corallina* ląstelių sienelės paviršiaus rūgštinėse zonose pH = 5,0 (LUCAS ir SMITH, 1973), o *Nitella* ląstelių – pH = 5,5 (MÉTRAUX et al., 1980). CuO nanodalelių tirpumo priklausomybė nuo terpės pH buvo tiriama kompleksonų nesudarančiuose buferiniuose tirpaluose (STUDER et al., 2010). Kadangi esant pH 5,5 ir 7,4, per 3 dienas ištirpo, atitinkamai, 95,2% ir <0,1% nCuO, autoriai padarė išvadą, kad Cu<sup>2+</sup> koncentracijos didėjimą nulemia terpės rūgštingumas. Panaši tendencija, nors ir ne tokia raiški, nustatyta tiriant Cu<sup>2+</sup> išsiplovimą iš 45 nm CuO dalelių suspensijoje vandeninėje terpėje, kurios sudėtis artima gamtinių vandenų, būtent, 5–14 ir 0,3–1%, atitinkamai, esant pH 6,1 ir 7,7 (ODZAK et al., 2014). Mūsų darbe išmatuotas iš 100 mg·L<sup>-1</sup> nCuO suspensijos išsiplovęs Cu<sup>2+</sup> kiekis – 0,033%, esant pH 7,7 atitinka kitų tyrėjų gautuosius rezultatus. Nors realų nCuO dalelių ląstelės sienelėje ištirpimą įvertinti sudėtinga, tam tikro Cu<sup>2+</sup> koncentracijos padidėjimo dėl nanodalelių irimo atmesti neturėtume.

Asocijuoto su menturdumblių ląstele Cu kiekis viršijo kontrolinį, mūsų eksperimentinėmis sąlygomis, jau po 5 sek. trukmės ekspozicijos nCuO suspensijoje (3.5.1 pav B ir C). Sukaupto vario kiekis priklausė nuo suspensijos koncentracijos 4–100 mg·L<sup>-1</sup> nCuO koncentracijų ruože bei didėjo ilgėjant išlaikymo suspensijoje trukmei (3.5.1 pav A-C). Bandant atsakyti į nanodalelių biologinio aktyvumo ar prieinamumo klausimą, t. y., aiškinantis, ar CuO nanodalelės patenka į ląsteles kaip dalelės ir veikia ten disocijuodamos, ar jos, surištos ląstelės sienelėje ten palaipsniui disocijuoja ir vario jonai patenka į ląstelę įprastais jonų transporto keliais, ar nanodalelės ląstelės sienelėje veikia *per se* taip sukeldamos toksinį efektą menturdumblių ląstelei, būtina analizuoti tiek

netiesioginius suspensijų ir vario druskų tirpalų sukeltas fiziologines ar toksikologines reakcijas, tiek pasitelkti, jei kai kuriais atvejais tai įmanoma, tiesioginio Cu ar jo tirpiosios formos cheminių koncentracijų matavimo duomenis. Kaip jau buvo minėta, žymi ląstelių RP depoliarizacija ląsteles paveikus didelių koncentracijų nCuO suspensijomis nevyksta iki 6 val., tuo tarpu vos 5 min. paveikus  $3,18 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  koncentracijos  $\text{CuSO}_4$  tirpalu prasideda ląstelės depoliarizacija, kuri nesiliauja ir grąžinus ląsteles į kontrolinę terpę (3.2.1 pav.). Tokia reakcija rodo, kad vario jonai, palyginus su CuO nanodalelėmis, yra itin biologiškai aktyvūs menturdumblių atžvilgiu ir greitai viršija vandens augalų tolerantiškumo variui ribas – per tris valandas jo *N. obtusa* ląstelėje susikaupia 250 ppm SM (3.5.1 pav. D). Neseniai buvo nustatyta, kad viduląstelinio Cu koncentracijai viršijus 20 ppm SM sulėtėja paprastosios nerties (*Ceratophyllum demersum*) augimo greitis (THOMAS et al., 2013).

Ar CuO nanodalelės gali įveikti mechaninį storos ir tvirtos menturdumblių ląstelės sienelės barjerą, o vėliau skverbtis ir pro plazmolemą? Makrofitinio dumblio *C. corallina* ląstelės poros efektyvusis skersmuo neviršija 2,1 nm (BERESTOVSKY et al., 2001). Kitas poros dydžio įvertinimas buvo gautas analizuojant polisacharidų skverbimąsi pro ląstelės sienelės celiuliozės matriksą – 4,6 nm (PROSEUS ir BOYER, 2005). Įvairių aukštesniųjų augalų kultivuojamose ląstelėse jų sienelių porų skersmuo, kuris leistų molekulėms nevaržomai judėti, yra 3,5–5,2 nm (CARPITA et al., 1979) ar 6,6–8,6 nm (BARON-EPEL et al., 1988). Pagaliau, gauta eksperimentinių duomenų, kad poros gali didėti vykstant metabolizmo procesams ląstelės sienelėje bei jos sintezei (CARPITA et GIBEAUT, 1993) arba ląstelėms sąveikaujant su nanodalelėmis (Navarro et al., 2008), taip palengvinant nanodalelių patekimą į ląstelę (MELEGARI et al., 2013). Kaip parodė mūsų darbe naudotos CuO suspensijos nanodalelių sudėties lazerinės difrakcijos metodu analizė (žr. 3.1 skyr.), nanodalelių agregatai po sonifikavimo reaglomeruojasi per kelias minutes, todėl, atsižvelgus į menturdumblių ląstelės sienelės porų dydį, tik nedidelė dalis mažiausių dalelių gali įveikti ląstelės sienelės

barjerą ir prasiskverbti pro plazmolemą. Žinoma, kad vienas iš patekimo į ląstelę kelių – endocitozė, ji patvirtinta, pvz., melsvabakterėse *Microcystis aeruginosa* (WANG et al., 2011) ir vienaląščiuose žaliuosiuose dumbliuose *Chlamydomonas reinhardtii*, (MELEGARI et al., 2013). Pastarosiose, šešias valandas veiktose nCuO suspensija ląstelėse, viduląstelinė bendro Cu koncentracija buvo maždaug dvigubai didesnė nei tirpiojo  $\text{Cu}^{2+}$  (PERREAULT et al., 2012). Panašios kaupimosi tendencijos stebėtos ir mūsų darbe *N. obtusa* ląstelėse, paveiktose dvigubai trumpiau – 3 val. ir esant 25 kartus didesnei nominaliai  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  nCuO koncentracijai. Nustatyta, kad  $\text{Cu}^{2+}$  koncentracija sudaro maždaug dešimtadalį visos išmatuotos ląstelės viduląstelinėje terpėje susikaupusio vario koncentracijos (3.5.6 pav.).

Kad būtų įrodyta, jog nanodalelės įveikia dumblių ląstelės sienelės-plazmolemos barjerą įprasta pasitelkti elektroninį mikroskopavimą. Pastaruoju metu literatūroje esama, pvz., *C. reinhardtii*, paveiktų CuO nanosuspensija, nuotraukų su matomais nCuO agregatais (MELEGARI et al., 2013; PERREAULT ET AL., 2012), tačiau dėl vienalyčio nekompartmentalizuoto organoidų išsidėstymo šioje vienaląščio žaliadumblio ląstelėje patiems autoriams keblu identifikuoti jų dalelių agregatų lokalizacijos vietą (MELEGARI et al., 2013). Šia prasme *N. obtusa* ląstelės, pasižyminčios aiškia vidinių dalių skirtimi, visų pirma, dėl vakuolės, užimančios 90–95% viso ląstelės tūrio, ir kurią nuo citoplazmos skiria vakuolės membrana (tonoplastas) yra unikalus objektas kiekybiškai analizuoti patekusių į ląstelę medžiagų pasiskirstymą. Tiriant vario, neišskiriant į atskiras chemines formas, kaupimąsi atskirose ląstelės dalyse, visų pirma, paaiškėjo, kad didžioji chemiškai išmatuoto Cu dalis (60–70% nuo visoje ląstelėje sukauptojo) susikaupia ląstelių sienelėse, tiek paveikus pasirinktų koncentracijų nCuO, tiek  $\text{CuSO}_4$  (3.5.5 pav.).  $\text{SiO}_2$  nanodalelių, adhezija ląstelės paviršiuje buvo konstatuota vienaląščio žaliadumblio *P. subcapitata* ląstelėse, tačiau autoriai (VAN HOECKE et al., 2008) pabrėžia, kad ląstelių viduląstelinėje terpėje, sprendžiant iš TEM nuotraukų, nanodalelių nematyti.

Taigi, mūsų eksperimentuose pastebėtas greito elektrofiziologinio atsako į nCuO suspensijos poveikį, nebuvimo faktas prieštarauja anksčiau patvirtintam požiūriui, kad būtent RP sumažėjimas dėl Cu jonų poveikio yra būtinas vėlesnės ląstelės žūties pranašas. Veikiant nCuO suspensijai, RP depoliarizacija pasireiškia vėliau, jau ląstelės žuvimo fazėje. Šis rezultatas gali būti aiškinamas tuo, kad didžiąją dalį sukaupto Cu sudaro su ląstelės sienele asocijuotos vario nanodalelės ar jų aglomeratai, ir tuo, kad tik dalis mažiausių nanodalelių pakankamai greitai gali įsiskverbti pro ląstelės sienelę ir plazmolemą bei vidines membranas. Tikėtina, kad vėliau toksiškumas yra sukeliamas  $\text{Cu}^{2+}$ , palaiapsniui atsirandančių iš sienelėje esančių CuO nanodalelių ir (arba) iš prasiskverbusių į ląstelę nanodalelių. Tai, kad tirpusis varis sudaro tik dešimtadalį bendrojo išmatuoto vario viduląstelinėje terpėje palieka galimybę sieti nCuO suspensijų toksiškumą ir su tiesioginiu nanodalelių poveikiu.

## IŠVADOS

1. Vario oksido nanodalelių 3–100 mg·L<sup>-1</sup> koncentracijų suspensijose (nCuO), pagamintose artimoje gamtiniam vandeniui terpėje (APW), susiformuoja agregatai (iki 85 μm), kurie išardomi apdorojant suspensijas ultragarsu, tačiau sonifikaciją nutraukus, per 3–5 minutes jie atsistato. CuO nanosuspensijose, pagamintose APW, priešingai nei dejonizuotame vandenyje, vyksta spartus agreguotų nanodalelių nusėdimas – nusėdimo greitis paviršiniame sluoksnyje 0,24 ± 0,04 mg Cu·min<sup>-1</sup>. Tai parodo nCuO suspensijų nepastovumą, į kurį būtina atsižvelgti atliekant biologinius eksperimentus bei prognozuojant poveikį vandens organizmams.

2. Trumpalaikės (5 sek.) menturdumblio *N. obtusa* ląstelių ekspozicijos 100 mg·L<sup>-1</sup> koncentracijos nCuO suspensijoje pakanka, kad po mėnesio mirtingumas reikšmingai skirtųsi nuo kontrolės, todėl galima teigti, kad toksiinį atsaką sukelia su ląstele asocijuotos CuO nanodalelės.

3. Vario oksido nanosuspensijos (1–100 mg·L<sup>-1</sup>) nesukelia greitos, būdingos vario druskų tirpalų poveikiui, *N. obtusa* ląstelių membranos depoliarizacijos (ji pasireiškia žymiai vėliau, po 6–12 val.), be to, po 3 val. ekspozicijos vienodą letalumą sukeliančiose terpėse (100 mg·L<sup>-1</sup> nCuO ir 3,18 mg Cu·L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>) viduląstelinėje terpėje sukaupiama daugiau bendrojo vario paveikus nCuO negu CuSO<sub>4</sub> (atitinkamai, 0,54 mg·L<sup>-1</sup> ir 0,16 mg·L<sup>-1</sup>), todėl atsiradusios dėl CuO nanosuspensijos poveikio viduląstelinės vario koncentracijos negalima paaiškinti vien vario oksido nanodalelių disociacija, nes tokia (0,54 mg·L<sup>-1</sup>) Cu<sup>2+</sup> koncentracija turėtų sukelti stiprią ląstelės depoliarizaciją.



4. Tiriant iš *N. obtusa* ląstelių išskirtą mikrosomų frakciją, nustatyta, kad per pirmąsias 6 val. CuO nanosuspensijos slopina medžiagų pernašą reguliuojančių ATPazių aktyvumą, tačiau neturi įtakos mikrosomų vezikulėse sukuriama protonų elektrocheminių potencialų skirtumui ir kalio difuziniam potencialui. Šis ir latentiškas intaktinės ląstelės elektrofiziologinis atsakas rodo, kad dumblių gyvybinės funkcijos nėra greitai sutrikdomos dėl, tikėtina, neaktyvios viduląstelinės vario formos buvimo.

5. Paveikus *N. obtusa* ląsteles vienodą letalumą sukeliančiais CuSO<sub>4</sub> (3,18 mg Cu·L<sup>-1</sup>) tirpalu arba CuO (100 mg·L<sup>-1</sup>) nanosuspensija, didžioji asocijuoto su menturdumblio ląstele vario dalis (60–70%) yra sukaupiama sienelėje. Veikiant nanosuspensijai, apie 90% viso viduląstelinio Cu lokalizuojasi citoplazmoje ir chloroplastuose, o pusė viduląstelinio tirpiojo vario (Cu<sup>2+</sup>) – vakuolėje.

## LITERATŪRA

- ADAM N., SCHMITT C., BRUYN L. DE, KNAPEN D., BLUST R., 2015a: Aquatic acute species sensitivity distributions of ZnO and CuO nanoparticles. – *Science of the Total Environment*, 526: 233–242.
- ADAM N., VAKUROV A., KNAPEN D., BLUST R., 2015b: The chronic toxicity of CuO nanoparticles and copper salt to *Daphnia magna*. – *Journal of Hazardous Materials*, 283: 416–422.
- ARUOJA V., DUBOURGUIER H.C., KASEMETS K., KAHRU A., 2009: Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. – *Science of the Total Environment*, 407: 1461–1468.
- ASHARANI P. V., LOW KAH MUN G., HANDE M.P., VALIYAVEETIL S., 2009: Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. – *ACS Nano*, 3 (2):279–290.
- AUFFAN M., ROSE J., WIESNER M.R., BOTTERO J., 2009: Chemical stability of metallic nanoparticles : A parameter controlling their potential cellular toxicity *in vitro*. – *Environmental Pollution*, 157: 1127–1133.
- BARON-EPEL O., GHARYAL K.P., SCHINDLER M., 1988: Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells. – *Planta*, 175: 389–395.
- BAUER W., LI S.P., HAN Y.C., YUAN L., YIN M.Z., 2008: Internalization of hydroxyapatite nanoparticles in liver cancer cells. – *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19 (3): 1091–1095.
- BERESTOVSKY G.N., TERNOVSKY V.I., KATAEV A.A., 2001: Through pore diameter in the cell wall of *Chara corallina*. – *Journal of Experimental Botany*, 52: 1173–1177.
- BHATT I., TRIPATHI B.N., 2011: Chemosphere Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment. – *Chemosphere*, 82: 308–317.
- BLAISE C., GAGNE F., FERARD J.F., EULLAFFROY P., 2008: Ecotoxicity of selected nano materials to aquatic organisms. – *Environmental Toxicology*, 23: 591–598.

- BONDARENKO O., IVASK A., KÄKINEN A., KAHRU A., 2012: Sub-toxic effects of CuO nanoparticles on bacteria: Kinetics, role of Cu ions and possible mechanisms of action. – *Environmental Pollution*, 169: 81–89.
- CARPITA N., SABULARSE D., MONTEZINOS D., DELMER D., 1979: Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. – *Science*, 205: 1144–1147.
- CARPITA N.C., GIBEAUT D.M., 1993: Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. – *The Plant Journal*, 3: 1–30.
- CLABEAUX B.L., NAVARRO D., AGA S., BISSON M., 2013: Combined effects of cadmium and zinc on growth, tolerance, and metal accumulation in *Chara australis* and enhanced phytoextraction using EDTA. – *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 98: 236–243.
- CLEMEDSON C., MCFARLANE-ABDULLA E., ANDERSSON M., BARILE F.A., CALLEJA M.C., CHESNE' C., CLOTHIER R., COTTIN M., CURREN R., DANIEL-SZOGLAY E., DIERICKX P., FERRO M., FISKESJÖ G., GARZA-OCANAS L., GOMEZ-LECHON M.J., GÜLDEN M., ISOMAA B., JANUS J., JUDGE P., KAHRU A., KEMP R.B., KERSZMAN G., KRISTEN U., KUNIMOTO M., KÄRENLAMPI S., LAVRIJSEN K., LEWAN L., LILIUS H., OHNO T., PERSOONE G., ROGUET R., ROMERT L., SAWYER T.W., SEIBERT H., SHRIVASTAVA R., STAMMATI A., TANAKA N., TORRES-ALANIS O., VOSS J.U., WAKURI S., WALUM E., WANG X.H., ZUCCO F., EKWALL B., SANDBERG M., SJÖSTRÖM M., 1996: Part II. *In vitro* results from 68 toxicity assays used to test the first 30 reference chemicals and a comparative cytotoxicity analysis. – *Alternatives to Laboratory Animals*, 24: 273–31.
- CORREDOR E., TESTILLANO P.S., CORONADO M.-J., GONZÁLEZ-MELENDI P., FERNÁNDEZ-PACHECO R., MARQUINA C., 2009: Nanoparticle penetration and transport in living pumpkin plants: in situ subcellular identification. – *BMC Plant Biology*, 9: 45–49.
- DOOLETTEA C.L., MCLAUGHLINA M.J., KIRBYB J. K., NAVARRO D.A., 2015: Bioavailability of silver and silver sulfide nanoparticles to lettuce (*Lactuca sativa*): Effect of agricultural amendments on plant uptake. – *Journal of Hazardous Materials*, 300: 788–795.

- DUNCAN R. 2006: Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. – *Nature Reviews Cancer*, 6: 688–701.
- EICHERT T., KURTZ A., STEINER U., GOLDBACH., 2008: Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake H.E. pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. – *Physiologia Plantarum*, 134: 151–160.
- EVANS T.D., LEAL J.R., 1980: Silver:silver halide electrode construction and preparation. – *Laboratory Practice*, 8: 846–847.
- GEISER M., ROTHEN-RUTISHAUSER B., KAPP N., SCHÜRCH S., KREYLING W., SCHULZ H., SEMMLER M., IM HOF V., HEYDER J., GEHR P., 2005: Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. – *Environmental Health Perspectives*, 113: 1555–1560.
- GERMANA N., KAUSAITE-MINKSTIMIENE A. RAMANAVICIUS A., SEMASHKO T., MIKHAILOVA R., RAMANAVICIENE A., 2015: The use of different glucose oxidases for the development of an amperometric reagentless glucose biosensor based on gold nanoparticles covered by polypyrrol. – *Electrochimica Acta*, 169: 326–333.
- GYANES M., ANDRIANOV V.K., BULYCHEV A.A., KURELLA G.A., 1978: Light-induced H<sup>+</sup> accumulation in the vacuole of *Nitellopsis obtusa*. – *Journal of Experimental Botany*, 29: 1185–1195.
- GYLYTĖ B., MANUSADŽIANAS L., SADAUSKAS K., VITKUS R., JURKONIENĖ S., KARITONAS R., PETROŠIUS R., SKRIDLAITĖ G., VAIČIŪNIENĖ J., 2015: Latent cell mortality after short-term exposure of *Nitellopsis obtusa* cells to copper oxide nanoparticles. – *Botanica Lithuanica*, 21(2): (in press). DOI: 10.1515/botlit-2015-0012.
- GOMES T., PINHEIRO J.P., CANCIO I., PEREIRA C.G., CARDOSO C., BEBIANNO M.J., 2011: Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. – *Environmental Science and Technology*, 45: 9356–9362.
- GRIFFITT R.J., LUO J., GAO J., BONZONGO J.-C., BARBER D.S., 2008: Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. – *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27: 1972–1978.

- GRISHCHENKO V.M, ZHERELOVA O.M., ORLOVA T.G., ORLOV N.Y., 1994: Purification of a protein from *Nitellopsis obtusa* cells and its involvement in the regulation of potential-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels. – Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 107(2): 313–319.
- HANDY R.D., CORNELIS G., FERNANDES T., TSYUSKO O., DECHO A., SABO-ATTWOOD T., METCALFE C., STEEVENS J., KLAINE S.J., KOELMANS A.A., HORNE N., 2012: Ecotoxicity test methods for engineered nanomaterials: practical experiences and recommendations from the bench. – Environmental Toxicology and Chemistry, 31: 15–31.
- HANDY R.D., HENRY T.B., SCOWN T.M., JOHNSTON B.D., 2008: Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish — a mechanistic analysis. – Ecotoxicology, 17: 287–314.
- HEINLAAN M., IVASK A., BLINOVA I., DUBOURGUIER H.C., KAHRU A., 2008: Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and  $\text{TiO}_2$  to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. – Chemosphere, 71: 1308–1316.
- HEJNOWICZ Z., SIEVERS A., 1981: Regulation of the position of statoliths in *Chara* rhizoids – Protoplasma, 108: 117–137.
- HEUMANN H.G., 1987: Effects of heavy metals on growth and ultrastructure of *Chara vulgaris*. – Protoplasma, 136: 37–48.
- HOFFMANN R., BISSON M.A., 1988: The effect of divalent cations on  $\text{Na}^+$  tolerance in charophytes. I. *Chara buckellii*. – Plant Cell and Environment, 11: 461–472.
- HOMBLÉ F., MAÏORNIKOFF A., LANNOYE R., 1990: Correlation between the binding pattern and the cell wall composition in *Chara corallina*: a Fourier transform infra-red study. – Journal of Plant Physiology, 135: 686–691.
- HONG J., WANG L., SUN Y, ZHAO L, NIU G., TAN W, CYREN M. RICO C.M., PERALTA-VIDEA J.R., GARDEA-TORRESDEY J.L. 2015. Foliar applied nanoscale and microscale  $\text{CeO}_2$  and  $\text{CuO}$  alter cucumber (*Cucumis sativus*) fruit quality. – Science of the Total Environment. STOTEN-18219; No of Pages 8.

- HOPE A.B., FINDLAY G.P., 1964: The action potential in *Chara*. – *Plant Cell Physiol.*, 5: 377–379.
- ISANI G., FALCIONI M.L., BARUCCA G., SEKAR D., ANDREANI G., CARPENÈ E., FALCIONI G., 2013: Comparative toxicity of CuO nanoparticles and CuSO<sub>4</sub> in rainbow trout. – *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 97: 40–46.
- IVERSEN T.G., FRERKER N., SANDVIG K., 2009: Quantum dot bioconjugates: uptake into cells and induction of changes in normal cellular transport. – *SPIE Proceeding*, 7189: 71890–71899.
- YANG W., SALIM J., LI S., SUN C., CHEN L., GOODENOUGH J.B., KIM Y., 2012: Perovskite Sr<sub>0.95</sub>Ce<sub>0.05</sub>CoO<sub>3-δ</sub> loaded with copper nanoparticles as a bifunctional catalyst for lithium-air batteries. – *Journal of Materials Chemistry*, 22: 18902.
- YURIN V.M., 1979: Electrophysiological characteristics of algae cells as a source of information on water contamination for the units of express testing. – *J Hydrobiol* 15: 91–96, (in Russian).
- JIANG W., MASHAYEKHI H., XING B., 2009: Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. – *Environmental Pollution*, 157: 1619–1625.
- KAEGI R., ULRICH A., SINNET B., VONBANK R., WICHSER A., ZULEEG S., SIMMLER H., BRUNNER S., VONMONT H., BURKHARDT M., BOLLER M., 2008: Synthetic TiO<sub>2</sub> nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. – *Environmental Pollution*, 156: 233–239.
- KAMIYA N., 1981: The physical and chemical basis of cytoplasmic streaming. – *Annual Rev Plant Physiol.*, 32: 205–236.
- KATSUHARA M., TAZAWA M. 1988. Changes in sodium and potassium in *Nitellopsis* cells treated with transient salt stress. – *Plant Cell Environ.*, 11: 71–74.
- KELLER A.A., MCFERRAN S., LAZAREVA A., SUH S., 2013: Global life cycle releases of engineered nanomaterials. – *Journal of Nanoparticle Research*, 15: 1692.

- KELLER, A.A., WANG, H., ZHOU, D., LENIHAN, H.S., CHERR, G., CARDINALE, B.J., 2010: Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. – *Environ. Sci. Technol.*, 44: 1962–1967.
- KIYOSAWA K, ADACHI T., 1990: Survival and death of *Chara* internodal cells in electrolyte solutions and calcium release from the cell wall. – *Plant Cell Environ.*, 13: 471–476.
- KISER M.A., WESTERHOFF P., BENN T., WANG Y., PÉREZ-RIVERA J., HRISTOVSKI K., 2009: Titanium nanomaterial removal and release from wastewater treatment plants. – *Environ. Sci. Technol.*, 43 : 6757–6763.
- KISS Z. J., 1994: The response to gravity is correlated with the number of statoliths in *Chara* rhizoids. – *Plant Physiol.*, 105:937–940.
- KOSTKEVIČIENĖ J., SINKEVIEČIENĖ Z., 2008: A preliminary checklist of Lithuanian macroalgae. – *Botanica Lituanica*, 14(1) 11–27.
- KUFEL AND KUFEL, 2002: *Chara* beds acting as nutrient sinks in shallow lakes-a review. – *Aquat. Bot.*, 72: 249–260.
- KUFEL L., BIARDZKA E., STRZALEK M., 2013: Calcium carbonate incrustation and phosphorus fractions in five charophyte species. – *Aquatic Botany*, 109: 54–57.
- LARUE C., CASTILLO-MICHEL H., SOBANSKA S., CÉCILLON L., BUREAU S., BARTHÈS V., 2014: Foliar exposure of the crop *Lactuca sativa* to silver nanoparticles: evidence for internalization and changes in Ag speciation. – *J. Hazard. Mater.*, 264: 98–106.
- LEE K, BLAISE C, eds, *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. – CRS, Boca Raton, FL, USA, 311–320.
- LEE W.-M., AN Y.-J., YOON H., KWEON H.-S., 2008: Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water-insoluble nanoparticles. – *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27: 1915–1921.
- LEE, W.M., KWAK J.I., AN, Y.J., 2012: Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: Media effect on phytotoxicity. – *Chemosphere*, 86(5): 491–499.

- LEFEBVRE J., GILLET C., 1970: Periodic variations of the chloride electrochemical potential difference during spontaneous oscillations of the membrane potential in *Nitella*. – *Journal of experimental botany*, 203: 575–8.
- LEONAVIČIENĖ L., BRADŪNAITĖ R., VAITKIENĖ D., KUKIS M., VASILIAUSKAS A., KIRDAITĖ G., 2013: Profilaktinis žiurkių kolageninio artrito gydymas taikant įvairaus dydžio aukso nanodaleles. – *Gerontologija*, 13(1): 30–45.
- LI F., LIANG Z., ZHENG X., ZHAO W., WU M., AND WANG Z., 2015: Toxicity of nano-TiO<sub>2</sub> on algae and the site of reactive oxygen species production. – *Aquatic Toxicology*, 158: 1–13.
- LI L., FERNÁNDEZ-CRUZ M.L., CONNOLLY M., CONDE E., FERNÁNDEZ M., SCHUSTER M., NAVAS J.M., 2015: The potentiation effect makes the difference: Non-toxic concentrations of ZnO nanoparticles enhance Cu nanoparticle toxicity in vitro. – *Science of The Total Environment*, 505: 253–260.
- LI ZIJIE, ZHANG Z., JIANG W., YU M., ZHOU Y., ZHAO Y., CHAI Z. 2008. Direct measurement of lanthanum uptake and distribution in internodal cells of *Chara*. – *Plant Science*, 174: 496–501.
- LIMBACH L. K., WICK P., MANSER P., GRASS R. N., BRUININK A., AND STARK W. J. 2007: Exposure of Engineered Nanoparticles to Human Lung Epithelial Cells: Influence of Chemical Composition and Catalytic Activity on Oxidative Stress. – *Environ. Sci. Technol.*, 41 (11): 4158–4163.
- LIU J, REID R.J., SMITH F.A., 1998. Mechanisms of cobalt uptake in plants: <sup>60</sup>Co uptake and distribution in *Chara*. – *Physiol Plantarum*, 104: 351–356.
- LUCAS W.J., SMITH F.A., 1973: The formation of alkaline and acid regions at the surface of *Chara corallina* cells. – *Journal of Experimental Botany*, 24: 1–14.
- LUNDQVIST M., STIGLER J., ELIA G., LYNCH I., CEDERVALL T., DAWSON K.A.. 2008: Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. – *Proc Natl Acad Sci USA*. 23, 105(38):14265–14270.
- LUNEVSKY V. Z., ZHERELOVA O. M., VOSTRIKOV I. Y. AND BERESTOVSKY G. N., 1983: Excitation of Characeae cell membranes as a result of activation of calcium and chloride channels. – *J. Membrane Biol.*, 72: 43–58.



- MAYNARD D., AITKEN R.J., BUTZ T., AL. E., 2006: Safe handling of nanotechnology. – *Nature*, 444: 267–269.
- MAKSIMOV G., SHVEIKAUSKAS V., DARGINAVICIENE J., JURKONIENE S., BANIENE J., SHIEMAITE J., 2002: The usage of plasmalemmal vesicles invested by Brij 58 treatments for studying processes, which occur on the cytosolic membrane surface. – *Russian Journal of Plant Physiology*, 49: 761–765.
- MANUSADŽIANAS L., BALKELYTĖ L., SADAUSKAS K., STOŠKUS L., 2000: Microbiotests for the toxicity assessment of various types of water samples. In: Persoone G, Janssen C, De Coen W, editors. *New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring*. – New York: Kluwer Acad./Plenum Publ. p 391–399.
- MANUSADŽIANAS L., VITKUS R., SAKALAIŠKAS V., 1995: Wastewater toxicity assessment using electrophysiological response of charophyte *Nitellopsis obtusa*. – *Environmental Toxicology and Water Quality*, 10: 49–56.
- MANUSADŽIANAS L., CAILLET C., FACHETTI L., GYLYTĖ B., GRIGUTYTĖ R., JURKONIENĖ S., KARITONAS R., SADAUSKAS K., THOMAS F., VITKUS R., FÉRARD J.-F., 2012: Toxicity of copper oxide nanoparticle suspensions to aquatic biota. – *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31: 108–14.
- MANUSADŽIANAS L., KARITONAS R., SADAUSKAS K., VITKUS R., 2007: Prediction of charophyte cell lethality from sublethal cell response after short-term exposure, in: 13th International Symposium on Toxicity Assessment, Toyama, Japan, August 19–24. p. 51.
- MANUSADŽIANAS L., MAKSIMOV G., DARGINAVIČIENĖ J., JURKONIENĖ S., SADAUSKAS K., VITKUS R., 2002: Response of the charophyte *Nitellopsis obtusa* to heavy metals at the cellular, cell membrane, and enzyme levels. – *Environmental Toxicology*, 17: 275–283.
- MANUSADŽIANAS L., VITKUS R., PÖRTNER R., MÄRKL H., 1999: Phytotoxicities of selected chemicals and industrial effluents to *Nitellopsis obtusa* cells, assessed by using a rapid electrophysiological charophyte test. – *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*, 27: 379–386.
- MELEGARI S.P., PERREAULT F., COSTA R.H.R., POPOVIC R., MATIAS W.G., 2013: Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide

- nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. – *Aquatic Toxicology*, 142-143: 431–440.
- MÉTRAUX J.-P., RICHMOND P.A., TAZ L., 1980: Control of cell elongation in *Nitella* by endogenous cell wall pH gradients: Multiaxial extensibility and growth studies. – *Plant Physiology*, 65: 204–210.
- MIDANDER K., WALLINDER I.O., LEYGRAF C., 2007: In vitro studies of copper release from powder particles in synthetic biological media. – *Environmental Pollution*, 145: 51–59.
- MIMURA T. 1995. Physiological characteristics and regulation mechanisms of the H<sup>+</sup>-pumps in the plasma membrane and tonoplast of characean cells. – *J Plant Res.*, 108:249–256.
- MIMURA T., KIRINO Y., 1984: Changed in cytoplasmic pH measured by <sup>31</sup>P-NMR in cells of *Nitellopsis obtusa*. – *Plant and Cell Physiology*, 25: 813–820.
- MIRZAJANI, F. ASKARI, H., HAMZELOU S., FARZANEH M., GHASSEMPOUR, 2013: Effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa* L. and its rhizosphere bacteria. – *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 88: 48–54.
- MORTIMER M., KASEMETS K., KAHRU A., 2010: Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. – *Toxicology*, 269: 182–189.
- MOSCHINI E., GUALTIERI M., COLOMBO M., FASCIOC U., CAMATINI M., MANTECCAA P., 2013: The modality of cell–particle interactions drives the toxicity of nanosized CuO and TiO<sub>2</sub> in human alveolar epithelial cells. – *Toxicology Letters*, 222: 102–116
- NAVARRO E., BAUN A., BEHRA R., HARTMANN N.B., FILSER J., MIAO A.J., QUIGG A., SANTSCHI P.H., SIGG L., 2008: Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. – *Ecotoxicology*, 17: 372–386.
- OBERDOERSTER G., OBERDOERSTER E., OBERDOERSTER J., 2005: Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. – *Environmental Health Perspectives*, 113: 823–839.
- ODZAK N., KISTLER D., BEHRA R., SIGG L., 2014: Dissolution of metal and metal oxide nanoparticles in aqueous media. – *Environmental Pollution*, 191: 132–

- PAL S., YU KYUNG TAK, JOON MYONG S., 2007: Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*. – *Environ. Microbiol.*, 73( 6): 1712–1720.
- PARK J., NAM J., WON N., JIN H., JUNG S., JUNG S., CHO S. H., KIM S., 2011 Compact and stable quantum dots with positive, negative, or zwitterionic surface: specific cell interactions and von-specific adsorptions by the surface charges. – *Advanced Functional Materials*. 21(9): 1558–1566.
- PERREAULT F., OUKARROUM A., MELEGARI S.P., MATIAS W.G., POPOVIC R., 2012: Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticles uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. – *Chemosphere*, 87: 1388–1394.
- PERREAULT F., POPOVIC R., DEWEZ D., 2014: Different toxicity mechanisms between bare and polymer-coated copper oxide nanoparticles in *Lemna gibba*. – *Environmental Pollution*, 185: 219–227.
- PERSOONE G. 1998. Development and first validation of a “stock-culture free“ algal microbiotest: the Algaltoxkit. In Wells PG, Lee K, Blaise C, eds. *Microscale Testing in Aquatic Toxicology: Advances, Techniques, and Practice*. CRS Press, Boca Raton, FL, pp. 311–320.
- PLIETH C., SATTELMACHER B., HANSEN U.P., 1998: Light-induced cytosolic calcium transients in green plant cells. II. The effect on a K<sup>+</sup> channel as studied by a kinetic analysis in *Chara corallina*. – *Planta*, 207: 52–59.
- PROSEUS T.E., BOYER J.S., 2005: Turgor pressure moves polysaccharides into growing cell walls of *Chara corallina*. – *Annals of Botany*, 95: 967–979.
- REGIER R., COSIO C., VON MOOS N., SLAVEYKOVA V.I., 2015: Effects of copper-oxide nanoparticles, dissolved copper and ultraviolet radiation on copper bioaccumulation, photosynthesis and oxidative stress in the aquatic macrophyte *Elodea nuttallii*. – *Chemosphere* 128, 56–61.
- ROSSETTO A., MELEGARI S.P., OURIQUES L.C., MATIAS W.G., 2014: Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. – *Science of the Total Environment*, 490:

807–814.

- SADAUSKAS E., DANSCHER G., STOLTENBERG M., VOGEL U., LARSEN A., WALLIN H., 2008: Protracted elimination of gold nanoparticles from mouse liver. *Nanomedicine*, 5(2): 162–9.
- SCHRAND A.M., RAHMAN M.F., HUSSAIN S.M., SCHLAGER J.J., SMITH D.A., SYED A.F., 2010: Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment. – *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2: 544–568.
- SERVIN A.D., MORALES M.I., CASTILLO-MICHEL H., HERNANDEZ-VIEZCAS A., MUNOZ B., ZHAO L., NUNEZ J.E., PERALTA-VIDEA J.R., GARDEA-TORRESDEY J.L., 2013: Synchrotron verification of TiO<sub>2</sub> accumulation in cucumber fruit: a possible pathway of TiO<sub>2</sub> nanoparticle transfer from soil into the food chain. – *Environ Sci Technol.*, 47(20):11592–11598.
- SEVRIUKOVA O., KANAPECKAITE A., LAPEIKAITE I., KISNIERIENE V., LADYGIENE R., SAKALAIUSKAS V., 2014: Charophyte electrogenesis as a biomarker for assessing the risk from low-dose ionizing radiation to a single plant cell. – *Journal of Environmental Radioactivity*, 136: 10–15.
- SHAW B.J., AL-BAIRUTY G., HANDY R.D., 2012: Effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Physiology and accumulation. – *Aquatic Toxicology*, 116–117: 90–101.
- SHIINA T. AND TAZAWA M., 1986: Regulation of membrane excitation by protein phosphorylation in *Nitellopsis obtusa*. – *Protoplasma*, 134: 60–61.
- SHIMMEN T., TAZAWA M., 1977: Control of membrane potential and excitability of *Chara* cells with ATP and Mg<sup>2+</sup>. – *Journal of Membrane Biology*, 37: 167–192.
- SHIMMEN T., 1997: Studies on mechanoperception in characean cells: pharmacological analysis. – *Plant Cell Physiol.*, 38: 139–148.
- SHIMMEN T., KIKUYAMA M., TAZAWA M., 1976: Demonstration of two stable potential state of plasmalemma of *Chara* without tonoplast. – *Journal of Membrane Biology*, 30: 249–270.
- SMITH C.J., SHAW B.J., HANDY R.D., 2007: Toxicity of single walled carbon nanotubes on rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): respiratory toxicity,

- organ pathologies, and other physiological effects. – *Aquatic Toxicology*, 82: 94–109.
- SMITH F.A., REID R.J., 1991. Biophysical and biochemical regulation of cytoplasmic pH in *Chara corallina* during acid loads. – *J Exp Bot.*, 42:173–182.
- SOLOVJOV A.V., 2014: Модификация водных полимерных дисперсий золями серебра и меди. – Ярославль, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Ивановский государственный химико-технологический университет"-Иваново, 2014. – 106 p. (in Russian).
- STUDER A.M., LIMBACH L.K., VAN DUC L., KRUMEICH F., ATHANASSIOU E.K., GERBER L.C., MOCH H., STARK W.J., 2010: Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: Comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. – *Toxicology Letters*, 197: 169–174.
- ТАКАБАТАКЕ R., SHIMMEN T., 1997: Inhibition of electrogenesis by aluminum in characean cells. – *Plant Cell Physiol.*, 38: 1264–1271.
- TAZAWA M., SHIMMEN T., 1982: Artificial control of cytoplasmic pH and its bearing on cytoplasmic streaming, electrogenesis and excitability of *Characeae* cells. – *Bot Mag.*, 95: 147–154.
- THOMAS G., STÄRK H.J., WELLENREUTHER G., DICKINSON B.C., KÜPPER H., 2013: Effects of nanomolar copper on water plants-Comparison of biochemical and biophysical mechanisms of deficiency and sublethal toxicity under environmentally relevant conditions. – *Aquatic Toxicology*, 140-141: 27–36.
- TURNER A., 2010: Marine pollution from antifouling paint particles. – *Marine Pollution Bulletin*, 60: 159–171.
- VAITKUS J., 2003: Nanomokslas ir nanotechnologijos pasaulyje ir Lietuvoje. <http://ausis.gf.vu.lt/mg/nr/2003/10/10nano.html>. (žiūrėta 2015–09–30).
- VAITKUVIENE A., RATAUTAITE V., RAMANAVICIENE A., SANEN K., PAESEN R., AMELOOT M., PETRAKOVA V., McDONALD M., VAHIDPOUR F., KASETA V., RAMANAUSKAITE G., BIZIULEVICIENE G., NESLADEK M., RAMANAVICIUS A.,

- 2015: Impact of diamond nanoparticles on neural cells. – *Molecular and Cellular Probes*, 29: 25–30.
- VAN HOECKE K., DE SCHAMPHELAERE K.A.C., VAN DER MEEREN P., LUCAS S., JANSSEN C.R., 2008: Ecotoxicity of silica nanoparticles to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: importance of surface area. – *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27: 1948–1957.
- VENSKUTONIS R.P., 2013: Teminė apžvalga: maisto technologijos ir agroinovacijos. (žiūrėta 2015-09-30)  
[http://www.sumani2020.lt/images/documents/ss/apzvalga\\_mta.pdf](http://www.sumani2020.lt/images/documents/ss/apzvalga_mta.pdf).
- VITKUS R., BALKELYTĖ L., SADAUSKAS K., MANUSADŽIANAS L., 1998: Use of different *Characean* species in a rapid electrophysiological testing. – *Proceedings of Latvian Academy of Sciences*, 52: 144–149.
- VOROBIEV L.N., MANUSADŽIANAS L., 1983: Bioelectrical reactions of *Nitelopsis obtusa* cells induced by indole-3-acetic acid. – *Physiologia Plantarum*, 59: 651–658.
- WAYNE R., 1994: The excitability of plant cells: with a special emphasis on characean internodal cells. – *Bot Rev.*, 60: 265–367.
- WANG Q., EBBS S.D., CHEN Y., MA X. 2013: Trans-generational impact of cerium oxide nanoparticles on tomato plants. – *Metallomics*, 5: 753–759.
- WANG T., LONG X., CHENG Y., LIU Z., YAN S., 2014: The potential toxicity of copper nanoparticles and copper sulphate on juvenile *Epinephelus coioides*. – *Aquatic Toxicology*, 152: 96–104.
- WANG Z., LI J., ZHAO J., XING B., 2011: Toxicity and internalization of CuO nanoparticles to prokaryotic alga *Microcystis aeruginosa* as affected by dissolved organic matter. – *Environmental Science and Technology*, 45: 6032–6040.
- WHITEHOUSE D.G., MOORE A.L., 1993: Isolation and purification of functionally intact chloroplasts from leaf tissue and leaf tissue protoplasts. – *Biomembrane Protocols. Methods in Molecular Biology*, 19: 123–131.
- WILLIAMSON R.E., 1975: Cytoplasmic streaming in *Chara*: a cell model activated by ATP and inhibited by cytochalasin. – *B. J Cell Sci.*, 17: 655–668.

- ZHANG D., HUA T., XIAO F., CHEN C., GERSBERG R.M., LIU Y., NG W.J., TAN S.K., 2014: Uptake and accumulation of CuO nanoparticles and CdS/ZnS quantum dot nanoparticles by *Schoenoplectus tabernaemontani* in hydroponic mesocosms. – *Ecological Engineering*, 70: 114–123.
- ZHAO J., WANG Z., LIU X., XIE X., ZHANG K., XING B., 2011: Distribution of CuO nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) and their potential toxicity. – *Journal of Hazardous Materials*, 197: 304–310.
- КАТАЕВ, 2008: Функциональные свойства  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых хлорных каналов харовых водорослей. – Научная библиотека диссертаций и авторефератов. Пушино 117 p. (in Russian).

## AUTORIAUS PUBLIKACIJOS

**Mokslo publikacijos tarptautiniuose leidiniuose, referuojamuose Mokslinės informacijos instituto duomenų bazėje „ISI Web of science“ ir turinčiuose citavimo indeksą:**

MANUSADŽIANAS L., CAILLET C., FACHETTI L., GYLYTĖ B., GRIGUTYTĖ R., JURKONIENĖ S., KARITONAS R., SADAUSKAS K., THOMAS F., VITKUS R., FERARD J.F., 2011: Toxicity of copper oxide nanoparticle suspensions to aquatic biota. – Environmental Toxicology and Chemistry, 12: 1–7.

**Mokslo publikacijos leidiniuose, referuojamuose įrašytuose į Mokslinės informacijos instituto „ISI Web“ sąrašą:**

GYLYTĖ B., MANUSADŽIANAS L., SADAUSKAS K., VITKUS R., JURKONIENĖ S., KARITONAS R., PETROŠIUS R., SKRIDLAITĖ G., VAIČIŪNIENĖ J., 2015: Latent cell mortality after short-term exposure of *Nitellopsis obtusa* cells to copper oxide nanoparticles. – Botanica Lithuanica, 21(2a) (Priimtas spaudai). DOI: 10.1515/botlit-2015-0012.

**Pranešimų mokslinėse konferencijose tezės**

GYLYTĖ B., GRIGUTYTĖ R., JURKONIENĖ S., SADAUSKAS K., VAIČIENĖ J., VITKUS R., MANUSADŽIANAS L. The dynamics of Cu accumulation in charophyte cell and its delayed response after short-term exposure to nCuO. 17<sup>th</sup> International Symposium on Toxicity Assessment (ISTA-17), Seattle, USA, August 1–4, 2015.

MANUSADŽIANAS L., GYLYTĖ B., JURKONIENĖ S., SADAUSKAS K., VITKUS R. „Remote effects in charophyte cell of *Nitellopsis obtusa* after short-term exposure to CuO nanosuspensions“ SETAC Europe 24<sup>th</sup> Annual Meeting in Basel, Switzerland, May 9–15, 2014.

JURKONIENĖ S., DARGINAVIČIENĖ J., GYLYTĖ B., KARITONAS R., SADAUSKAS K., VITKUS R., MANUSADŽIANAS L. „*Nitellopsis obtusa* microsomal H<sup>+</sup>-ATPase activity as a biomarker for general water toxicity“ 19<sup>th</sup> Meeting of the Group of



European Charophytologists (GEC 19 th) Vilnius, Lithuania, September 11–14, 2014.

GYLYTĖ B. Short-term exposure effect of CuO nanoparticle suspension on charophyte cell. 3<sup>th</sup> Young Environmental Scientists (YES) meeting. Krakow, Poland, February 11–13, 2013.

GYLYTĖ B. Toxic effects of ionic and nanoparticulate forms of copper on *Nitellopsis* cells. NanoTechnas. Novel nanomaterials and their application in bioanalysis. Vilnius, Lithuania, May 8–10, 2013.

GYLYTĖ B. Trumpalaikio nCuO poveikio toksiškumas žvaigždėtojo maurašakio *Nitellopsis obtusa* (Desv.) J.Groves ląstelei. LMA jaunųjų mokslininkų konferencija BIOATEITIS: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos. Vilnius, Lithuania, Gruodžio 11, 2013.

#### **Publikacijos, neįtrauktos į disertaciją**

KREVŠ A., DARGINAVIČIENĖ J., GYLYTĖ B., GRIGUTYTĖ R., JURKONIENĖ S., KARITONAS R., KUČINSKIENĖ A., PAKALNIS R., SADAUSKAS K., VITKUS R., MANUSADŽIANAS L. 2013: Ecotoxicological effects evoked in hydrophytes by leachates of invasive *Acer negundo* and autochthonous *Alnus glutinosa* fallen off leaves during their microbiological decomposition. – Environmental Pollution, 173: 75–84.

MANUSADŽIANAS L., DARGINAVIČIENĖ J., GYLYTĖ B., JURKONIENĖ S., KREVŠ A., KUČINSKIENĖ A., MAČKINAITĖ R., PAKALNIS R., SADAUSKAS K., SENDŽIKAITĖ J., VITKUS R. 2014: Ecotoxicity effects triggered in aquatic organisms by invasive *Acer negundo* and native *Alnus glutinosa* leaf leachates obtained in the process of aerobic decomposition. – Science of the Total Environment, 496: 35–44.

EITMINAVIČIŪTĖ I., STRAZDIENĖ V., BAGDANAVIČIENĖ Z., MATUSEVIČIŪTĖ A., GYLYTĖ B. 2002: Kadmio poveikis zoocenozėms nuotėkų dumblo komposte. – Ekologija / Ecology, 3: 56–65.