

УДК [633.11:631.453](470.315)

ФИТОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ГУМАТА АММОНИЯ ПРИ ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ МЕДИ В СРЕДЕ

Т. А. Кирдей¹, А. П. Веселов²

¹ *Ивановская государственная сельскохозяйственная академия
им. Д. К. Беляева*

Россия, 153012, Иваново, Советская, 45

² *Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского
Россия, 603950, Нижний Новгород, Гагарина, 23*

E-mail: t.a.kirdey@mail.ru

Поступила в редакцию 19.12.14 г.

Фитопротекторный эффект гумата аммония при высоких концентрациях меди в среде. – Кирдей Т. А., Веселов А. П. – Изучали влияние гумата аммония, полученного из торфа, на устойчивость растений пшеницы к высоким концентрациям CuSO_4 – 100, 250, 500 и 1000 мкМ/л. Семена проращивали на растворах сульфата меди без гумата или с добавлением гумата, затем растения выращивали на растворе Хогланда в камере искусственного климата. Коэффициент протекторного действия гумата определяли двумя способами: по изменению сухой массы и по содержанию ионов меди в сравнении с растениями, выращенными без гумата. Установлена протекторная роль гумата при 100 и 250 мкМ, что обусловлено снижением накопления меди в растениях. При более высоких концентрациях гумат усиливал токсическое действие меди.

Ключевые слова: фитопротекторный эффект, гуминовые вещества, гумат, тяжелые металлы, медь, пшеница.

Phytoprotective effect of ammonium humate at high copper concentrations in the environment. – Kirdey T. A. and Veselov A. P. – The influence of ammonium humate obtained from peat on the wheat plant tolerance to high CuSO_4 concentrations (100, 250, 500, and 1000 $\mu\text{M/l}$) was studied. Seeds were germinated on copper sulphate solution with and without the humate. Then the plants were grown on Hoagland's solution in an artificial climate chamber. The humate protective action coefficient was estimated in two ways, namely: by dry weight changes and by copper ion content in comparison with the plants grown without humate. A protective role of the humate at 100 and 250 μM was established, due to copper accumulation reduction in the plants. At higher concentrations the humate enhanced the toxic effect of copper.

Key words: phytoprotective effect, humic substances, humate, heavy metals, copper, wheat.

DOI: 10.18500/1684-7318-2016-4-390-398

ВВЕДЕНИЕ

Возрастающее антропогенное воздействие на окружающую среду приводит к усилению накопления высокотоксичных тяжелых металлов в почве, воде, живых организмах. К тяжелым металлам относят более 40 элементов, атомная масса которых превышает 50 а.е.м. Многие из этих элементов являются необходимыми для жизнедеятельности растений, но в высоких концентрациях вызывают комплекс не-

гативных изменений, приводящих к нарушению метаболизма, ингибированию фотосинтеза, дыхания, снижению эффективности осморегуляции, торможению ростовых процессов, гибели растений.

Медь – один из главных поллютантов на загрязненных территориях, является наиболее токсичным тяжелым металлом. Основные причины повышения содержания меди в окружающей среде – широкое использование медьсодержащих пестицидов и накопление отходов промышленности. В низких концентрациях медь – незаменимый для растений микроэлемент, входящий в состав важнейших окислительно-восстановительных ферментов, участвующих в фотосинтезе, дыхании, восстановлении и фиксации азота (Yruela, 2009). Избыточные дозы меди вызывают изменение проницаемости клеточных мембран, нарушение транспорта электронов в электронтранспортных цепях, инактивацию ферментов, ингибирование роста корней и побегов, индуцируют окислительный стресс в клетках растений, нарушают нормальное развитие корневой системы (Куликова и др., 2011; Yruela, 2009). Причем диапазон концентраций меди, не оказывающих выраженного токсического воздействия на растения, очень узок.

В сравнительно немногочисленных исследованиях показано, что гуминовые вещества снижают токсичность тяжелых металлов (Будаева и др., 2005; Куликова, 2008; Семенов, 2009; Kaschl, Chen, 2002). Фитопротекторное действие гуминовых соединений при высоких концентрациях тяжелых металлов в среде обусловлено, по-видимому, образованием нетоксичных комплексов гуминовых веществ с металлами и снижением их доступности для растений.

Гуминовые вещества – уникальные высокомолекулярные природные соединения, образующиеся в процессе гумификации – разложении органических остатков при затрудненном доступе кислорода. Гумификация – второй по масштабности процесс превращения органического вещества после фотосинтеза (Перминова, 2008). Количество углерода, связанного в гуминовых веществах почв, торфа, углей, почти в четыре раза превосходит количество углерода, связанного в органическом веществе всех растений и животных. Гуминовые соединения участвуют в структурообразовании почвы, накоплении питательных элементов и микроэлементов в доступной для растений форме, регулировании геохимических потоков металлов в водных и почвенных экосистемах, связывают в прочные комплексы ионы металлов и органические экотоксиканты (Христева, 1977; Орлов, 1993).

Гуминовые вещества представляют собой очень сложную смесь природных соединений, устойчивых к биоразложению. Фундаментальные свойства гуминовых веществ – это нестехиометричность состава, нерегулярность строения, гетерогенность структурных элементов и полидисперсность. Гетерогенность структуры, с одной стороны, дает чрезвычайно широкий спектр свойств, а с другой – неспецифичность действия. Несмотря на гетерогенность структуры, гуминовые вещества обладают общими свойствами и типом строения – состоят из «ядерной» части (системы конденсированных бензольных колец) и периферических открытых цепей. При гидролизе гуминовых веществ в раствор переходят низкомолекулярные фрагменты, аминоксахара, аминокислоты, витамины, антибиотики, фитогормоны (Орлов, 1990; Горовая и др., 1995).

Классификация гуминовых веществ основана на их растворимости в кислотах и щелочах: гумин – неизвлекаемый остаток, нерастворимый ни в щелочах, ни в кислотах; гуминовые кислоты – фракция, растворимая в щелочах и нерастворимая в кислотах (при $\text{pH} < 2$); фульвокислоты – фракция, растворимая и в щелочах, и в кислотах. Гуминовые и фульвокислоты, взятые вместе, называют «гумусовыми кислотами». Это наиболее подвижная и реакционноспособная компонента гуминовых веществ, активно участвующая в природных химических процессах. Гумусовые кислоты образуют прочные связи со многими ионами и молекулами веществ, элементами, находящимися в растворе, а также включенными в кристаллическую структуру минералов. Благодаря карбоксильным, гидроксильным, карбонильным группам и ароматическим фрагментам гумусовые кислоты вступают в ионные, донорно-акцепторные и гидрофобные взаимодействия (Орлов, 1990; Перминова, 2000).

Гуминовые вещества непосредственно в почве, торфе находятся в малоактивной форме, так как, обладая большим набором функциональных групп, реагируют с минеральными компонентами. При производстве гуминовых препаратов – солей гуминовых кислот – функциональные группы «разблокируются» и гуминовые кислоты переводятся в активную форму. В отличие от свободных гуминовых кислот гуматы являются водорастворимыми подвижными соединениями.

Таким образом, в современных условиях растущего загрязнения окружающей среды исследование фитопротекторной функции гуматов приобретает особую актуальность. В связи с этим целью работы являлось изучение влияния гумата аммония, полученного из торфа (Способ получения..., 2007), на устойчивость растений пшеницы к высоким концентрациям меди.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были растения яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Приокская. Семена проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге с растворами сульфата меди в концентрациях 100, 250, 500 и 1000 мкМ при температуре 20 – 22°C. Растения выращивали в условиях водной культуры на питательной смеси Хогланда в камере искусственного климата. Гуминовый препарат использовали в концентрации 0.01 и 0.005% для проращивания семян и для выращивания растений соответственно. Концентрации выбраны по результатам ранее проведенных экспериментов (Кирдей, 2013). Одновременно изучали действие высоких концентраций меди на растения при начале эксперимента в возрасте 30 дней с целью выяснения особенностей токсического действия металла на взрослые растения. Благодаря этой части эксперимента удалось определить характер воздействия гумата на накопление меди растениями при 500 и 1000 мкМ сульфата меди в среде, тогда как при выращивании растений при данных концентрациях с начала прорастания семян наблюдалось сильное торможение ростовых процессов и гибель растений.

Реакцию растений на действие ионов металлов и гумата оценивали по всхожести семян, морфологическим показателям проростков на седьмой день эксперимента, а также по накоплению биомассы и морфологическим показателям разви-

тия растений в фазы кушения, выхода в трубку и колошения. Контролем служили растения, выращенные без сульфата меди в среде. Степень устойчивости определяли по соотношению сухих масс надземных органов растений на опытном и контрольном вариантах (Удовенко, 1977). Протекторное действие гумата оценивали: 1) по накоплению массы растениями – определяли соотношение массы растений, выращенных при использовании гуминового препарата и без гумата (коэффициент протекторного действия гумата по массе) (Кирдей, 2014); 2) по накоплению токсичного иона – определяли соотношение содержания меди в растениях, выращенных без гумата и при использовании гумата (коэффициент протекторного действия гумата по накоплению меди). Содержание ионов меди в растениях определяли на атомно-абсорбционном спектрометре «Shimadzu» (Япония), модель 6800.

Статистическую обработку данных проводили при помощи программы Excel с использованием дисперсионного и корреляционного методов анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Высокие концентрации сульфата меди – 500 и 1000 мкМ – существенно снизили всхожесть семян пшеницы – на 19 и 22% по сравнению с контролем. Установлена обратная корреляционная зависимость всхожести семян, длины побегов и корней проростков от концентрации меди в среде. Коэффициент корреляции составил 0.88, 0.89 и 0.74 без гумата в среде и 0.77, 0.90 и 0.84 в присутствии гумата соответственно. Гумат усиливал рост проростков как без сульфата меди в среде, так и при относительно невысоких концентрациях – 100 и 250 мкМ. При более высоких концентрациях сульфата меди влияние гумата не доказано статистически. Соотношение длины побегов и корней проростков увеличивается с ростом концентрации меди (коэффициент корреляции 0.95 – 0.99), что обусловлено более сильным токсическим действием меди на рост корней, чем побегов. Высокая чувствительность клеток корней к большинству токсикантов обусловлена более высокой скоростью деления и роста клеток по сравнению с надземными органами.

При высоких концентрациях сульфата меди в среде особенно ярко проявлялись признаки фитотоксичности меди: хлороз, задержка роста побегов, угнетение развития корневой системы, увядание и засыхание растения. Хлороз может быть связан с недостатком железа. Торможение роста и увядание растений обусловлено нарушением поглощения воды и минеральных веществ (Деви, Прасад, 2005; Серегин, 2009; Hall, 2002).

Токсическое действие меди проявляется прежде всего на процессах роста растений. Достоверное снижение массы растений наблюдалось на всех вариантах опыта. Высокие концентрации меди вызвали также торможение процесса кушения. Если на контроле кустистость составила 5.33 без гумата и 5.67 в присутствии гумата, то при 100 мкМ – 2.0 и 4.3 соответственно. При более высоких концентрациях процесс кушения ингибировался полностью.

С увеличением концентрации меди в среде значительно снизилась степень металлоустойчивости растений (табл. 1). В процессе развития растений их устойчивость изменяется – повышение металлоустойчивости наблюдается только при 100 мкМ. При 250 и 500 мкМ в фазу колошения контрольных растений степень

устойчивости ниже в 3 раза, чем в фазу кушения, а при 1000 мкМ отмечена 100%-ная гибель растений.

Таблица 1

Степень металлоустойчивости растений пшеницы, %

Концентрация CuSO ₄ , мкМ/л	Без гумата			С гуматом		
	Кушение	Выход в трубку	Колошение	Кушение	Выход в трубку	Колошение
100	14.55	10.63	16.01	47.27	58.62	58.31
250	10.91	2.30	3.74	14.55	53.16	48.48
500	10.00	4.31	3.05	12.73	2.59	2.70
1000	6.36	1.44	0.78	5.45	1.44	0.52

Примечание. Фазы развития указаны для контрольных растений.

Гумат значительно повысил металлоустойчивость растений пшеницы при 100 и 250 мкМ CuSO₄. Эффективность гумата характеризует коэффициент протекторного действия (табл. 2). Если коэффициент равен 1 – влияние гумата отсутствует,

Таблица 2

Коэффициент протекторного действия гумата (по массе)

Концентрация CuSO ₄ , мкМ/л	Фазы развития		
	Кушение	Выход в трубку	Колошение
0	1.82	1.24	1.11
100	3.25	5.51	3.64
250	1.33	23.12	12.95
500	1.27	0.60	0.89
1000	0.86	1.00	0.67

если значение коэффициента меньше 1 – гумат усилит токсическое действие металла, если больше 1 – наблюдается выраженный защитный эффект гумата. Причем чем выше значение коэффициента, тем сильнее проявляется протекторное действие гумата. Протекторная роль гумата наблюдалась только при 100

и 250 мкМ, тогда как при 500 и 1000 мкМ гумат в целом усилил токсичность меди.

Стимулирующее действие гумата наблюдалось и без добавления сульфата меди в среду – наиболее сильное в фазу кушения.

Избыток меди ингибировал как накопление биомассы, так и линейный рост растений (рис. 1). Степень снижения длины побегов и корней растений нарастала с увеличением концентрации меди в среде. Достоверное ингибирование длины побегов и корней наблюдалось на всех вариантах опыта, за исключением длины корней в фазу кушения при 100 мкМ в присутствии гумата. Гумат показал высокую эффективность в среде без сульфата меди и при концентрации сульфата меди 100 и 250 мкМ. Однако в процессе развития растений протекторная функция гумата сохраняется только при 100 мкМ. В фазу колошения при 250 мкМ эффект гумата недостоверен, а при более высоких концентрациях наблюдается тенденция усиления токсического действия меди. Т.е. в процессе развития растений в условиях постоянного действия высоких концентраций сульфата меди (250 мкМ и выше) усиливается как токсическое действие металла, так и отрицательный синергетический эффект гумата и меди.

ФИТОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ГУМАТА АММОНИЯ

Накопление меди в растениях увеличивается с ростом концентрации меди в среде (табл. 3). При 100 мкМ содержание меди в побегах возросло в 5 раз по сравнению с контролем, при 250 мкМ – уже в 61 раз. При высоких концентрациях – 500 и 1000 мкМ – оказалось нецелесообразно, да и невозможно достоверно определить содержание меди в растениях, так как растения практически остановились в росте и не накапливали массу (рис. 2) Так, масса одного растения в фазу кушения составила 0.05 – 0.07 г при 500 мкМ и 0.03 – 0.035 г при 1000 мкМ, в фазу колошения – 0.31 – 0.35 г и 0.06 – 0.09 г соответственно. Только наличие зеленых листьев у некоторых растений позволило считать растения живыми. К фазе колошения контрольных растений при 1000 мкМ сульфата меди в среде отмечена 100%-ная гибель растений. Поэтому в табл. 3 приведены данные по содержанию меди в растениях, выращенных при начале воздействия высокими концентрациями меди в возрасте 30 дней. У таких растений уже сформировалась корневая система, выполняющая барьерную функцию в отношении избыточных количеств ионов меди.

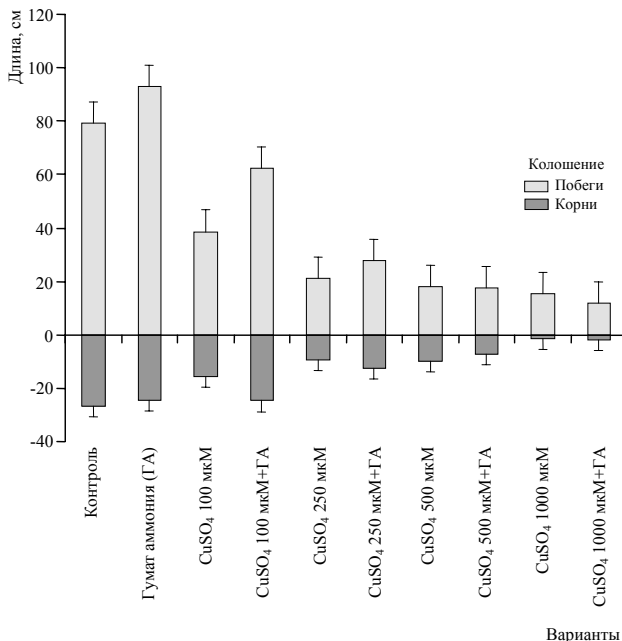


Рис. 1. Влияние высоких концентраций меди и гумата на линейный рост растений пшеницы; бары на диаграмме показывают значения HCP_{05}

данные по содержанию меди в растениях, выращенных при начале воздействия высокими концентрациями меди в возрасте 30 дней. У таких растений уже сформировалась корневая система, выполняющая барьерную функцию в отношении избыточных количеств ионов меди.

Таблица 3

Содержание меди в растениях, мг/кг сухой массы (колошение)

Концентрация $CuSO_4$, мкМ/л	Без гумата			С гуматом		
	Побеги	Корни	Корни/побеги	Побеги	Корни	Корни/побеги
0	13.0±0.2	47.0±1.0	3.62	6.8±0.2	43.0±4.0	6.32
100	66.0±2.0	3530.0±50.0	53.48	42.0±3.0	660.0±15.0	15.71
250	790.0±4.0	2890.0±90.0	3.66	140.0±3.0	2770.0±40.0	19.79
500*	90.0±4.0	1890.0±20.0	21.00	82.0±5.0	1640.0±60.0	20.00
1000*	93.0±2.0	2300.0±150.0	24.73	120.0±3.0	4740.0±60.0	39.5

Примечание. Приведены средние значения и их стандартные ошибки; * данные по растениям, выращенным при начале воздействия $CuSO_4$ в возрасте 30 дней.



Рис. 2. Влияние гумата на растения пшеницы при 100 мкМ CuSO_4 в среде

рующую функцию при повышении концентрации токсичного иона. При 500 мкМ роль гумата незначительна, а при 1000 мкМ наблюдается противоположный эффект – усиление накопления меди растениями. Таким образом, протекторная роль гумата ограничивается концентрацией CuSO_4 250 мкМ.

Таблица 4

Коэффициент протекторного действия гумата (по содержанию меди)

Концентрация CuSO_4 , мкМ/л	Побеги	Корни
0	1.91	1.09
100	1.57	5.35
250	5.64	1.04
500*	1.10	1.15
1000*	0.78	0.49

* Приведены данные по растениям, выращенным при начале воздействия CuSO_4 в возрасте 30 дней.

Полученные результаты подтверждают, что пшеница относится к растениям-«исключателям» токсичных ионов, накапливая медь преимущественно в корневой системе (Baker, 1981). Однако при повышении концентрации CuSO_4 процессы регуляции нарушаются. О регулирующей функции корневой системы можно судить по соотношению содержания токсичных ионов в корнях и побегах (см. табл. 3). Высокая регулирующая способность корневой системы наблюдается при 100 мкМ.

Гумат снижает накопление меди в растениях как при выращивании на стандартной питательной среде, так и при добавлении сульфата меди в концентрациях 100 и 250 мкМ (табл. 4). Причем при 100 мкМ протекторное действие гумата направлено преимущественно на снижение накопления меди корневой системой, а при 250 мкМ – побегами. Очевидно, что корневая система теряет свою регули-

рующую функцию при повышении концентрации токсичного иона. При 500 мкМ роль гумата незначительна, а при 1000 мкМ наблюдается противоположный эффект – усиление накопления меди растениями. Таким образом, протекторная роль гумата ограничивается концентрацией CuSO_4 250 мкМ. Металлоустойчивость растений определяется, в конечном счете, накоплением токсичных ионов. Установлена обратная корреляционная зависимость сухой массы растений от содержания меди – коэффициент корреляции составил 0.84 и 0.74 при выращивании растений без гумата и в присутствии гумата соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенные исследования подтвердили предполагаемую фитопротекторную роль гумата при высоких концентрациях меди в среде. Однако защитная функция гумата ограничивается концентрацией сульфата меди 250 мкМ. Полученные результаты позволяют выделить противоположно направленные эф-

ФИТОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ГУМАТА АММОНИЯ

факты влияния гумата на устойчивость растений пшеницы к высоким концентрациям меди: 1) стимуляция роста и снижение токсического действия меди на растения при относительно низких концентрациях сульфата меди (100 и 250 мкМ); 2) торможение роста и усиление токсического действия меди при высоких концентрациях сульфата меди (500 и 1000 мкМ). Причем в процессе развития растений повышение металлоустойчивости наблюдается только при 100 мкМ, а при более высоких концентрациях – усиление токсического действия меди, а также развитие отрицательного синергетического эффекта гумата и ионов меди.

Металлоустойчивость растений определяется накоплением токсичных ионов. Гумат снизил накопление меди в растениях как при выращивании на стандартной питательной среде, так и при добавлении сульфата меди в концентрациях 100 и 250 мкМ. Причем высокая регулирующая функция корневой системы наблюдалась только при 100 мкМ. В этом варианте коэффициент протекторного действия гумата по накоплению меди в корнях был наиболее высоким. При 250 мкМ защитная функция гумата была направлена уже на снижение накопления меди в побегах. Очевидно, что при повышении концентрации меди корневая система теряет свою регулируемую функцию и протекторная роль гумата возрастает. Высокая эффективность гумата обусловлена, предположительно, образованием комплексных соединений с ионами меди, снижающих накопление металла в растениях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Будаева А. Д., Золотов Е. В., Бодоев Н. В., Бальбурова Т. А. Сорбция ионов тяжелых металлов гуматами аммония, натрия, калия // *Фундаментальные исследования*. 2005. № 9. С. 112 – 113.

Горовая А. И., Орлов Д. С., Щербенко О. В. Гуминовые вещества. Строение, функции, механизм действия, протекторные свойства, экологическая роль. Киев : Наук. думка, 1995. 303 с.

Деву С. Р., Прасад М. Н. В. Антиокислительная активность растений *Brassica juncea*, подвергнутых действию высоких концентраций меди // *Физиология растений*. 2005. Т. 52. С. 233 – 237.

Кирдей Т. А. Снижение токсического действия свинца на проростки пшеницы в присутствии гумата // *Сельскохозяйственные науки и агропромышленный комплекс на рубеже веков : сб. материалов 1-й междунар. науч.-практ. конф.* Новосибирск : Сибпринт, 2013. С. 13 – 17.

Кирдей Т. А. Защитное действие гумата на проростки пшеницы в присутствии тяжелых металлов // *Проблемы региональной экологии*. 2014. № 2. С. 199 – 201.

Куликова А. Л., Кузнецова Н. А., Холодова В. П. Влияние избыточного содержания меди в среде на жизнеспособность и морфологию корней сои // *Физиология растений*. 2011. Т. 58, № 5. С. 719 – 727.

Куликова Н. А. Защитное действие гуминовых веществ по отношению к растениям в водной и почвенной средах в условиях абиотических стрессов : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2008. 48 с.

Орлов Д. С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М. : Изд-во МГУ, 1990. 325 с.

Орлов Д. С. Свойства и функции гуминовых веществ // *Гуминовые вещества в биосфере*. М. : Наука, 1993. С. 16 – 26.

- Перминова И. В.* Анализ, классификация и прогноз свойств гумусовых кислот : дис. ... д-ра хим. наук. М., 2000. 359 с.
- Перминова И. В.* Гуминовые вещества – вызов химикам XXI века // *Химия и жизнь*. 2008. № 1. С. 50 – 56.
- Семенов А. А.* Влияние гуминовых кислот на устойчивость растений и микроорганизмов к воздействию тяжелых металлов : автореферат дис. ... канд. биол. наук. М., 2009. 25 с.
- Серегин И. В.* Распределение тяжелых металлов в растениях и их действие на рост : дис. ... д-ра биол. наук. М., 2009. 333 с.
- Способ получения жидких торфяных гуматов : пат. 2310633 Рос. Федерация : МПК C05F11/02, C10F7/00 / Калинин Ю. А., Вашурина И. Ю., Кирдей Т. А. ; заявитель и патентообладатель ООО Научно-производственная фирма «Недра». № 2006120883/04 ; заявл. 15.06.2006 ; опубл. 20.11.2007, Бюл. № 32. 4 с.
- Удовенко Г. В.* Солеустойчивость культурных растений. Л. : Колос, 1977. 215 с.
- Христева Л. А.* К природе действия физиологически активных гумусовых веществ на растения в экстремальных условиях // *Гуминовые удобрения : теория и практика их применения* / Днепропетр. с.-х. ин-т. Днепропетровск, 1977. Т. 6. С. 3 – 15.
- Baker A. J. M.* Accumulators and excluders-strategies in response of plants to heavy metals // *J. of Plant Nutrition*. 1981. Vol. 3, iss. 1 – 4. P. 643 – 654.
- Kaschl A., Chen Y.* Interaction of humic substances with trace metals and their stimulatory effects on plant growth // *Use of humic substances to remediate polluted environments from theory to practice* / eds. I. V. Perminova, K. Hatfield, N. Hertkorn. Dordrecht : Springer, 2002. Vol. 52. P. 83 – 115.
- Hall J. L.* Cellular Mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance // *J. Experimental Botany*. 2002. Vol. 53. P. 1 – 11.
- Yruela I.* Copper in plants : acquisition, transport and interactions // *Functional Plant Biology*. 2009. Vol. 36, № 5. P. 409 – 430.