

## **ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЙ ВЫСОКОДИСПЕРСНЫХ МЕТАЛЛУРГИЧЕСКИХ ОТХОДОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ПРОЛИНА В ЛИСТЬЯХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ**

**Зибарева Л. Н., Жилина О. В., Буренина А. А., Моргалёв Ю. Н.**

*ФГБОУ ВПО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Сибирский ботанический сад, Россия (634050, г. Томск, пр. Ленина, 36), e-mail: zibareva.lara@yandex.ru*

**Выявлено влияние высокодисперсных техногенных отходов металлургии на изменения пула пролина в листьях тест организмов: фасоли (*Avena sativa* L.), овса (*Phaseolus vulgaris* L.), огурца (*Cucumis sativus* L.), выращенных в климатической камере. Проанализирован состав шлама и его фракций, методом рентгенофлуоресцентного анализа, основным компонентом является оксид железа (III), от 2 до 8 % соединения кремния (IV), кальция (IV), цинка (II), алюминия (III). Проведено спектрофотометрическое определение содержания пролина в тест-организмах. Выявлена зависимость изменения уровня пролина в растениях фасоли, овса и огурца от состава используемого субстрата. Установлено, что при введении в субстрат шлама и его фракций в различных концентрациях происходит видоспецифическое влияние на растения, что характеризуется изменением уровня пролина в листьях тест 3-организмах.**

**Ключевые слова:** стресс-реакция, высокодисперсные металлургические отходы, пролин, пищевые растения.

## **RESEARCH ON EFFECTS OF HIGHLY DISPERSED METALLURGICAL WASTES PROLINE CONTENT IN THE LEAVES OF SOME AGRICULTURAL PLANTS**

**Zibareva L. N., Zhilina O. V., Burenina A. A., Morgalev Y. N.**

*National Research Tomsk State University, Siberian Botanical Garden, Russia (634050, Tomsk, Lenin Avenue, 36), e-mail: zibareva.lara@yandex.ru*

**Revealed the effect of highly dispersed technogenic waste metallurgy to changes pool of proline in the leaves test organisms: of beans (*Avena sativa* L.), of oats (*Phaseolus vulgaris* L.), of cucumber (*Cucumis sativus* L.), grown in the climatic chamber. Analyzed the composition of the sludge and its of fractions by XRF analysis, the main component is iron oxide (III), from 2 to 8 % silicon compound (IV), calcium (IV), zinc (II), aluminum (III). Conducted spectrophotometric determination of proline content in the test organisms. The dependence of the change in the level of proline in plants, beans, oats and cucumber on the composition of the substrate used. Is established that the introduction of sludge into the substrate and its fractions at various concentrations is certain impact on plants that is characterized by level changes of proline in the leaves of the test organisms.**

**Key words:** stress-response, highly-metallurgical waste, proline, edible plants.

### **Введение**

Ежегодно в России образуется около 1,6 миллиардов тонн техногенного сырья. Запасы отходов металлургических, горнодобывающих, химических производств и топливно-энергетического комплекса составляют около 80 млрд тонн. На ТЭС России образуется за год 40 млн тонн золы и шлаков, причем из этого количества утилизируется всего около 4 %, а остальные размещаются на золошлакоотвалах. Техногенных отходов от металлургических и химических производств, содержащих соединения различных металлов, в целом по России по оценкам специалистов накоплено от 450 до 550 миллионов тонн, и эти запасы продолжают накапливаться [2]. На сегодняшний день появилась необходимость утилизации этих отходов. С одной стороны, активно над этой проблемой работают технологи химического производства, поскольку содержание многих ценных компонентов в шлаках – часто превышает их содержание в исходных рудах, а объемы запасов техногенных

месторождений сопоставимы с находящимися в эксплуатации природными месторождениями. И с другой стороны – биологами разрабатываются регламенты по целевому использованию техногенных отходов металлургических комбинатов в качестве субстратов для выращивания сельскохозяйственных культур.

Данная работа посвящена исследованиям воздействия высокодисперсных техногенных отходов Череповецкого металлургического комбината на растения различных видов.

Установлено, что накопление низкомолекулярных соединений является одним из ранних адаптивных реакций растений на действие стрессоров различной природы, одним из таких соединений является аминокислота пролин. Увеличение его количества может быть связано как с усилением синтеза, так и с активацией катаболического потока. Пролин обладает антиоксидантными, антиденатурационными, мембранопротекторными, осморегуляторными свойствами. Так, обезвоживание вызывало десятикратное увеличение содержания пролина в растениях рода *Melaleuca* [6]. Инкубация каллусов *Brassicacampestris* на засоленной среде приводила к повышению количества этой аминокислоты в них в 15–20 раз [7]. Значительное повышение концентрации пролина происходило в ответ на осмотический и солевой стрессы в изолированных листьях пшеницы, корнях и листьях шелковицы [4, 5].

Цель работы состоит в выявлении особенностей влияния высокодисперсных техногенных отходов на содержание пролина в листьях растений фасоли (*Avena sativa* L.), овса (*Phaseolusvulgaris*L.), овса (*Cucumis sativus*L.).

### **Материалы и методики исследования**

Для исследований использовали субстраты, которые содержали высокодисперсные отходы Череповецкого металлургического комбината (высокодисперсного отхода металлургии, ВМО, шлам). Химический состав шлама и его фракций определяли методом рентгенофлуоресцентного анализа. Установлено, что в составе шлама от 50 до 55 % содержится оксид железа (III), остальное – соединения кремния (IV), кальция (IV), цинка (II), алюминия (III) в количестве от 2 до 8 %. Приготовление субстратов для исследований заключалось в смешивании исходного шлама с референтной почвой в соотношении 1:10 (ШИ 10 %) и 1:100 (ШИ 1 %), а также во фракционировании исходного шлама методом осаждения в дистиллированной воде. Шлам в концентрации 10 г/л диспергировали в дистиллированной воде с помощью шейкера в течение двух часов, отстаивали 1 сутки, отделяли верхнюю (ВФ) и нижнюю (НФ) фракции. Установлено, что в верхнюю, надосадочную фракцию переходит 2 % веществ, содержащихся в шламе исходном (преимущественно – высокодисперсных компонентов). Крупные частицы и агломераты оседают и концентрируются в нижней фракции.

Исследования проводили на тест-растениях фасоли (*PhaseolusvulgarisL.*), овса (*Avena sativa L.*), огурца (*Cucumis sativusL.*), выращивание на субстратах с добавлением шламов и его фракций в различных концентрациях. Семена высевали в сосуды объемом 500 мл с массой почвы 400 г (70 % песка, 30 % торфа; рН среды – 7). Исходный образец шлама вносили в сухом виде непосредственно в почву перед посевом семян в соответствующей концентрации. При исследовании влияния на растения верхней и нижней фракций ВМО в опытные сосуды добавляли по 80 мл растворов следующих концентраций: верхняя фракция 100 и 10 %, нижняя фракция 10 и 1 % (проценты приведены по отношению к концентрациям, полученным в результате фракционирования) (табл. 1).

В контрольные сосуды (с почвой без ВМО) и опытные сосуды (с содержанием в почве ВМО) добавляли по 80 мл дистиллированной воды. Растения выращивали в климатической камере при постоянной температуре 22 – 23 °С и освещенности 150 лкдо 10-дневного возраста и затем определяли содержание пролина в листьях растений. Уход за растениями в сосудах заключался в прореживании (фасоль) и поливе.

Таблица 1. Состав шламов и фракций, вводимых в состав субстратов

| Тест-растение              | Концентрации высокодисперсных техногенных отходов, % |    |                          |     |                         |    |
|----------------------------|--|----|--------------------------|-----|-------------------------|----|
|                            | Шлам исходный,<br>(ШИ)                               |    | Верхняя фракция,<br>(ВФ) |     | Нижняя фракция,<br>(НФ) |    |
| <i>Avena sativa L.</i>     | 1  | 10 | 10                       | 100 | 1                       | 10 |
| <i>Cucumis sativusL.</i>   | 1  | 10 | 10                       | 100 | 1                       | 10 |
| <i>PhaseolusvulgarisL.</i> | 1  | 10 | 10                       | 100 | 1                       | 10 |

Содержание пролина в растительном сырье определяли спектрофотометрическим методом [1, 4, 5]. За основу принята методика [1], которая модифицирована нами применительно к объектам исследования. Для определения пролина в растительных объектах (листья фасоли, овса и огурца) проводили водную экстракцию сырья в течение 5 минут. Приготовление пробы для анализа заключалось в получении комплексного соединения, образующегося в результате реакции между пролином и нингидридным реагентом при нагревании в течение 1 часа, в результате раствор окрашивается от слабо желтого до ярко-желтого цвета. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре SHIMADZU UV-1800 при длине волны 520 нм. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета Statistika 6.0.

### Результаты эксперимента и их обсуждение

При фракционировании химический состав шлама в жидкости верхней фракции значительно изменяется, при этом состав шлама нижней фракции практически не изменен по отношению к исходному составу. Относительно содержания железа в шламе верхней фракции уменьшается в 3–4 раза, а концентрация минеральной составляющей – соединений кальция, серы и калия в 3–4 раза возрастает. Более чем в 5 раз возрастает концентрация тяжелого металла цинка, находящегося в высокодисперсном состоянии. Такое значительное различие химического состава фракций предполагает вероятность их различного воздействия на биологические объекты. Следует отметить, что содержание пролина в контрольном образце фасоли значительно ниже – 0,810 мг/г (сухого вещества) по сравнению с контрольными образцами овса – 1,353 мг/г (сухого вещества) и огурца – 1,430 мг/г (сухого вещества).

На рисунках 1–3 представлены результаты эксперимента по определению концентрации пролина в образцах, выращенных в контрольной культивационной среде и в культивационных средах с добавлением шлама и его фракций (1 – контроль без шламов; 2 – ШИ 1 %; 3 – ШИ 10 %; 4 – ВФ 10 %; 5 – ВФ 100 %; 6 – НФ 1 %; 7 – НФ 10 %).

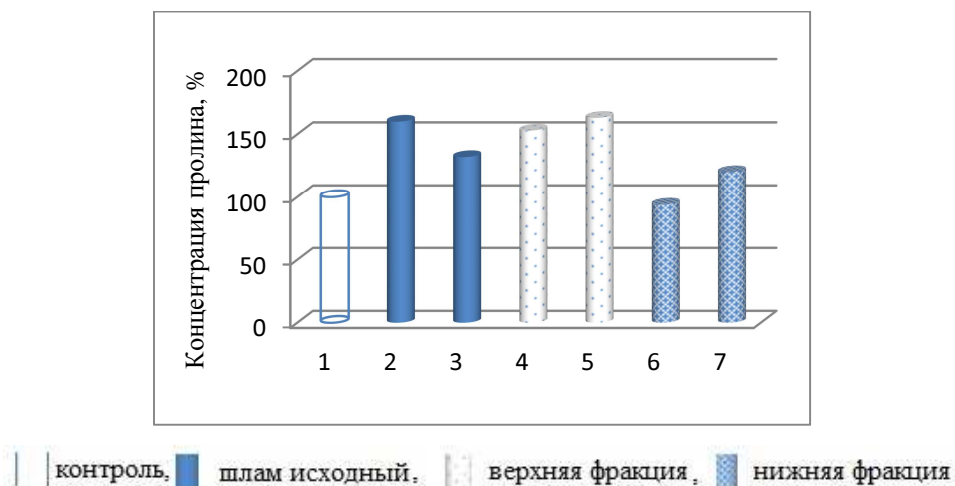


Рисунок 1. Изменение концентрации пролина в листьях фасоли

Для всех исследованных образцов листьев фасоли и овса наблюдалось увеличение концентрации пролина по отношению к контрольному образцу, что свидетельствует о влиянии шлама и его фракций на тест-образцы.

Максимальное воздействие на листья фасоли (рисунок 1) наблюдалось при использовании концентрации 1 % исходного шлама. Наибольший отклик на обработку овса отмечен при 100 % концентрации верхней фракции исходного шлама (ВФ 100 %). По всей вероятности, сказывается специфичная реакция разных растительных организмов на загрязнения поллютантами. Такая оценка сделана на основании повышения уровня пролина по

отношению к контролю, так для образцов фасоли, выращенных под воздействием раствора шлама исходного 1 %, концентрация пролина на 51 % превышает таковую в контрольном образце, а при концентрации шлама исходного 10 % установлено увеличение содержания пролина на 16 %. Для образцов, выращенных под воздействием верхней фракцией 10 и 100 %, наблюдается увеличение концентрация пролина на 23 и 32 % соответственно относительно контрольного образца. Та же тенденция сохраняется и для образцов, обработанных растворами нижней фракции с концентрациями 1 и 10 %, на 9 и 38 % относительно контрольного образца соответственно. Концентрационная зависимость наблюдалась при обработке растений фракциями шлама исходного.

Для образцов овса (рисунок 2) сохраняется тенденция повышения уровня пролина, преувеличение концентрации поллютантов, что является быстрой реакцией растения на действие стресс-факторов. Причем, наблюдается четкая зависимость биосинтеза пролина от концентрации шлама исходного и фракционированных растворов. В образцах овса, выращенных под действием раствора исходного шлама 1 и 10 %, зафиксировано увеличение количество пролина на 29 и 66 % соответственно относительно контрольного образца. Для образцов, обработанных растворами верхней фракции 10 и 100 %, содержание пролина возросло на 43 и 81 % относительно контроля. Аналогичная картина наблюдалась в образцах овса после обработки растворами нижней фракции 1 и 10 % – концентрация пролина увеличилась на 39 и 59 %.

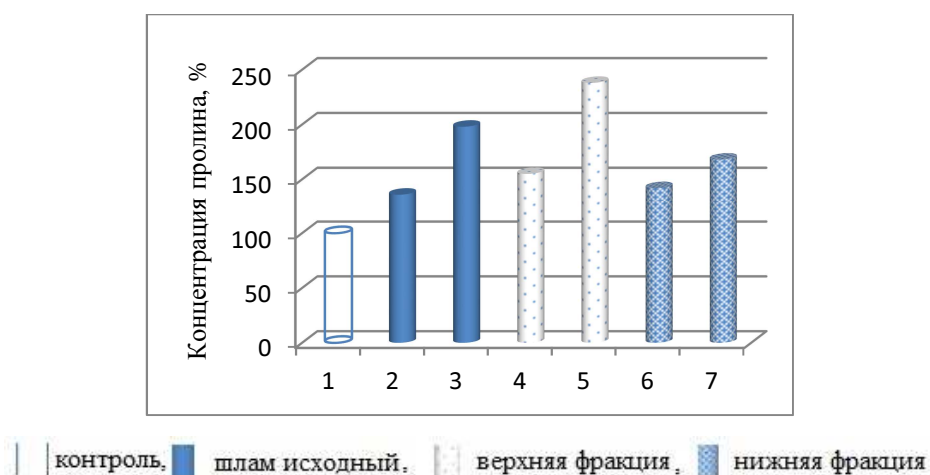


Рисунок 2. Изменение концентрации пролина в листьях овса относительно контрольного образца

Для образцов огурца (рисунок 3) изменение концентрации пролина имеет другой характер. Так для образцов, выращенных под воздействием верхней фракции 10 % и нижней фракции 10 %, установлено увеличение концентрации пролина на 54 % относительно контрольного образца. В растениях, выращенных под воздействием раствора шлама

исходного 1 и 10 %, концентрация пролина снижается по отношению к контрольному образцу на 24 и 49 % соответственно. В растениях, выращенных под воздействием верхней фракции 100 % и нижней фракции 1 %, концентрация пролина снижена на 44 и 25 % по сравнению с контролем.

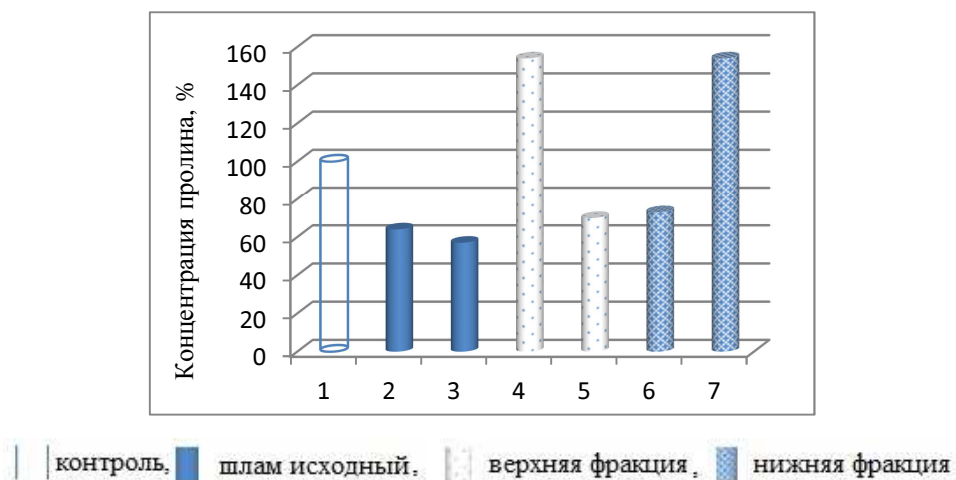


Рисунок 3. Изменение концентрации пролина в листьях огурца относительно контрольного образца

В результате исследований установлено, что изменение концентрации пролина в листьях фасоли, овса и огурца при воздействии исходного шлама и его фракций на растения происходит по-разному (рисунок 4). Во всех случаях для фасоли и овса характерно увеличение концентрации пролина по отношению к контрольному образцу. Наибольший отклик нами установлен при наличии в субстрате ШИ 10 % для фасоли и ВФ 100 % для овса. В листьях огурца концентрация пролина уменьшается во всех случаях кроме – ВФ 10 % и НФ 10 %. Следует отметить, что ВФ 10 % и НФ 10 % у всех растений вызывает увеличение концентрации пролина. Наименьшее действие на растение оказывает НФ 1 %, в случае фасоли и огурца концентрация пролина снижается. Субстраты разных составов оказывают видоспецифическое действие на количество пролина в растениях.

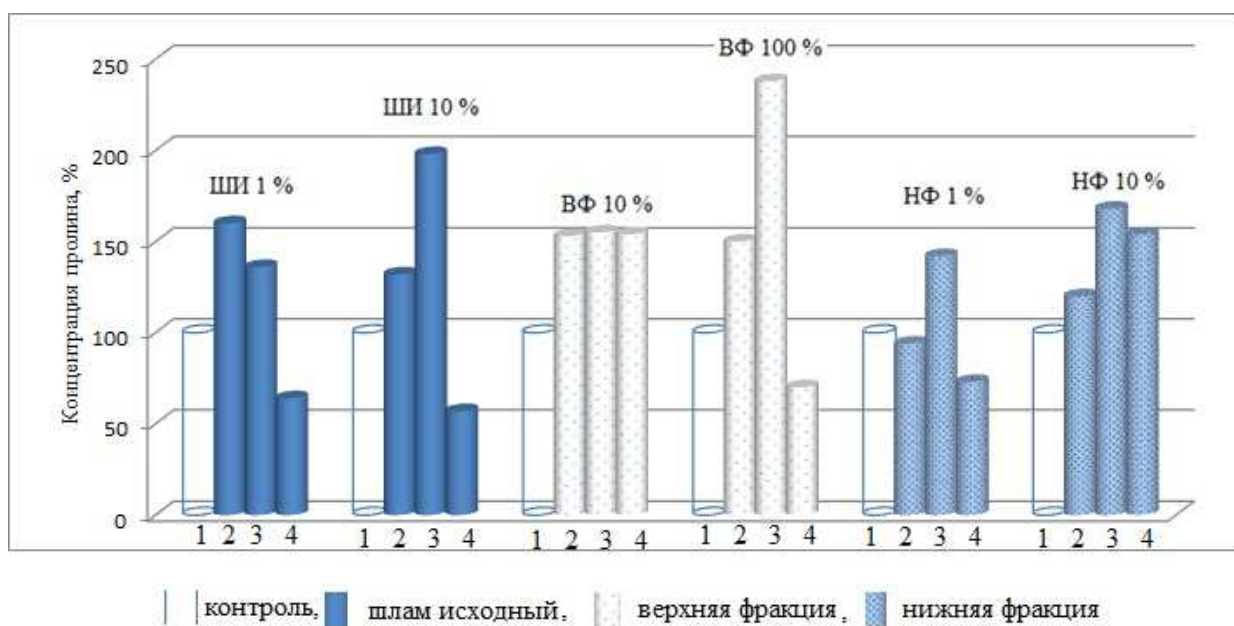


Рисунок 4. Изменение концентрации пролина в образцах: 1 – контрольный образец, 2 – фасоль, 3 – овес, 4 – огурец

Таким образом, установлено, что при использовании для выращивания растений субстратов, содержащих шлам и его фракции в различных концентрациях, в качестве показателя стресс-воздействия на растение можно использовать определение количества такого стресс-маркера, как пролина, позволяющего, в том числе, выявить видоспецифичность действия шламов на растения.

*Работа выполнена в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы» (ГК № 14.512.12.0003).*

### Список литературы

- ГОСТ Р 51124–97 Фотометрические методы определения пролина.
- Крайденко Р. И. Хлорид аммония в химической технологии // Химическая технология. – 2011. – Т. 12, № 1. – С. 8–11.
- Полевой В. В., Чиркова В. В., Лутова Т. С. и др. Практикум по росту и устойчивости растений. Накопление свободного пролина. – СПб: Изд-во С.-Петербургского ун-та, 2001. – С. 139-141.
- Bates L. S., Waldra R. P., Teare I. D. Rapid determination of free proline for water stress studies // Plant Soil. – 1973. – V. 39. – P. 205–208.
- Erdei L., Trivedi S., Takeda K., Matsumota H. Effect of osmotic and salt stresses on the accumulation of polyamines in leaf segments from wheat varieties differing in salt and drought tolerance // J. Plant Physiol. – 1990. – V. 137. – P. 165-168.

6. Naidu B. R., Jones G. P., Paleg L. G. et al. Proline analogues in melaleuca species: response of *Melaleuca lanceolata* and *M. uncinata* to water stress and salinity // *Austral. J. Plant Physiol.* – 1987. – V. 14. – P. 669-677.
7. Paek K. Y., Chandler S. F., Thorpe T. A. Physiological effects of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and NaCl on callus cultured of *Brassica campestris* // *Physiol. Plant.* – 1988. – V. 72. – P. 160-166.
8. Veeranjahyulu K., Kumari B. D., Ranjita D. Proline metabolism during water stress in momberry // *J. Exp. Bot.* – 1989. – V. 40. – P. 581-583.

**Рецензенты:**

Головацкая Ирина Феокистовна, доктор биологических наук, профессор, Биологический институт, кафедра физиологии растений и биотехнологии, Томский государственный университет, г. Томск.

Астафурова Татьяна Петровна, доктор биологических наук, профессор, Физико-технический институт, заведующий кафедрой «Химическая технология редких, рассеянных и радиоактивных элементов», Томский государственный университет, г. Томск.