

*На правах рукописи*

*Мадж -*

МАДЖУГИНА Юлия Григорьевна

Исследование способности вейника наземного аккумулировать  
тяжелые металлы с целью разработки технологии фиторемедиации

03.00.12. – физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2008

Работа выполнена в Лаборатории физиологических и молекулярных механизмов адаптации Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор

Шевякова Нина Ивановна

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор

Кошкин Евгений Иванович

кандидат биологических наук

Серегин Илья Владимирович

**Ведущая организация:** Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН

Защита диссертации состоится «23» декабря 2008 года в 11 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.210.01 при Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу:

127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.

Факс: (495) 9778018, email: ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан «30» сентября 2008г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** В настоящее время проблема загрязнения биосферы токсичными соединениями, в том числе и тяжелыми металлами (ТМ) становится все более актуальной. Хозяйственная деятельность человека (сжигание жидкого и твердого топлива; металло-плавильное производство; сбрасывание сточных вод; внесение в почву химикатов, в том числе удобрений и т.п.) приводит к загрязнению ТМ всех компонентов окружающей среды: воздуха, воды, почв. В почвах тяжелые металлы находятся в разной степени доступности для растений. Водорастворимые формы ТМ, как правило, представлены хлоридами, нитратами, сульфатами и органическими комплексными соединениями. ТМ сравнительно быстро накапливаются в почве и крайне медленно из нее выводятся: период полужизни цинка - до 500 лет, кадмия - до 1100 лет, меди - до 1500 лет, свинца - до нескольких тысяч лет. Тяжелые металлы ингибируют фотосинтез, нарушают минеральное питание, тормозят рост и изменяют водный баланс и гормональный статус растений.

Восстановление окружающей среды при помощи растений вызывает широкий интерес во всем мире благодаря возможностям, которые открывает технология фиторемедиации для очистки верхних слоев загрязненных почв. Исследования показывают, что растения позволяют очистить окружающую среду от металлов, а фиторемедиация – использование зеленых растений для удаления загрязнителей из пахотного слоя почв или превращения последних в безвредные соединения, постепенно внедряется, как природоохранная технология. Культивирование растений-гипераккумуляторов ТМ, на загрязненных территориях позволяет очистить почву от избытка металлов.

Метод фиторемедиации не требует больших затрат, прост в практическом осуществлении и применим в любых экологически неблагоприятных зонах. Методы фиторемедиации разрабатывают и внедряют в Болгарии, США, Великобритании, Испании, Канаде, Китае, Мексике, Новой Зеландии и других странах.

Однако, внедрение этой природоохранной технологии в России в значительной степени тормозится из-за необходимости поиска растений-аккумуляторов ТМ,

характерных для наших экологических условий, или использования интродуцентов. Тем не менее, работы отечественных исследователей по аккумуляции ТМ дикорастущими и культурными растениями дают достаточные основания для поиска растений, пригодных для внедрения технологии фиторемедиации в России.

Применение технологии фиторемедиации может оказаться весьма перспективным для обезвреживания полигонов захоронения твердых бытовых отходов (ТБО). Следует отметить, что в нашей стране работы по биологической рекультивации таких полигонов находятся в самом начале развития и основаны в значительной степени на отечественном опыте рекультивации нарушенных земель в промышленных зонах. Грунты, используемые для перекрытия отходов, не должны быть загрязнены ТМ. Однако, поскольку образуется слоистая толща, то в перекрывающие мусор грунты поступают различные токсичные вещества из ТБО, в том числе ТМ, что со временем создает опасность загрязнения ими поверхностных слоев почвы. Это препятствует при закрытии полигонов захоронения ТБО созданию на них газонов, засеваемых традиционными видами газонных трав. По этой причине при проведении рекультивационных работ необходимо использовать виды газонных трав с высокой фиторемедиационной способностью.

**Цель и задачи исследования.** Цель работы – провести скрининг устойчивых к тяжелым металлам рудеральных видов растений и исследовать фиторемедиационную способность вейника наземного (*Calamagrostis epigeios* (L) Roth), типичного представителя флоры средней полосы, обладающего повышенной устойчивостью к химическим элементам, в том числе к ТМ. В качестве объекта загрязнения ТМ и распространения популяций вейника наземного использовались полигоны захоронения ТБО, расположенные в “Хметьево“ в Северо-Западном районе Московской области.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить способность вейника наземного формировать устойчивый растительный покров в условиях естественного зарастания закрытых полигонов захоронения ТБО.

2. Выяснить способность вейника наземного аккумулировать ТМ (Ni, Zn, Cu, Pb) в листьях и корнях растения в условиях почвенной и водной культуры.

3. Исследовать влияние ТМ на физиологические параметры вейника: прорастание семян, накопление биомассы, содержание хлорофилла, устойчивость к периодическому скашиванию и способность выносить ТМ с зеленой массой при скашивании.

4. Изучить особенности адаптации растений вейника наземного к комплексному загрязнению ТМ и противогололедными средствами (NaCl и CaCl<sub>2</sub>) – как одними из сопутствующих факторов загрязнения.

5. Исследовать распределение Ni, Cd и Pb в тканях корня и побега вейника после их кратковременного воздействия на растения в водной культуре.

6. Определить целесообразность использования вейника наземного для фиторемедиации грунтов, загрязненных ТМ.

**Научная новизна.** Впервые при геоботаническом обследовании полигонов захоронения ТБО и проведении скрининга растительных сообществ были выявлены рудеральные виды растений, способные произрастать на загрязненных территориях и выносить ТМ с надземной массой. Среди них особое внимание привлек вейник наземный, который впервые детально изучен по ряду физиологических и биохимических параметров (содержанию хлорофилла, накоплению осмопротектора пролина, устойчивости к ТМ в фазе прорастания семян и вегетативного роста, способности накапливать ТМ в корнях и надземной массе и др.), что важно для характеристики его как фиторемедианта. Впервые показано, что вейник наземный устойчив к скашиванию, что является необходимым условием применения его для очистки загрязненных субстратов. Впервые проведено гистохимическое изучение закономерностей распределения Ni, Cd и Pb по тканям корня и побега вейника наземного.

**Практическая значимость.** Экспериментально доказано, что вейник наземный – перспективный вид для рекультивации грунтов, перекрывающих ТБО на полигонах, загрязненных различными ТМ и засолением. Вейник способен длительно произрастать на грунтах со смешанным загрязнением, создавать густой растительный

покров, накапливать ТМ в наземной биомассе и выносить из загрязненных ТМ грунтов порядка 1000 мг/кг ТМ. Доказано, что вейник наземный является аккумулятором ТМ, особенно Ni.

Эти свойства дают нам возможность рекомендовать его как потенциального компонента травосмесей для фиторемедиации перекрывающих грунтов на полигонах захоронения ТБО, а также придорожных газонов.

**Апробация работы.** Материалы данной работы были представлены на общегородской конференции «Проблемы озеленения крупных городов» (Москва, 2004 и 2005), на международной конференции «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия» (Вологда, 2005), на семинаре ИФР РАН (Москва, 2005), на IV международном симпозиуме «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования» (Москва, 2005), на международном семинаре «Проблема восстановления почвогрунтов объектов городских территорий и промышленных площадок» (Москва, 2006) и на Международной конференции «Joint Annual Meeting – GSA, SSSA, ASA, CSSA, GCAGB» (Хьюстон, 2008).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 6 работ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объекта и методов исследований, изложения полученных результатов, обсуждения, заключения и выводов. Работа изложена на 125 страницах машинописного текста, включая 16 таблиц, 23 рисунка; библиография содержит 153 названия, из них 102 – на иностранных языках.

## ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объект исследования.** *Calamagrostis epigeios* (L) Roth (Вейник наземный) – многолетнее длиннокорневищное травянистое растение высотой 40–150 см. Цветёт в июне–июле. Полиморфный вид. Распространен на песках, травянистых склонах, сухих лугах, в степях, среди кустарников, преимущественно на супесчаных почвах, в лесах. Факультативный эндемик, устойчивый к химическим элементам, в том числе к тяжелым металлам.

Для исследований семена вейника наземного были собраны на закрытом более десяти лет (1990 г.) полигоне захоронения ТБО, где растения образовали монокультуру, сформировав густой травяной покров.

Для изучения влияния на растения вейника разной степени загрязненности субстрата были исследованы почвы полигонов «Хметьево», закрытых для захоронения ТБО 7 и 15 лет назад. В полевых условиях было выбрано 11 реперных точек, различающихся по зарастанию рудеральными видами растений, и отобраны образцы грунта с глубины 0-5, 5-10 и 10-15 см для определения в них содержания подвижных форм ТМ. На тех же участках были отобраны образцы произрастающих на них дикорастущих растений и в их числе вейника наземного, которые характеризовали по способности накапливать в их органах различные ТМ.

Вынос ТМ с биомассой вейника при периодическом скашивании его посевов исследовали в модельных опытах, в которых семена вейника высевали в пластиковые контейнеры, заполненные торфяной смесью с внесением водных растворов солей различных ТМ:  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ . Для характеристики вейника по ряду физиологических параметров и накоплению ТМ, растения выращивали в водной культуре в камере фитотрона при дневной и ночной температуре  $23-25^\circ\text{C}$  и  $18-20^\circ\text{C}$  соответственно. Продолжительность фотопериода составляла 12 часов при интенсивности освещения  $350 \text{ мкмоль/м}^2\text{с}$  натриевыми лампами ДНаЗ Reflux (фирма Reflux, Россия). Посев семян производили в кюветы с перлитом. В возрасте 2-3 недель по 20 растений погружали корнями в стеклянные сосуды емкостью 1 л, заполненные питательным раствором (Johnson, 1957). После 1 недели произрастания растений в контрольных условиях в питательную среду по вариантам вносили ТМ: 0.1 и 0,2 мМ  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ ; 0.1 и 0.2 мМ  $\text{CdCl}_2$ . В отдельных опытах в те же сроки проводили засоление питательной среды различными концентрациями  $\text{NaCl}$  и  $\text{CaCl}_2$ . Продолжительность опытов с действием ТМ и засоления составляла 7 дней.

Измерение сырой и сухой массы отдельных органов растения (листьев, стеблей и корней) проводили стандартным весовым методом.

Для определения влияния ТМ на прорастание семя вейника, предварительно обработанные 0,1% раствором марганцовокислого калия, по 50 штук помещали на фильтровальную бумагу в стерильные чашки Петри. В чашки Петри вносили соли тяжелых металлов в различных концентрациях. Проращивание семян проводили в следующих условиях: на 2 дня чашки помещали в холодильник (+ 4°C), а затем семена прорастали в тех же факторостатных условиях, которые использовали для выращивания опытных растений; через 7 дней подсчитывали число проросших семян.

Определение содержания подвижных форм ТМ в грунтах проводили на атомно-абсорбционном спектрофотометре ААС3 (Япония). Подготовка проб к анализу проводилась согласно методике, предложенной А.И. Обуховым, И.О. Плехановой (1991г.).

Приготовление проб для определения валового содержания ТМ в растениях проводили путем мокрого озоления по методу Н.А. Голубкиной, концентрацию ТМ также измеряли на атомно-абсорбционном спектрофотометре ААС3 (Япония).

Содержание свободного пролина определяли с помощью метода Bates с соавторами. Для калибровки использовали пролин фирмы Sigma (США).

Локализацию Ni, Cd и Pb в тканях побегов и корней вейника устанавливали гистохимическим методом (Серегин и др., 2003). Окрашенные ткани на срезах рассматривали под световым микроскопом Amplival («Carl Zeiss», Германия). Микрофотографии получали с помощью видеокамеры JVC ТК-С1480Е (Япония).

Опыты проведены в 3-4 кратной повторности. Анализы выполняли в 3-х биологических и 2-х аналитических повторностях. В таблицах и на рисунках представлены средние значения при 95% уровне вероятности.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Обследование полигонов захоронения ТБО

Обследование опытных полигонов и определение степени загрязнения ТМ поверхностного слоя грунтов на свалке в “Хметьево” проводили после разного времени (7 и 15 лет) прекращения работ по захоронению ТБО. Для закрытия ТБО использовались грунты, завезенные из соседнего карьера соответственно в 1997 и 1990 гг. Эти грунты, используемые для перекрытия отходов, не должны были быть загрязнены ТМ, так как до 2002 г. они завозились из карьера, расположенного в лесном массиве, не испытывающем какого-либо антропогенного воздействия. В этом случае опасность загрязнения ТМ грунтов поверхностного слоя закрытых полигонов можно было ожидать только в результате подъема металлов из нижележащих слоев.

**Таблица 1.** Содержание подвижных форм ТМ в почво-грунтах, перекрывающих ТБО, на полигонах разного времени закрытия в “Хметьево“

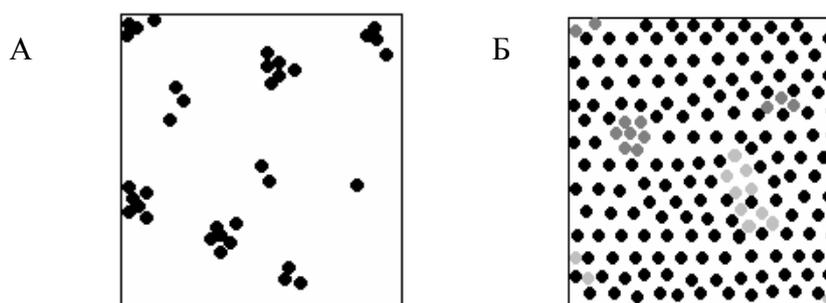
год закрытия полигона	глубина взятия образцов, см	Содержание ТМ*, мг/кг почво-грунта									
		Cd		Pb		Cu		Zn		Ni	
		среднее*	max	среднее	max	среднее	max	среднее	max	среднее	max
1997	0-5	1.4	<b>1.7</b>	3.6	<b>210.3</b>	30.0	<b>107.0</b>	25.0	<b>109.3</b>	9.7	<b>10.0</b>
	5-10	1.3	<b>1.6</b>	7.0	<b>10.6</b>	6.2	<b>9.2</b>	12.0	<b>16.1</b>	11.1	<b>16.4</b>
	10-15	1.6	<b>3.6</b>	15.0	<b>51.0</b>	8.6	<b>12.0</b>	18.0	<b>39.5</b>	12.0	<b>16.4</b>
1990	0-5	0.8	<b>1.2</b>	8.5	<b>11.2</b>	6.1	<b>8.7</b>	15.1	<b>22.0</b>	8.6	<b>12.8</b>
	5-10	0.7	<b>1.1</b>	7.5	<b>10.3</b>	5.5	<b>9.2</b>	13.0	<b>16.1</b>	10.1	<b>12.2</b>
	10-15	0.6	<b>0.9</b>	8.0	<b>10.1</b>	7.4	<b>12.1</b>	12.0	<b>17.6</b>	8.9	<b>12.8</b>

\* Средние и максимальные значения содержания ТМ взяты из 5-7 повторностей для каждого вида ТМ.

Из данных, представленных в таблице 1, следует, что в целом содержание ТМ, доступных для растений, пока не представляется опасным. Однако, в отдельных точках на разной глубине обнаружен повышенный уровень загрязнения, превышающий пороговые значения для почв средней полосы (Pb – 210,3; Cd – 3,6; Cu – 107,0; Zn – 109,3; Ni – 16,4 мг/кг грунта). На полигоне 1990 г. (15 лет после

закрытия) средние значения (табл.1) и пороговое содержание тех же видов ТМ было ниже (Pb – 11,2; Cd – 1,2; Cu – 12,1; Zn – 22,0; Ni – 12,8 мг/кг грунта).

Геоботаническое обследование опытных полигонов показало, что различия между содержанием ТМ в сравниваемых грунтах объясняются тем, что зарастание рудеральными видами растений участков разного времени консервации резко различалось как по интенсивности покрытия поверхности растительностью, так и по видовому составу (рис. 1). Как видно из рисунка 1 распределение растений на полигоне 1997 г закрытия имело пятнистый характер и отличалось многообразием сорных видов (табл. 2). Более того, согласно анализу валового содержания ТМ (табл.2), практически все растения накапливали в листьях, корнях и соцветиях разные виды ТМ (особенно Zn, Ni). При этом концентрация почти всех ТМ приближалась к критическому уровню, установленному для культурных растений. Среди идентифицированных дикорастущих видов рудеральных растений были найдены хорошо развитые популяции вейника наземного (*Calamagrostis epigeios*), отличавшегося от других видов самым высоким содержанием в листьях и соцветиях Ni (690 – 703 мг/ кг сухой массы), что в 7 раз превышало его критический уровень для культурных растений.



**Рис.1.** Схема распределения растений на полигонах.

А – полигон не используется с 1997 г. Распределение растений мозаичное; в среднем 10 растений/м<sup>2</sup>. Растения образуют как отдельные видовые группы (двуклосточник, мать-и-мачеха, амарант краснолистный), так и совместные (одуванчик полевой, мелкоцветник канадский, полынь обыкновенная, ромашка непахучая).

Б – полигон не используется с 1990 г. Распределение растений регулярное; в среднем 70 растений/м<sup>2</sup>. Видовое разнообразие очень низкое. Доминирует один вид – вейник наземный. Встречаются куртины чины луговой и клевера красного.

Аккумуляция ТМ рудеральными растениями (табл. 2) и относительно низкое содержание подвижных форм ТМ в поверхностном слое грунта (табл. 1) на полигоне после 7 лет закрытия может указывать на высокую ремедиационную способность найденных видов растений, особенно у вейника наземного, несмотря на неравномерное зарастание полигона.

На полигоне 1990 г. (15 лет после закрытия) в отличие от полигона 1997 г. доминировала популяция вейника наземного, образующая монокультуру с высокой продуктивностью (150 ц/га зеленой массы в фазе созревания семян) с редким включением отдельных куртин чины луговой (*Lathyrus pratensis* L.) и клевера красного (*Trifolium rubens* L.). При этом содержание всех исследованных видов подвижных ТМ в поверхностном слое грунта на полигоне 1990 г. было ниже, чем на полигоне 1997 г. (табл. 1). На основании представленных данных можно заключить, что вейник, произраставший в течение 15 лет на полигоне 1990 г. мог перехватывать поступающие из толщи свалки ТМ и складировать их в многолетнем травяном опаде, а также концентрировать в листьях и корнях вегетирующих растений (табл. 3). Кроме того, часть подвижных ТМ, попадающих в поверхностный слой полигона, могла связываться в поглощающем комплексе примитивной почвы, формирующейся в течение 15 лет, прошедших после закрытия полигона.

Таким образом, вейник наземный - представитель многолетних злаков, привлёк внимание как возможный фиторемедиант, который в естественных условиях произрастания способен осваивать загрязненные ТМ грунты, образуя на них высокопродуктивную популяцию растений. В этих условиях в надземной массе и корнях растений вейника аккумулируются токсичные металлы, особенно Ni (табл. 2).

**Таблица 2.** Аккумуляция ТМ рудеральными растениями, произрастающими на полигоне, закрытом в 1997 г.

Вид	Орган	Содержание ТМ, мг/кг сухой массы растений				
		Cd	Pb	Cu	Zn	Ni
Полынь обыкновенная ( <i>Artemisia vulgaris</i> L.)	листья	8 ± 0,4	16 ± 0,7	38 ± 1,9	110 ± 5,5	306 ± 15,3
	соцветия	6 ± 0,3	20 ± 1,1	28 ± 1,4	100 ± 5,1	326 ± 16,3
	корни	1 ± 0,1	8 ± 0,4	18 ± 0,7	42 ± 2,1	305 ± 15,3
Щавель курчавый ( <i>Rumex crispus</i> L.)	соцветия	9 ± 0,5	16 ± 0,8	13 ± 0,7	140 ± 7,0	350 ± 17,5
	корни	14 ± 0,7	8 ± 0,5	15 ± 0,8	87 ± 4,4	318 ± 15,9
Двукосточник тростниковый ( <i>Phalaroides phragmites</i> )	листья	2 ± 0,1	8 ± 0,4	9 ± 0,6	36 ± 1,8	291 ± 14,6
	корни и корневища	3 ± 0,2	20 ± 0,9	20 ± 1,0	81 ± 4,1	212 ± 10,6
Мать-и мачеха обыкновенная ( <i>Tussilago farfara</i> L.)	листья	2 ± 0,3	16 ± 0,7	22 ± 1,1	124 ± 6,2	239 ± 11,9
	корни	1 ± 0,1	24 ± 1,3	12 ± 0,7	76 ± 3,8	308 ± 15,4
<b>Вейник наземный</b> ( <i>Calamagrostis epigeios</i> L.Roth)	<b>листья</b>	<b>8 ± 0,4</b>	<b>20 ± 0,8</b>	<b>15 ± 0,8</b>	<b>82 ± 4,1</b>	<b>703 ± 35,2</b>
	<b>соцветия</b>	<b>10 ± 0,5</b>	<b>20 ± 0,9</b>	<b>27 ± 1,4</b>	<b>93 ± 15,8</b>	<b>690 ± 34,5</b>
	<b>корни и</b>	<b>20 ± 0,9</b>	<b>30 ± 1,3</b>	<b>36 ± 1,8</b>	<b>316 ± 12,4</b>	<b>346 ± 17,3</b>
	<b>корневища</b>					
Амарант красностный ( <i>Amaranthus cruentus</i> L.)	листья	3 ± 0,7	3 ± 0,3	17 ± 0,9	148 ± 7,4	278 ± 13,9
	соцветия	1 ± 0,1	2 ± 0,4	13 ± 0,5	91 ± 4,6	164 ± 8,2
	корни	3 ± 0,2	23 ± 1,2	56 ± 2,8	193 ± 9,7	278 ± 13,9

Примечание. Представлены средние значения из трех повторностей и их стандартные ошибки.

**Таблица 3.** Аккумуляция ТМ (мг/100г сухой массы) в травяном опаде, листьях и корнях вейника наземного, произраставшего на полигоне, закрытом в 1990 г.

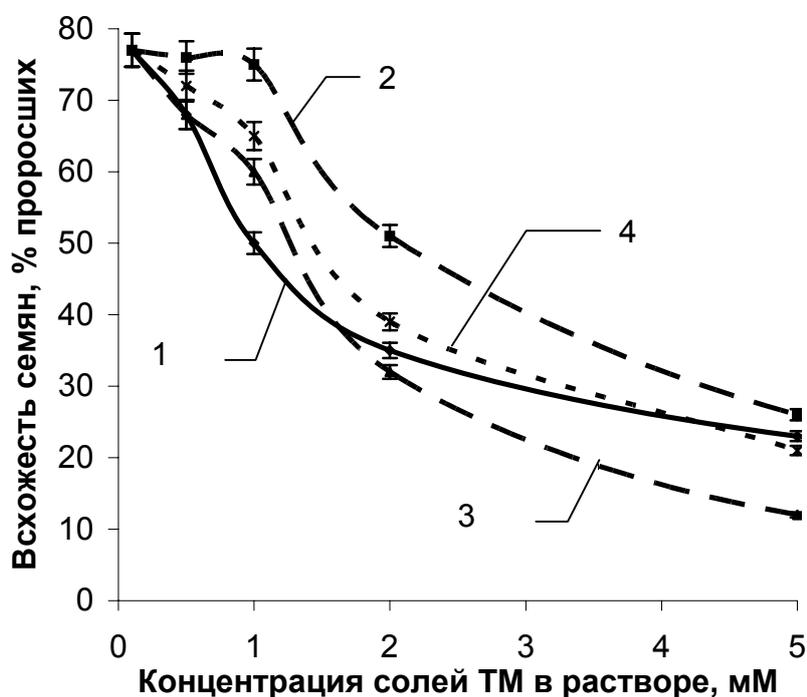
ТМ	Травяной опад	Листья вегетирующего растения	Корни и корневища вегетирующего растения
Cd	3 ± 0,2	5 ± 0,3	2 ± 0,1
Pb	32 ± 1,6	8 ± 0,5	20 ± 0,9
Cu	26 ± 1,3	12 ± 0,8	19 ± 0,9
Zn	94 ± 4,8	62 ± 3,3	89 ± 4,5
Ni	312 ± 15,5	525 ± 26,3	260 ± 12,8

Примечание. Представлены средние значения из трех повторностей и их стандартные ошибки.

### Физиологические особенности вейника наземного

Вейник наземный характеризовали по физиологическим параметрам, по которым можно судить об устойчивости вейника наземного к солям ТМ, интенсивности прорастания семян, способности к отращиванию побегов при скашивании и выносу ТМ со скошенной массой. Для этой цели в лабораторных условиях вейник наземный культивировали из семян, собранных с растений, произраставших на полигоне 1990 г.

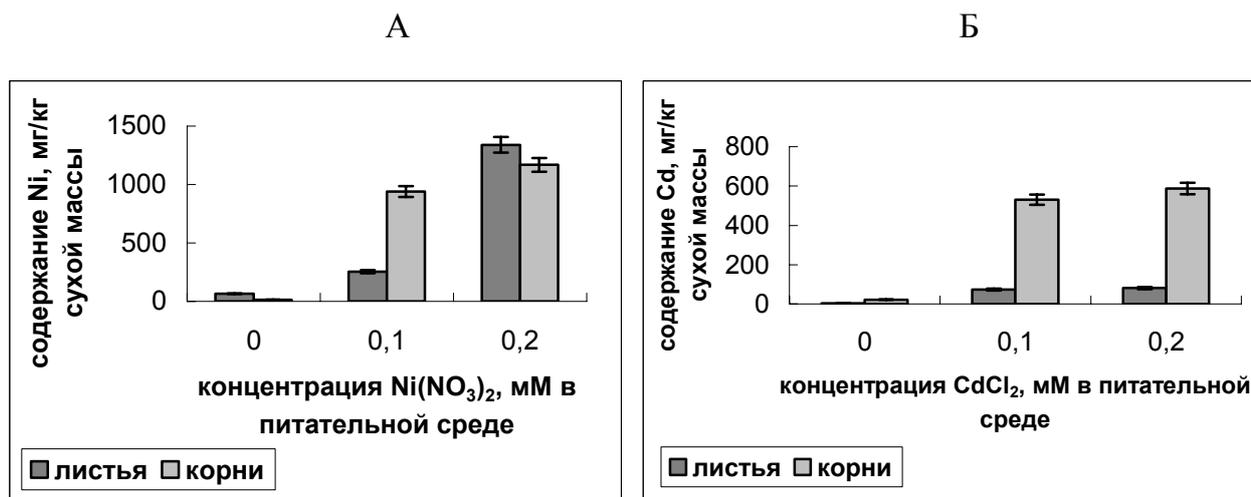
Оценка влияния солей ТМ на прорастание семян вейника наземного (рис. 2) показала более высокую устойчивость к действию Zn и Ni, т.е. к тем ТМ, которые в наибольшей степени накапливались в растениях вейника при произрастании на полигонах ТБО (табл. 2). Так, при проращивании семян в 1 мМ растворе сульфата цинка всхожесть не отличалась от контроля (77%), а в 1 мМ растворах сульфата меди, нитрата свинца и нитрата никеля составила 50, 60 и 65% соответственно. Всхожесть семян в присутствии 2 мМ солей цинка, меди, свинца и никеля составила 50, 35, 31 и 39% соответственно.



**Рис. 2.** Всхожесть семян вейника наземного в зависимости от концентрации ТМ в растворе. 1 – CuSO<sub>4</sub>, 2 – ZnSO<sub>4</sub>, 3 – Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 4 – Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

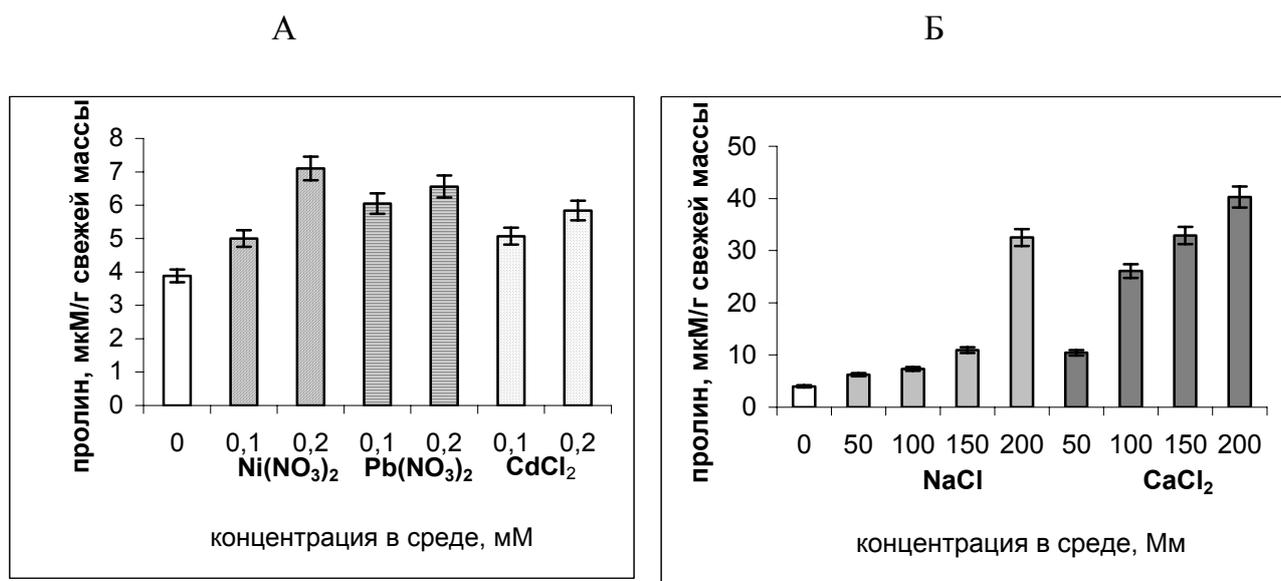
Как видно из рисунка 2, всхожесть семян вейника в контроле составила 77%, что могло быть связано с неполной зрелостью части семян, собранных на полигоне. Таким образом, устойчивость к ТМ семян вейника в фазе прорастания была довольно высокой по отношению ко всем испытанным ТМ в диапазоне до 1 мМ в водном растворе их солей, что соответствовало способности взрослых растений накапливать ТМ в тканях (табл. 3).

При экспозиции вейника в фазе кущения и массового отрастания листьев на растворах солей ТМ (0,2 мМ) в водной культуре в течение (7 дней) было найдено, что содержание Ni в побегах достигало 1350 мг/кг, а в корне – 1190 мг/кг сухой массы, соответственно (рис. 3А). Эти данные свидетельствуют о том, что корни вейника не являлось барьером для поступления Ni при действии на растения высокой концентрации этого металла в питательной среде и Ni активно транспортировался в надземные органы. Из рисунка 3Б видно, что в отличие от Ni, Cd в большей степени накапливался в корне растений, что говорит об ограниченном транспорте ионов Cd в надземную часть растения. Однако при концентрациях 0,2 мМ ТМ в питательных растворах рост побегов ингибировался, т.е. аккумуляция ТМ в растениях достигла токсического уровня. Выраженный негативный эффект ТМ на рост визуально сопровождался пожелтением листьев и их подвяданием.



**Рис. 3.** Содержание ТМ в растениях вейника наземного, произраставшего в водной культуре в течение 7 дней.

В связи с этим важно проследить изменения в содержании в растениях пролина – одного из индикаторов водного дефицита у растений, в том числе у злаков не только в условиях засухи и засоления, но и при действии ТМ. Хорошо известно, что загрязнение почв, особенно в городских условиях, является результатом действия комплекса негативных факторов: засоления, ТМ и органических поллютантов. По этой причине было важно сравнить уровень аккумуляции пролина в листьях вейника при выращивании растений в питательном растворе в присутствии двух видов засоления ( $\text{NaCl}$  и  $\text{CaCl}_2$ ) и различных ТМ. Как видно из рисунка 4 уровень аккумуляции пролина при действии 0,1-0,2 мМ солей ТМ ( $\text{Ni}$ ,  $\text{Pb}$ ,  $\text{Cd}$ ) и засоления (50-100 мМ  $\text{NaCl}$  и  $\text{CaCl}_2$ ) был вполне сравнимым, что свидетельствует, что у вейника в обоих случаях функционирует защитный механизм против комплексного загрязнения.

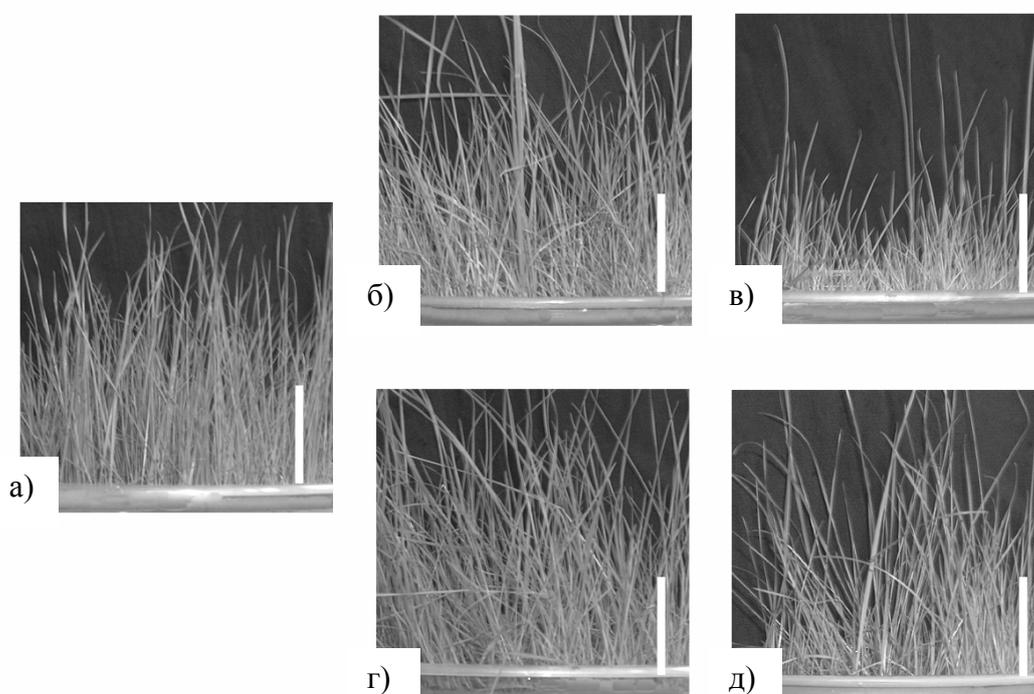


**Рис. 4.** Аккумуляция пролина в листьях вейника наземного при действии ТМ (Б) и засолении (А), в течение 7 дней произрастания в водной культуре.

#### Исследование ремедиационного потенциала вейника наземного

Для оценки возможности использования вейника наземного для рекультивации загрязненных почв было важно оценить устойчивость растений к скашиванию и определить величину выноса ТМ со скошенной биомассой при выращивании вейника в почвенной культуре с внесением солей ТМ. Как следует из рисунка 5 вейник

оказался довольно устойчивым к многократному скашиванию надземной массы, о чем свидетельствует возобновление отрастания побегов, хотя в присутствии высокой концентрации нитрата никеля (300 мг/кг почвы) суммарная надземная масса за 4-е скашивания снизилась почти в 2 раза, что значительно превышало негативный эффект солей меди (рис. 5). Вполне возможно предположить, что в отличие от других ТМ никель слабее связывался поглощающим комплексом торфа и в значительно большей степени содержался в подвижной более доступной форме для растений. Тем не менее, вынос Ni скошенной массой вейника составил 173,2 мг/м<sup>2</sup> (табл.4), что оказывается приемлемым для использования его для очистки загрязненных почв.



**Рис. 5.** Интенсивность отрастания побегов после скашивания растений вейника наземного (*Calamagrostis epigeos*), произраставших на грунтах, содержащих ТМ. а – контроль, б – 100мг Ni/кг грунта, в – 300мг Ni/кг грунта, г – 100мг Cu/кг грунта, д – 300мг Cu/кг грунта. Масштабная линейка – 5 см.

**Таблица 4.** Накопление надземной и корневой биомассы вейником наземным при периодическом скашивании в зависимости от концентрации солей ТМ в почве\*.

Внесенные в почву соли ТМ	Концентрация ТМ, мг/кг почвы	Общая надземная сухая масса за 4 скашивания, г/м <sup>2</sup>	Общая надземная сухая масса за 4 скашивания, % от контроля	Общая сухая масса корней и корневищ, г/м <sup>2</sup>	Сухая масса корней и корневищ, % от контроля	Вынос ТМ с укосом, мг/м <sup>2</sup>
Контроль	0	799 ± 39	100	3,3 ± 0,2	100	
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	60	783 ± 34	98	2,2 ± 0,1	68	248 ± 13
-	200	775 ± 37	97	1,9 ± 0,1	58	246 ± 12
-	550	719 ± 35	90	1,6 ± 0,1	49	266 ± 14
CuSO <sub>4</sub>	70	775 ± 38	97	3,5 ± 0,3	105	29 ± 2
-	350	759 ± 37	95	3,2 ± 0,2	97	77 ± 3
Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	70	703 ± 35	88	1,9 ± 0,1	59	98 ± 4
-	350	431 ± 21	54	1,7 ± 0,1	32	173 ± 8
ZnSO <sub>4</sub>	350	871 ± 43	109	3,1 ± 0,2	93	-
-	700	755 ± 37	94	2,4 ± 0,1	72	-

\* в качестве почвенного субстрата использовали торфяную смесь.

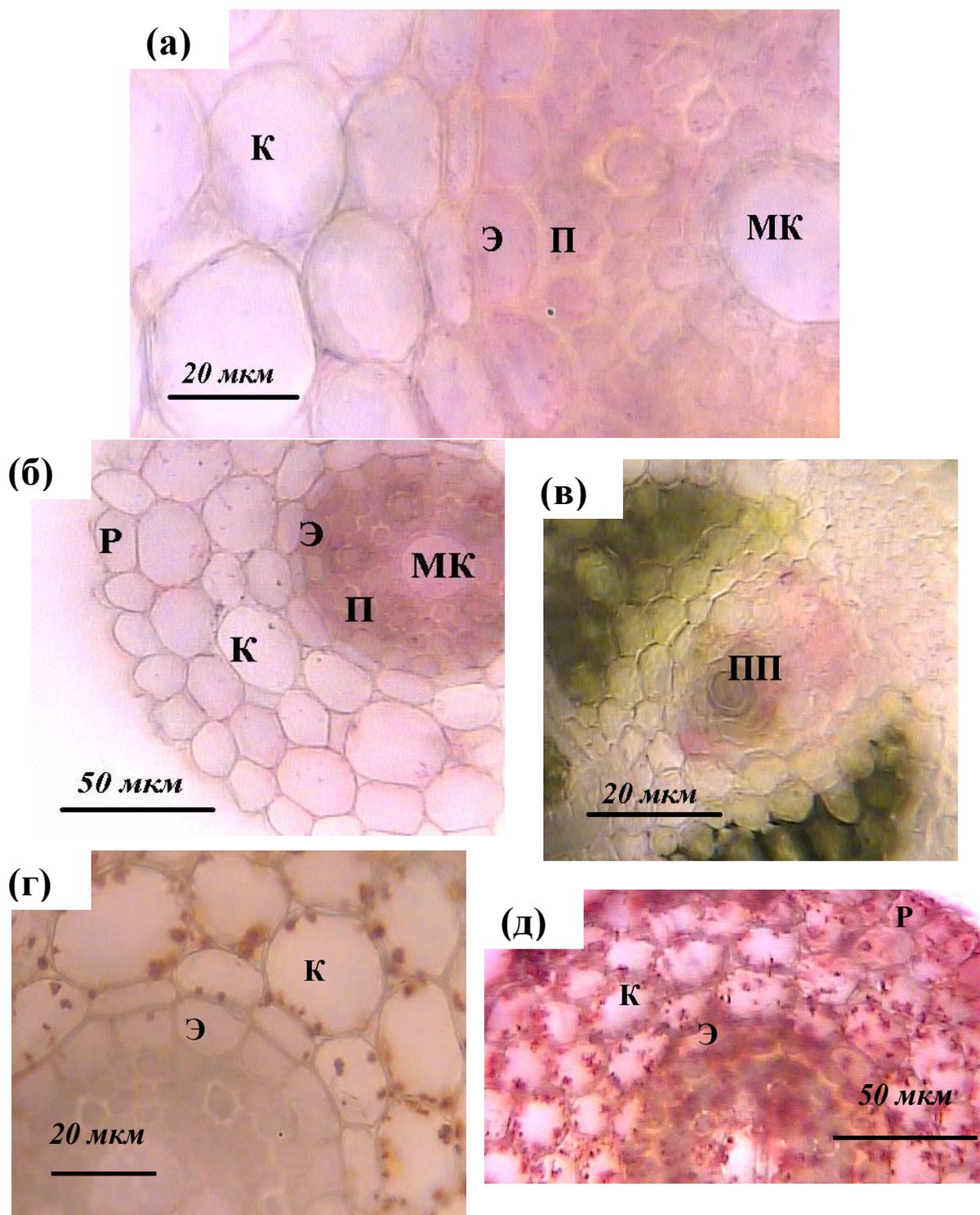
### **Распределение ТМ по тканям вейника наземного**

Выявленные закономерности накопления ТМ растениями вейника наземного свидетельствуют о том, что для этого многолетнего злака наиболее значимо проявился феномен аккумуляции Ni, что может, по крайней мере отчасти определяться особенностями его транспорта в побеги, о чем можно судить по распределению металла в тканях.

Гистохимический анализ распределения Ni в тканях вейника наземного показал, что Ni накапливается преимущественно в протопластах клеток во всех тканях корня (рис. 6 а, б, в). Ni свободно поступал в ткани центрального цилиндра, что служит доказательством того, что эндодерма не является универсальным барьером, ограничивающим транспорт тяжелых металлов в стель. В некоторых случаях отмечалось его неравномерное распределение по участкам корня. При достаточно

медленном прорастании семян и образовании первичного корня и побега (7 дней) Ni был обнаружен главным образом в клетках проводящих пучков.

В отличие от Ni, Pb и Cd накапливались, главным образом, в клеточных оболочках (рис. 6 г, д). Осадок дитизоната Pb был обнаружен во всех тканях корня, что свидетельствует о том, что при используемых концентрациях (0,1 и 0,2 мМ), эндодерма не ограничивала его поступление в ткани центрального цилиндра (рис. 6г). Cd был обнаружен преимущественно в оболочках клеток ризодермы и коры и лишь незначительное количество кристаллов наблюдалось в тканях центрального цилиндра, что свидетельствует о барьерной роли эндодермы, пояски Каспари которой ограничивают транспорт ионов, передвигающихся по апопласту (рис. 6д). В надземных органах содержание Pb и Cd было ниже предела определения дитизионового метода.



**Рис. 6.** Распределение ТМ по тканям корня и побега вейника наземного после проращивания семян в чашках Петри в течение 7 дней.

а, б, г, д – корень; г – побег. а, б, в – в присутствии  $0,2 \text{ mM Ni(NO}_3)_2$ ; г – в присутствии  $0,2 \text{ mM Pb(NO}_3)_2$ ; д – в присутствии  $0,2 \text{ mM CdCl}_2$ .

Условные обозначения:

МК – метаксилема, П – перицикл, Э- эндодерма, К – кора, ПП – проводящий пучок, Р – ризодерма, КЧ – корневой чехлик.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Идея использования растений для очистки почв от загрязнения основана на существовании в природе дикорастущих рудеральных растений – гипераккумуляторов ТМ. Однако, большинство известных гипераккумуляторов ТМ имеют низкую продукцию зеленой массы и их коммерчески не выгодно использовать для фиторемедиации. Для практического применения данной технологии необходимо подобрать виды растений, у которых концентрация ТМ в надземной массе превышает их уровень в почве и при этом способных образовывать биомассу, обеспечивающую необходимый вынос ТМ из почвы. Для достижения этой цели используются различные подходы: 1) поиск таких видов среди дикорастущей флоры, произрастающих на территориях с промышленным загрязнением, 2) улучшение их ремедиационных качеств и ростовых параметров, позволяющих получать семенное потомство и вегетативную биомассу, соответствующую требованиям практики. Это достигается получением соответствующих сортов и предпринимаются попытки создания трансгенных растений. Примером успешного применения технологии фиторемедиации (фитоэкстракции) служат сорта дикого вида *Allisum murale*, содержащие 2% Ni в побегах и листьях, и применяемые в Белствильском сельскохозяйственном исследовательском центре (США) для очистки почв.

В настоящем исследовании осуществлен поиск растений-аккумуляторов ТМ среди рудеральных дикорастущих видов, произрастающих на полигонах захоронения ТБО в “Хметьево” Московской области. Среди них особое внимание привлек многолетний злак вейник наземный (*Calamagrostis epigeios* L.), который является типичным представителем флоры средней полосы с высокой устойчивостью к загрязнению почв. Подобно другим видам, найденным на полигоне, закрытом для складирования ТБО в 1997 г., вейник накапливал в листьях и соцветиях различные металлы (Pb, Cu, Cd), но отличался от них более высокой аккумуляцией Ni (690-703 мг/кг сухой массы) (табл. 2). На полигоне, находящемся в залежи около 15 лет (с 1990 г.), вейник образовал монопопуляцию с высокой продуктивностью зеленой массы (150 ц/га). За время произрастания вейника на этом полигоне в отсутствие

скашивания все ТМ, поглощенные растением, осенью возвращались в 5 см слой перекрывающего слоя ТБО грунта, накапливались в травяном опаде и корнях (табл. 3). Благодаря этому содержание подвижной формы Ni в верхнем слое грунта на полигоне, закрытом 15 лет назад (табл. 1) было ниже, чем на участке полигона, закрытого 7 лет назад, где зарастание еще не достигло полного покрытия поверхности. По нашим предварительным подсчетам с урожаем зеленой массы (около 150 ц/га) вейник может выносить до 5 кг/га Ni в год. Это значит, что при периодическом скашивании растений и отчуждении урожая избыток никеля в почве будет удален за 5 -10 лет.

Одной из важных характеристик вейника как возможного фиторемедианта может явиться его способность к отращиванию при скашивании и выносу ТМ со скошенной массой. Как показали модельные опыты (рис. 5, табл. 4) растения вейника, выращенного из семян, собранных на опытных полигонах, были устойчивы к периодическому скашиванию, хотя в условиях длительного произрастания растений (6 месяцев) на почвенном субстрате, содержащем ТМ, объем скошенной массы и содержание в ней ТМ постепенно снижалось по мере скашивания. Следует отметить, что испытанные в опытах концентрации ТМ во много раз превышали реальные, найденные на опытных полигонах. Значительный вынос металлов надземной массой растений был также подтвержден при кратковременном (7 дней) культивировании растений в фазе кущения и массового отращивания листьев (рис. 3), хотя при этом рост растений был заторможен.

Судя по возрастанию в листьях содержания пролина растения при действии ТМ (рис. 4а) испытывали водный дефицит. В наших опытах накопление пролина в присутствии ТМ было сравнимо с действием низких доз засоления (50-100 мМ NaCl) (рис. 4б). Следовательно аккумуляция пролина в листьях при экспонировании их в присутствии Ni, Pb или Cd не индуцировалась токсичными ТМ, а скорее была следствием водного дефицита, из-за негативного действия ТМ на процессы транспирации.

Судя по возрастанию содержания в листьях осмопротектора пролина в ответ на

присутствие в среде ТМ, растения вейника наземного обладали способностью адаптироваться к стрессорному воздействию избыточных концентраций ТМ. Кроме того, как следует из опытов по прорастанию семян в водных растворах солей ТМ устойчивость к ТМ семян вейника в фазе прорастания была довольно высокой по отношению ко всем испытанным ТМ в диапазоне до 1 мМ в водном растворе их солей, что соответствовало способности взрослых растений накапливать ТМ в тканях (табл. 3). Проявление более высокой устойчивости прорастания семян к Zn и Ni может свидетельствовать также о необходимости этих металлов как микроэлементов.

В связи с этим важно знать особенности накопления и распределения ТМ по тканям растений вейника на начальных этапах их поступления в побеги и первичные корни при прорастании семян. Как следует из гистохимических исследований с использованием специфичного для Ni реагента (рис. 6) было показано, что Ni за время экспозиции прорастающих семян (7 дней) накапливался преимущественно в протопластах клеток во всех тканях корня (рис. 6). Ni свободно поступал в ткани центрального цилиндра. За 7 дней экспозиции проростков в присутствии 1 мМ  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$  металл был обнаружен в побегах, главным образом, в клетках проводящих пучков, что свидетельствовало о поступлении его в надземные органы. Такой характер распределения Ni указывал на то, что вейник наземный может принадлежать к растениям-аккумуляторам этого ТМ в надземных органах. Вместе с тем, отмечено накопление Ni в протопластах клеток первичного корня прорастающих семян (рис. 6) и значительное накопление этого металла не только в листьях, но и в корнях молодых растений (рис. 3). Последнее можно рассматривать как следствие стрессорной реакции на достаточно высокую концентрацию в питательной среде нитрата никеля. Возможно, преимущественная аккумуляция никеля в надземных органах происходит в процессе его оттока из корней у взрослых растений. Для вейника как многолетнего корневищного злака в процессе развития характерно образование подземных корневищ, в которых, как показано в таблице 4, накапливается значительное количество ТМ, в том числе и Ni. Учитывая такую особенность вейника, можно предположить, что в подземных корневищах Ni находится в прочно связанном

состоянии в менее метаболически активных компартментах, что препятствует его выходу в окружающий грунт, как это следует из таблицы 1. По этой причине вейник наземный оказывается высоко устойчивым к ТМ многолетним злаком, полезным для культивирования на загрязненных ТМ полигонах ТБО при их консервации.

Известно, что к растениям-гипераккумуляторам ТМ принято относить те, которые могут произрастать при высоких концентрациях ТМ в почве, сохраняя способность к нормальному развитию и аккумулируя при этом в надземных органах ТМ в концентрациях в среднем выше 0.1% от сухой массы. У применяемых фермерами сортов такого сверх аккумулятора Ni как *Allyssum murale* содержание этого металла в побегах и листьях достигает 2% от сухой массы на второй год его произрастания. Для быстрой и эффективной очистки сельскохозяйственных полей от Ni и других ТМ вейник наземный подобно *Allyssum murale* также требует проведения скрининга подходящих для практики сортов или получения трансгенных растений с повышенной аккумуляцией ТМ.

Настоящее исследование продемонстрировало, что вейник наземный - перспективный вид для рекультивации грунтов, перекрывающих ТБО на полигонах, загрязненных различными ТМ и засолением. Уровень накопления ТМ в листьях вейника наземного (Ni до 700 мг/кг сухой массы) не позволяет его отнести к растениям-гипераккумуляторам ТМ, однако, он способен длительно произрастать на грунтах со смешанным загрязнением ТМ, создавать густой растительный покров, перехватывать ТМ из нижележащих слоев ТБО и концентрировать их в травяном опаде и корнях в прочно связанной форме. Эти свойства дают нам возможность рекомендовать его использование для рекультивации полигонов захоронения ТБО на длительный срок для естественной фиторемедиации.

Вместе с тем, для применения в качестве фиторемедианта для очистки сельскохозяйственных угодий требуется создание на его основе сортов с более высокой эффективностью выноса ТМ и повышенной скоростью образования надземной массы.

## ВЫВОДЫ

1) Вейник наземный в естественных условиях произрастания способен формировать популяцию растений с высокой продуктивностью на грунтах, загрязненных ТМ.

2) В условиях водной и почвенной культуры вейник наземный способен поглощать и накапливать в надземной и подземной частях растения значительные концентрации ТМ.

3) Действие ТМ в концентрациях, относящихся к средней степени загрязнения оказывало незначительный негативный эффект на растения вейника наземного, вызывая снижение биомассы (не более 5%). Как следует из опытов, устойчивость семян к ТМ в фазе прорастания была довольно высокой по отношению ко всем испытанным ТМ в диапазоне до 1 мМ их солей в растворах.

4) Судя по возрастанию содержания в побегах осмопротектора пролина в ответ на присутствие в среде ТМ и солей NaCl и CaCl<sub>2</sub>, растения вейника наземного обладают способностью адаптироваться к стрессовому воздействию этих загрязнителей.

5) Ni накапливался преимущественно в протопластах клеток во всех тканях корня, свободно поступал в ткани центрального цилиндра. В побегах был обнаружен, главным образом, в клетках проводящих пучков, что свидетельствовало о поступлении его в надземные органы. Возможно, преимущественная аккумуляция никеля в надземных органах происходит в процессе его оттока из корней у взрослых растений. В отличие от Ni, Pb и Cd накапливались, главным образом, в клеточных оболочках ризодермы и коры и лишь незначительное количество кристаллов наблюдалось в тканях центрального цилиндра корня, что свидетельствует о барьерной роли эндодермы, пояски Каспари которой ограничивают транспорт ионов, передвигающихся по апопласту.

6) Экспериментально установленная устойчивость вейника к скашиванию, способность выносить ТМ с биомассой, а также способность адаптироваться к комплексному загрязнению позволяет рекомендовать его как потенциального компонента травосмесей для фиторемедиации перекрывающих грунтов на полигонах захоронения ТБО и придорожных газонов.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) Кузнецов Вл.В., Шевякова Н.И., Маджугина Ю.Г., Орехов А.Ю., Стефоров К.Н., Карпачевский Л.О. Особенности рекультивации городских свалок // Материалы общегородской конференции, ОАО «Прима-М» Проблемы озеленения городов, Альманах, выпуск 10, Москва, 2004, С. 214-216.
- 2) Маджугина Ю.Г. Вейник наземный – перспективный вид для фитомелиорации и фиторемедиации загрязненных территорий // Тезисы докладов, Международная конференция «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия». Вологда, 2005. С. 106.
- 3) Маджугина Ю.Г., Орехов А.Ю., Шевякова Н.И. Использование вейника наземного для фитомелиорации территорий полигонного захоронения ТБО // Материалы IV Международного симпозиума. Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования, том 3. Москва, Издательство Российского университета дружбы народов. 2005. С. 156-158.
- 4) Маджугина Ю.Г., Кузнецов Вл.В., Шевякова Н.И. Растения полигонов захоронения бытовых отходов мегаполисов как перспективные виды для фиторемедиации // Физиология растений. 2008. Т. 55. № 3. С. 453-463.
- 5) Пронкина О.В., Маджугина Ю.Г., Назаренко Л.В., Шевякова Н.И. Влияние различных форм азота на вейник наземный // Тезисы докладов Конференции "Физиология растений - фундаментальная основа современной фитобиотехнологии " Ростов-на-Дону. 2006. С.141.
- 6) N.I. Shevyakova, YU.G. Madghugina, E.N. Iljina, Vl. V. Kuznetsov. *Calamagrostis epigeios* L. Roth and *Brassica napus* L. are promising plant species for the phytoremediation of Ni-contaminated soils in Russia // Joint Annual Meeting – GSA, SSSA, ASA, CSSA, GCAGB. Abstracts. 5-9 October. Houston. 2008.