

|          |   |      |
|----------|---|------|
| Т 59 (5) | ИЗВЕСТИЯ ВЫСШИХ УЧЕБНЫХ ЗАВЕДЕНИЙ.<br>Серия «ХИМИЯ И ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ» | 2016 |
| Т 59 (5) | IZVESTIYA VYSSHIKH UCHEBNYKH ZAVEDENIY<br>KHIMIYA KHIMICHESKAYA TEKHOLOGIYA | 2016 |

**Для цитирования:**

Ольшанская Л.Н., Баканова Е.М., Яковлева Е.В. Гистохимические исследования локализации тяжелых металлов в тканях высших растений в процессе фитозэкстракции. *Изв. вузов. Химия и хим. технология.* 2016. Т. 59. Вып. 5. С. 3-15.

**For citation:**

Olshanskaya L.N., Bakanova E.M., Yakovleva E.V. Histochemical study of heavy metals localization in embryophytes tissues in course of phytoextraction. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.* 2016. V. 59. N 5. P. 3-15.

УДК 504.53.06.001.8

**Л.Н. Ольшанская, Е.М. Баканова, Е.В. Яковлева**

Любовь Николаевна Ольшанская (✉), Екатерина Михайловна Баканова

Кафедра экологии и дизайна, Саратовский государственный технический университет им. Ю.А. Гагарина (ЭТИ (филиал) СГТУ им. Ю.А. Гагарина), пл. Свободы, 17, Энгельс, Российская Федерация, 413100.

E-mail: ecos123@mail.ru (✉), catinca77@mail.ru

Елена Владимировна Яковлева

Кафедра ботаники, химии и экологии, Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Театральная пл., 1, Саратов, Российская Федерация, 410012

E-mail: aw\_71@mail.ru

**ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛОКАЛИЗАЦИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ  
В ТКАНЯХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ В ПРОЦЕССЕ ФИТОЭКСТРАКЦИИ\***

*Рассмотрены гистохимические методы анализа, возможности их использования для определения локализации металлов в тканях и органах растений. Исследовано распределение и особенности накопления меди и кадмия тканями фасоли и сои в процессе фито экстракции без воздействия и при действии внешних физических полей (ВФП: постоянное магнитное поле, УФ-облучение). Установлено, что локализация металлов происходит преимущественно в корнях растений, ткани которых выполняют барьерную функцию (эндодерма), защищая стебли и листья, а также генеративные органы от поллютантов. ВФП оказали благоприятное воздействие на растения в процессе фитозэкстракции Си и Cd из почвы.*

**Ключевые слова:** фитозэкстракция, локализация, тяжелые металлы, медь, кадмий, растительная клетка, внешние физические поля, магнитное поле, ультрафиолетовое излучение

---

\* Обзорная статья

Lyubov N. Olshanskaya (✉), Ekaterina M. Bakanova

Department of Ecology and Design of Gagarin Yu. A. Saratov State Technical University (Engels Technological Institute (branch)). Freedom Square, 17, Engels, Saratov region, 413100, Russia

E-mail: ecos123@mail.ru (✉), catinca77@mail.ru

Elena V. Yakovleva

Department of Botany, Chemistry and Ecology, Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, Theatre Square str., 1, Saratov, 410012, Russia

E-mail: aw\_71@mail.ru

## HISTOCHEMICAL STUDY OF HEAVY METALS LOCALIZATION IN EMBRYOPHYTES TISSUES IN COURSE OF PHYTOEXTRACTION

*The paper studies histochemical analysis methods and possibilities of using them to define metals localization in tissues and organs of plants. Heavy metals localizations in the plant body are of importance when studying their toxic effect and plant mechanisms of resistance. Different organs, tissues and even different cells of separate plant tissue accrete metals variously. Distribution of metals in the whole body may become strongly inhomogeneous. The paper analyses distribution and peculiarities of copper and cadmium accretion by pod and soya bean tissues in the course of phytoextraction without any influence and under the influence of external physical fields (constant magnetic field, ultraviolet irradiation). The research specified that metals localization predominantly takes place in the plant roots which tissues function as a barrier (endodermis) and protect stems, leaves, and generative organs from pollutants. External physical fields had a favorable effect on the plants in the course of Cu and Cd phytoextraction out of the soil. The plants were of greater vitality, contained more moisture under the identical conditions, and thus had a bigger amount of cell electrolyte essential for biochemical behavior in the plant cells and tissues.*

**Key words:** phytoextraction, localization, heavy metals, copper, cadmium, plant cell, external physical fields, magnetic field, ultraviolet irradiation

### 1. ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Гистохимические исследования направлены на изучение химического состава тканей и клеток при сохранении их структуры, а также установление локализации химических веществ в определенных компонентах тканей, типах клеток и клеточных структурах [1-5]. В силу того, что гистохимия имеет своей основной целью установление связи между выявляемыми веществами и их структурной локализацией, ее можно в значительной мере рассматривать как топохимию, или гистотопхимию [1]. Схожий по смыслу термин цитохимия применяется в литературе в двух значениях – либо как ультрагистохимия клетки, либо как сумма микроскопических методов, позволяющих

проводить химический и ферментативный анализ клеток или групп клеток при сохранении их морфологии. Сохранение целостности биологических структур при анализе – главное отличие гистохимического подхода от биохимического.

Оформление гистохимии как научного направления произошло в середине XIX века благодаря трудам французского фармацевта, ботаника и микроскописта Франсуа Винсента Распайля (F.V. Raspail) (1794-1878 гг.), который считается её основателем [1, 2]. Еще в 20-30-х гг. XIX-го века он опубликовал свои первые работы по ботанической гистохимии. Для изучения процесса оплодотворения у злаковых Ф.В. Распайль использовал йодную реакцию на крахмал. В 1829 г. им впервые была применена ксантопротеиновая реакция на белки, также ему приписывается от-

крытие микросжигания для изучения неорганических соединений в тканях. Он же был первым ученым, который занимался определением рН протоплазмы с использованием индикаторных красителей (лакмус) [2].

Во второй половине XIX века гистохимия являлась разделом биохимии животных, в конце века это направление стало рассматриваться как раздел физиологии животных, и только в 30-х годах прошлого столетия гистохимия вновь стала считаться составной частью наук о тканях и клетках. Становление современной гистохимии и оформление ее как самостоятельного научного направления связано с появлением в 50-х годах XX столетия ряда крупных специализированных научных журналов: *Experimental Cell Research* (1950 г.); *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* (1953 г.), *Acta Histochemica* (1954 г.); *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* (1955 г.); *Rivista di Histochemica* (1955 г.); *Annales de Histochemie* (1956 г.); *Histochemie* (1958 г.). До выхода этих изданий специальные работы по гистохимии публиковались в основном в журнале *Stain Technology* (1925 г., с 1991 г. журнал называется *Biotechnic and Histochemistry*) и в многочисленных журналах по микроскопии и микроскопической анатомии [1-3].

В конце 50-х годов были опубликованы две классические книги крупнейшего бельгийского цитолога Жана Браше «Биохимическая цитология» (1957 г.) и «Биохимическая эмбриология» (1960 г.), в которых автором проведены подробные исследования цитофизиологии клеток (цитоплазмы и ядра покоящейся клетки, а также их взаимодействие у одноклеточных организмов, при эмбриональной дифференцировке и при малигнизации клеток). На примере изучения, в основном, нуклеиновых кислот в клетках при помощи цитохимических методов, автор показал широкие возможности цитохимии для клеточной биологии и обозначил цитохимию как биохимическую цитологию [1, 2].

В настоящее время гистохимический анализ широко применяется во всех направлениях биологии. Гистохимия развивается на стыке различных наук и, прежде всего, на стыке гисто- и цитологии, биохимии, аналитической химии и клеточной биофизики. Развитие и совершенствование гистохимии связано с развитием химии красителей, разработкой оптических и оптико-электронных приборов, методов компьютерной обработки изображений, развитием теоретической и прикладной оптики (микрофотометрия) и ряда биологических наук – иммунологии, клеточной инженерии, молекулярной биологии. Последние

достижения гистохимии связаны с применением некоторых методов молекулярной биологии нуклеиновых кислот, что привело к разработке специальной гистохимической технологии, которая вошла в научную литературу под названием гибридизация мРНК *in situ* и расцвету иммуноцитохимии и иммуногистохимии [1, 4].

Гистохимические методы являются эффективными инструментами для анализа локализации и распространения в клетках и тканях различных веществ: белков, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов, фенолов, суберина, алкалоидов, таннинов, гормонов, перекиси водорода, а также широкого спектра ионов [1-24] (рис. 1).

На рис. 1а показан Апецс корня *Alyssum*, выращенного в присутствии 30 мкМ  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ , окрашенного диметилглиоксимом, где Кч – корневая чехлик [5]. Распределение Zn в корне *Thlaspi caerulescens* (экотип Lellingen) после 7 недель инкубации на растворах  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  200 мкМ приведено на рис. 1б, где Р – ризодерма, К – кора, Э – эндодерма [6]. Гистохимический способ обнаружения перекисного окисления липидов и других событий, вызванных алюминием в корнях гороха, показан на рис. 1в. Саженьцы (слева) обрабатывали 10 мкМ алюминия в 100 мкМ  $\text{CaCl}_2$  (рН 4,75) в течение 24 ч, справа – без воздействия алюминия. Корни окрашивали гематоксилином (А, накопление алюминия), реагентом Шиффа (В, перекисное окисление липидов), анилином голубым (С, производство каллозы), или красителем Эванса синим (D, потеря целостности мембраны плазмы). С – изображение, полученное в флуоресцентной микроскопии, А, В и D – в обычной оптической. Бар на каждом графике равен 1 мм [4].

В основе гистохимических исследований лежат реакции между исследуемым веществом и специально подобранным реагентом. Результатом такого взаимодействия является образование окрашенного либо флуоресцирующего комплекса. По распределению окраски (флуоресценции) в препарате можно судить о локализации, а по интенсивности – о количественном присутствии в тканях и клетках интересующего вещества [1-4]. Исследования проводят либо с использованием обычной микроскопии, либо применяя флуоресцентную микроскопию. До проведения самой реакции главной задачей исследования является правильная подготовка ткани. Здесь очень важно сохранить исследуемые вещества в тканях и клетках, чтобы можно было судить об их прижизненном состоянии. При этом необходимо перевести исследуемую ткань из лабильного состояния живого вещества в стабильное.

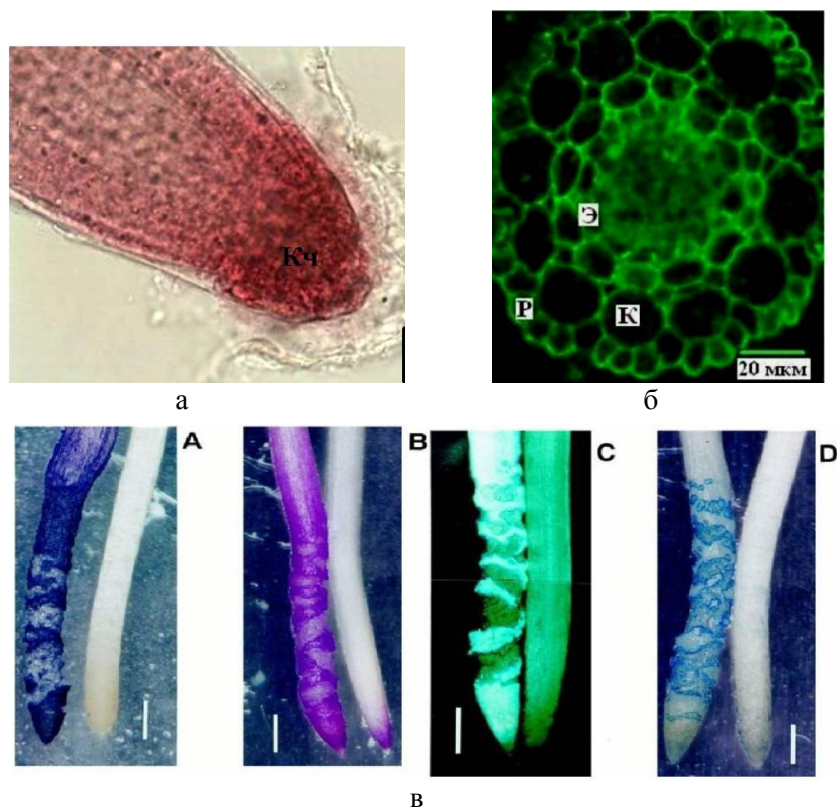


Рис. 1. Примеры гистохимических исследований растений  
 Fig. 1. Examples of plant histochemical studies

Для этой цели используют два метода:

- 1) консервирование нативного материала глубоким замораживанием;
- 2) химическая фиксация.

Для сохранения прижизненной структуры в тканях пригодны оба этих подхода. Тонкие срезы получают с помощью микротома. При этом используют обычные гистологические техники [2].

Однако для изучения присутствия металлов в растениях используют временные препараты: срезы делают бритвой от руки, сами срезы не подвергаются консервации и фиксации [9-13]. Анализ проводят сразу после приготовления среза, осуществляя гистохимическую реакцию на предметном стекле.

В основу принципа классификации красителей, используемых в гистохимии, положена их химическая структура, в частности, наличие определенных групп – хромофоров. Согласно этой классификации все красители можно подразделить на следующие основные классы [2].

1. *Нитроокрасители* содержат поляризующий электроноакцепторный заместитель – нитрогруппу ( $-\text{NO}_2$ ).

2. *Нитроокрасители*: к цепочке сопряженных двойных связей присоединена нитрогруппа ( $-\text{NO}$ ), играющая роль электроноакцепторного заместителя.

3. *Азокрасители* содержат одну или несколько азогрупп ( $-\text{N}=\text{N}-$ ) в цепочке двойных сопряженных связей. Бывают моно-, ди- и полиазокрасители в зависимости от числа азогрупп.

4. *Арилметановые красители*: в хромоформной системе арилметановых красителей имеется центральный атом углерода и цепочки двойных сопряженных связей в виде нескольких ароматических колец, на которых находятся электронодонорные (ДЭ) и электроноакцепторные (АЭ) заместители: ДЭ-Аг-СR=Аг'=АЭ.

5. *Ариламиноновые красители* имеют общую формулу: ДЭ-Аг-N=Аг'=АЭ.

6. *Сернистые красители* – разнообразные органические соединения, в состав молекул которых входит сера, включенная в гетероциклы.

7. *Индигоидные красители*: включают индиго, тиюиндиго и их производные.

8. *Антрахиноновые красители*: красители, производные антрахинона (рис. 2)

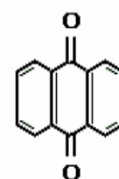


Рис. 2. Структурная формула молекулы антрахинона [2]  
 Fig. 2. Structural formula of anthraquinone molecule [2]

9. *Кубовые полициклические красители*: в состав их молекул входит несколько ароматических циклов и не менее двух карбонильных групп, углеродные атомы которых принадлежат ароматическим структурам.

10. *Фталоцианиновые красители*: содержат четыре остатка пиррола, которые связаны атомами азота.

11. Молекулы *полиметиновых красителей* имеют цепочку двойных сопряженных связей, включающих свободные или замещенные метиновые группы  $-CR=$ , связывающие ДЭ- и АЭ-заместители: ДЭ-( $CR=CR'$ ) $_n$ -СН-АЭ.

12. *АзOMETиновые красители* содержат цепочку двойных сопряженных связей, включающих азOMETиновые группы  $\rightarrow C=N-$ .

Внутриклеточные и межклеточные вещества кислой природы, легко окрашивающиеся основными анилиновыми красителями, называются базофильными. К таким соединениям относятся нуклеиновые кислоты, сульфатированные полисахариды, олигосахариды, в состав которых входят сиаловые и уроновые кислоты.

Тканевые и клеточные структуры, содержащие вещества, которые хорошо прокрашиваются кислыми красителями, называются ацидофильными, или иногда используют термин – ацидофилия тканевых и клеточных структур.

Кислые красители представляют слабые органические соединения, хромоформной частью таких красителей являются катионы, в то время как хромоформные части основных красителей представляют анионы.

При взаимодействии ряда красителей с тканевыми веществами происходит изменение максимума в спектре поглощения красителя. Это свойство красителей называется метахромазией. Молекулярный механизм метахромазии, по-видимому, связан с конформационными изменениями молекул красителя при их взаимодействии с внутриклеточными структурами. В гистохимической практике используются некоторые красители тиозинового ряда, которые меняют свой цвет от синего до красного.

Особенно выраженную метахромазию вызывают сульфатные группы, в меньшей степени – фосфатные группы и наиболее слабую – карбонильные группы. Метахромазирующие красители часто используются для гистохимического выявления основного вещества хряща, муцина, гранул тучных клеток и др. [2].

### **1.1. Особенности гистохимических исследований при анализе распределения металлов в растениях**

Одной из важнейших проблем экологической физиологии растений является изучение от-

ветной реакции растений на ионы тяжелых металлов, которые при повышенных концентрациях оказывают токсическое действие на самые разнообразные физиологические процессы. Данная проблема имеет не только очевидное практическое значение, которое определяется возрастающим загрязнением окружающей среды тяжелыми металлами, но также имеет и важное фундаментальное значение, которое связано с исследованием механизмов адаптации и устойчивости растений к тяжелым металлам.

В силу ряда биологических особенностей растения вынуждены поглощать большинство тяжелых металлов. Поэтому вопрос о локализации металлов в растительном организме имеет большое значение при изучении их токсического действия и механизмов устойчивости. Разные органы, ткани и даже различные клетки внутри одной ткани растения по-разному накапливают металлы; их распределение в целом организме может быть крайне неравномерным. К настоящему моменту разработаны простые в использовании гистохимические методы, которые позволяют качественно, либо полуколичественно оценивать распределение, накопление и пути передвижения металлов в растениях [12]. В сочетании с методами определения суммарного содержания металлов в органах растений гистохимические методы позволяют выстроить полную картину взаимодействия металла и растения.

Способность растений накапливать тяжелые металлы реализуется на разных уровнях организации: клеточном, тканевом и органном, что связано, прежде всего, со способностью растений накапливать металлы в клеточных оболочках и вакуолях клеток разных тканей и органов, а также с существованием барьерных тканей, ограничивающих передвижение ряда тяжелых металлов [12].

В ранних работах для определения свинца использовали сульфидный метод. Позднее для гистохимического определения металлов стали применять органические нефлуоресцентные и флуоресцентные индикаторы, в 1972 г. впервые был разработан гистохимический метод определения Pb с использованием родизоната натрия. Гистохимический метод определения Ni появился несколько позже. В настоящее время он модифицирован, что позволило повысить его чувствительность. Кроме того, разработаны гистохимические методы определения других тяжелых металлов, а также стронция [12]. Методы активно используются для изучения деталей взаимодействия растений с металлами [4-6, 13].

Для выявления Zn существует ряд методик с использованием флуоресцентных индикаторов

Zinquin, RhodZin-3, FluoZin-1, FluoZin-2, Fluo-Zin-3, IndoZin-1, FuraZin-1, TSQ, NewportGreenPDX и NewportGreenDCF, различающихся по своей специфичности и чувствительности к ионам Zn, а также по способности проникать через плазматическую мембрану. Для определения Cu и Fe, а также Hg, Ni, Cd и Pb используют малоспецифичные флуоресцентные красители PhenGreenSK и PhenGreenFL [12]. Вышеперечисленные флуоресцентные индикаторы применяются, главным образом, в физиологии животных, а в физиологии растений используются при изучении транспорта металлов через клеточные мембраны.

Основные руководящие принципы для разработки гистохимических методов, имеющих цель выявления металлов в тканях растений, подробно изложены в [12]:

1. Аналитический реагент должен образовывать окрашенный или флуоресцирующий комплекс с изучаемым металлом, который будет отчетливо виден под микроскопом, так как именно по его распределению можно судить о распределении металла по тканям.

2. Используемый реагент должен обладать высокой чувствительностью и селективностью по отношению к изучаемому металлу.

3. Реагент должен проникать в неповрежденные клетки.

4. Возможность перераспределения металла во время проведения анализа должна быть незначительной, что особенно важно для ионов, поступающих внутрь клетки.

5. При разработке метода данные гистохимического анализа должны быть подтверждены результатами, полученными с помощью альтернативных методов.

Описанные гистохимические методы выявления металлов в тканях растений являются полуквантитативными, в ряде случаев – качественными. По интенсивности окрашивания можно судить о накоплении металла в клетках и тканях. Можно также провести сравнительный анализ накопления металла в клеточных оболочках и в протопластах клеток разных тканей. Для идентификации металлов, связанных с материалом клеточных оболочек, а также находящихся в периплазматическом пространстве и на поверхности протопласта, можно использовать плазмолиз перед проведением гистохимического анализа (рис. 3) [6].

Анализируя распределение металлов в растущих частях растений, необходимо учитывать, что уменьшение интенсивности окрашивания растягивающихся клеток по сравнению с меристематическими свидетельствует лишь об умень-

шении содержания металла в растягивающихся клетках в единице объема клетки. Содержание металла в пересчете на клетку может и не уменьшаться или даже увеличиваться в результате его поглощения, например, в зоне растяжения корня.



Рис. 3. Распределение Sr в клетках корня проростков кукурузы после 7 сут инкубации на растворе 3 мМ Sr(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

БК – внутренняя кора. Клетки подверглись плазмолизу: виден отошедший от клеточной стенки протопласта, периплазматическое пространство заполнено комплексами родиозоната натрия со стронцием [6]

Fig. 3. Sr distribution in the root cells of corn plantlet after 7 days of incubation with 3 μm of Sr(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> preparation. IB – inner bark. Cells were undergone with plasmolysis: protoplast come off the cell wall can be seen, periplasmatic space is filled with Na and Sr rhodizonate complexes [6]

Гистохимические методы являются незаменимыми для анализа передвижения и распределения металлов в живых тканях растений. Однако, как и любой другой метод, они обладают рядом недостатков:

1. Можно предположить, что этими методами выявляются не все ионы изучаемого металла. Кроме того, большая часть металла находится в клетке в связанном состоянии в виде комплексов с белками, пептидами, углеводами, органическими и аминокислотами. Чтобы повысить чувствительность методов, были отобраны реагенты, обладающие наибольшим сродством к изучаемым металлам и подобрана среда, в которой реагент наиболее чувствителен к изучаемым ионам.

2. Большинство аналитических реагентов недостаточно селективны.

Для определения кадмия, к сожалению, пока не существует столь селективного аналитического реагента, и поэтому при проведении анализа обязательно нужно учитывать наличие в среде мешающих ионов в высоких концентрациях [12].

3. При проведении гистохимического анализа важно учитывать чувствительность метода. Чувствительность гистохимических методов нельзя определить непосредственно на срезах, так как содержание металла в тканях растений очень часто превышает их содержание в питательной среде за счет эффекта концентрирования.

Необходимо принимать во внимание, что отсутствие окрашивания тех или иных тканей или органов при инкубации растений на растворах солей тяжелых металлов свидетельствует лишь о том, что содержание металлов в тканях ниже предела определения гистохимического метода. Однако при изучении распределения металлов по тканям растений следует учитывать, что растения способны накапливать металлы в концентрациях, в десятки и даже сотни раз превышающих их содержание в растворе или почве. Следовательно, даже при концентрации металлов в среде на границе или даже ниже предела определения гистохимических методов, содержание металлов в растениях, скорее всего, будет достаточным для изучения их распределения с помощью этих методов.

Гистохимические методы были использованы для определения распределения, накопления и передвижения тяжелых металлов у целого ряда видов растений, относящихся как к исключателям, накапливающим тяжелые металлы преимущественно в подземных органах, так и у гипераккумуляторов, накапливающих тяжелые металлы в больших количествах преимущественно в надземных органах без видимого нарушения метаболизма. Полученные с применением этих методов данные внесли значительный вклад в выяснение роли разных тканей корня и побега растений в передвижении и накоплении тяжелых металлов, что важно для решения проблемы избирательного накопления тяжелых металлов в подземных орга-

нах исключателей и надземных органах гипераккумуляторов. Проведенное картирование передвижения и накопления тяжелых металлов у исключателей и гипераккумуляторов позволило заключить, что роль тканей растений в поступлении, передвижении и накоплении тяжелых металлов неодинакова не только для разных металлов, но и для растений исключателей и гипераккумуляторов, что в свою очередь определяет металло- и тканеспецифичность токсического действия металлов.

Недостатками данных приемов являются субъективная оценка, основанная на индивидуальном цветовосприятии, и невозможность оценить количественные различия в распределении металла даже в пределах одного препарата. В работах [9, 10] была сделана попытка преодолеть данные ограничения и разработать метод определения количества никеля в органах растений на основании анализа микрофотографий в пакете программ *Mat Lab* (рис. 4).

Авторы, анализируя фотографии, определили сочетание каналов, в которых цвет комплекса никель-диметилглиоксим максимально отличался от цвета хлорофилла. Используя специально приготовленные агаровые стандарты с известной концентрацией металла в них, была получена зависимость интенсивности окраски комплекса от концентрации металла в срезе. После чего была построена цветовая шкала, показывающая распределение металла в единицах мг/кг массы растения.

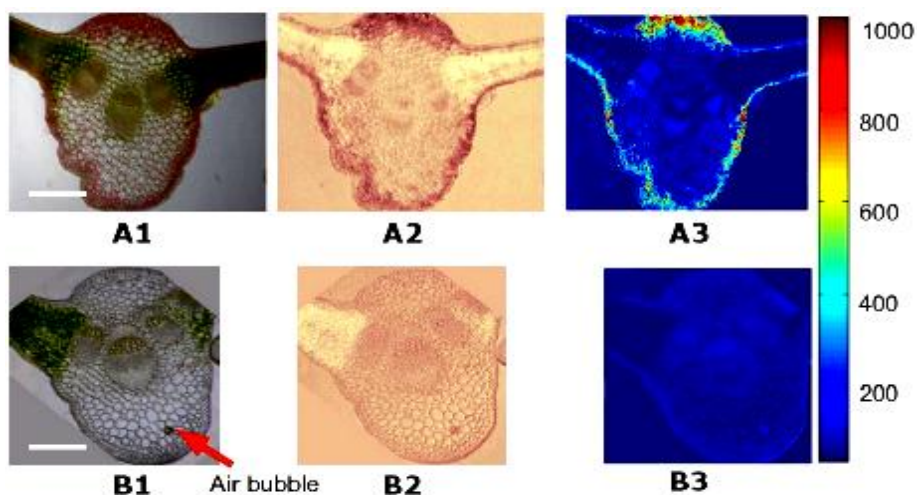


Рис. 4. Этапы обработки изображения: «сырые» RGB-изображений (A1, B1), интенсивности (A2, B2), калиброванных карт концентрации (A3, B3) (цветовая шкала показывает содержание Ni в мг/кг свежего веса [9])  
 Fig. 4. Stages of image processing: «raw» ones of RGB-mages (A1, B1), stage of intensity (A2, B2), stage of concentration calibrated cards (a3, B3) (colour chart depicts Ni concentration in fresh weight ppm [9])

Аналогичные работы проведены и на других объектах [8, 25]. Так в работе [8] авторы использовали трансгенные растения *Arabidopsis thaliana* L. и предложили методику количественной

оценки концентрации индолилуксусной кислоты (ИУК) с помощью анализа цифровых микрофотографий. Выявлена эмпирическая квадратическая зависимость между концентрацией ИУК в среде и

интенсивностью GUS-зависимого окрашивания (GUS  $\beta$ -глюкуронидаза). С помощью оригинальной методики установлено, что при развитии латерального перераспределения ауксина в корнях *A. thaliana*, гравистимулированных в течение 90 мин, концентрация ИУК в нижней части корня в зоне растяжения и апикальной меристеме повышается в среднем на 200%.

## 1.2. Гистохимические исследования локализации меди и кадмия в тканях и органах фасоли и сои

Загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами (ТМ) и изучение реакций растений на указанные вещества является важной экологической проблемой. При изучении влияния ТМ на растения большой интерес представляют сведения об их накоплении и содержании в растениях, а также распределении в органах, тканях и клетках. Кроме этого, развитие методов очистки почв от ионов ТМ с помощью растений - фитомелиорантов повышает интерес к выявлению механизмов взаимодействия растений с металлами.

По способности накапливать ТМ растения можно разделить на три группы: 1) аккумуляторы, накапливающие металлы главным образом в надземных органах как при низком, так и высоком содержании их в почве; 2) индикаторы, в которых концентрация металла отражает его содержание в окружающей среде; 3) исключения, у которых поступление металлов в побеги ограничено, несмотря на их высокую концентрацию в окружающей среде, ТМ накапливаются, главным образом, в корневой системе [26].

ТМ по накоплению в органах растений группируются следующим образом: 1) Cd, Fe, Cu, Co, Mo и 2) Pb, Sn, Ti, Ag, Cr, Zr, V – уровень аккумуляции в корнях высокий, а в побегах – средний и низкий соответственно; 3) Zn, Mn, Ni – уровень накопления в корнях и в побегах средний. В отличие от накопления характер распределения ТМ по органам и тканям в большинстве случаев не зависит от эдафических и сезонных факторов и определяется главным образом свойствами металлов и видовыми особенностями растений. Виды растений, а также сорта могут заметно различаться по распределению ТМ по органам, что связано с особенностями поглощения ионов металлов корнями и их перемещения из корней в побеги. В целом по содержанию ТМ в органах растений образуется следующий ряд (по убыванию): корень > стебель > листья > плоды или семена. Большинство видов растений накапливает ТМ (кадмий, свинец, цинк) преимущественно в корнях. Так, доля кадмия в корнях однолетних злаков составляет 54-91% от его общего содержания в растении [27].

Неоценимую помощь в изучении распределения и накопления металлов по тканям растений могут оказать простые в использовании гистохимические методы. Полученные с их помощью данные дополняют результаты количественного анализа, что позволяет полнее понять основные закономерности распределения, накопления, а также пути передвижения металлов по растению [11, 12, 18, 22]. В их основе лежит образование окрашенных комплексов исследуемого металла и подобранного к нему реагента в клетках и тканях растения. В сочетании с методами определения суммарного содержания металлов в органах растений гистохимические методы позволяют выстроить полную картину взаимодействия металла и растения. Кроме этого, они могут служить хорошими экспресс-методами в полевых экологических исследованиях загрязнений окружающей среды.

В последние десятилетия обнаружены многочисленные факты, свидетельствующие о высокой чувствительности растений к воздействию внешних физических полей (ВФП: постоянные магнитные (ПМП), электрические поля, ультрафиолетовое (УФ), инфракрасное (ИК) и лазерное излучения (ЛИ) и их сочетание). Поля создают дополнительные электрические токи в биообъектах, и могут изменять течение процессов роста и развития организмов [28-35], оказывая как стимулирующее, так и тормозящее влияние. Это воздействие зависит от характеристик данного фактора: длины волны, частоты колебаний электромагнитных излучений (ЭМИ), силы и времени действия ВФВ [36-47]. Применение ультрафиолетового, лазерного облучения и обработка магнитными полями семян растений является прогрессивным способом их подготовки к посеву, позволяющим не только вывести семена из состояния покоя, но и активизировать работу разнообразных биологических катализаторов – ферментов, обеспечивающих быстрый рост и развитие растений [30, 31].

Нами исследовано распределение меди и кадмия в тканях растений-фитосорбентов. В качестве тестовых культур (фитосорбентов) использовали сою (*Glycine max*) сорт Самер 2 и фасоль зерновую красную (*Phaseolus vulgaris*) сорт Рубин. Выбор был обусловлен тем, что в целях фиторемедиации обычно используют высокопродуктивные культуры. Семена растений предварительно обрабатывали в течение 6 ч УФ облучением (в качестве УФ источника выступала бактерицидная лампа, марки СБПе 3×30 Вт, с постоянным УФ излучением длиной волны  $\lambda = 257$  нм.) и ПМП (в качестве источника ПМП выступал электромагнит, создающий напряженность поля  $H = 2$  кА/м). Облучаемые семена находились на расстоянии 1 м от источника света.



Облученные и предварительно пророщенные семена фасоли и сои высевали на глубину 2-3 см. Пробы почв были отобраны из пахотного горизонта – это средний суглинок ( $pH \geq 5,5$ ) характерный для Саратовской области. Почва была

предварительно очищена от корней, камней и других включений, просеяна через сито с размером ячеек 2 мм. На 1 кг почвы вносили определенное количество ионов металлов (5 и 15 ПДК) из солей  $CuSO_4$  и  $CdSO_4$  с различной концентрацией кати-

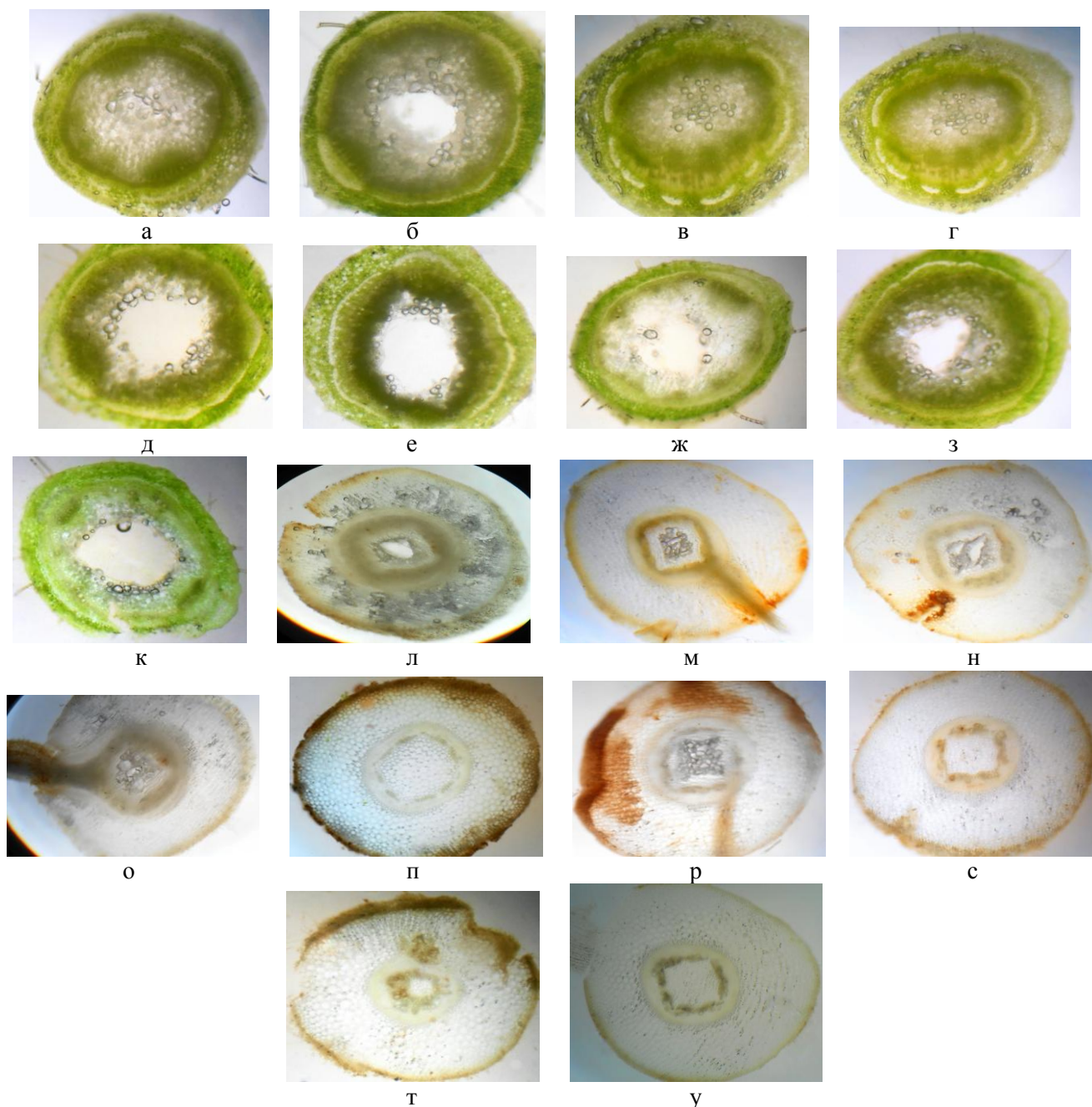


Рис. 5. Микроструктура сои. Поперечный срез стебля сои: а – 5 ПДК  $Cu^{2+}$  + УФ (6 ч); б – 15 ПДК  $Cu^{2+}$  + УФ (6 ч); в – 5 ПДК  $Cu^{2+}$  + ПМП (6 ч); г – 15 ПДК  $Cu^{2+}$  + ПМП (6 ч); д – 5 ПДК  $Cd^{2+}$  + УФ (6 ч); е – 15 ПДК  $Cd^{2+}$  + УФ (6 ч); ж – 5 ПДК  $Cd^{2+}$  + ПМП (6 ч); з – 15 ПДК  $Cd^{2+}$  + ПМП (6 ч); к – контроль; поперечный срез корня сои: л – 5 ПДК  $Cu^{2+}$  + УФ (6 ч); м – 15 ПДК  $Cu^{2+}$  + УФ (6 ч); н – 5 ПДК  $Cu^{2+}$  + ПМП (6 ч); о – 15 ПДК  $Cu^{2+}$  + ПМП (6 ч); п – 5 ПДК  $Cd^{2+}$  + УФ (6 ч); р – 15 ПДК  $Cd^{2+}$  + УФ (6 ч); с – 5 ПДК  $Cd^{2+}$  + ПМП (6 ч); т – 15 ПДК  $Cd^{2+}$  + ПМП (6 ч); у – контроль

Fig. 5. Soya bean microstructure. Transversal section of soya bean stem: а – 5  $Cu^{2+}$  TLV + UV (6 h); б – 15  $Cu^{2+}$  TLV + UV (6 h); в – 5  $Cu^{2+}$  TLV + CMF (6 h); г – 15  $Cu^{2+}$  TLV + CMF (6 h); д – 5  $Cd^{2+}$  TLV + UV (6 h); е – 15  $Cd^{2+}$  TLV + UV (6 h); ж – 5  $Cd^{2+}$  TLV + CMF (6 h); з – 15  $Cd^{2+}$  TLV + CMF (6 h); к – control transversal section of soya bean root: л – 5  $Cu^{2+}$  TLV + UV (6 h); м – 15  $Cu^{2+}$  TLV + UV (6 h); н – 5  $Cu^{2+}$  TLV + CMF (6 h); о – 15  $Cu^{2+}$  TLV + CMF (6 h); п – 5  $Cd^{2+}$  TLV + UV (6 h); р – 15  $Cd^{2+}$  TLV + CMF (6 h); с – 5  $Cd^{2+}$  TLV + CMF (6 h); т – 15  $Cd^{2+}$  TLV + CMF (6 h); у – control

онов меди и кадмия, предварительно растворенных в 250 мл воды. Добавленные растворы поллютантов тщательно перемешивали с почвой. Повторные поливы производили через 1-2 дня, по мере высыхания почвы.

За систему отсчета количества ИТМ в почве была принята величина ПДК [48], а не количество элемента в мг/кг почвы. Это сделано из

соображения, что разные металлы содержатся в почве в различных несопоставимых, если их выражать в мг, количествах, различающихся на два порядка, и, кроме того, они обладают различной степенью токсичности. Такой подход позволил сопоставить силу воздействия различных ИТМ между собой.

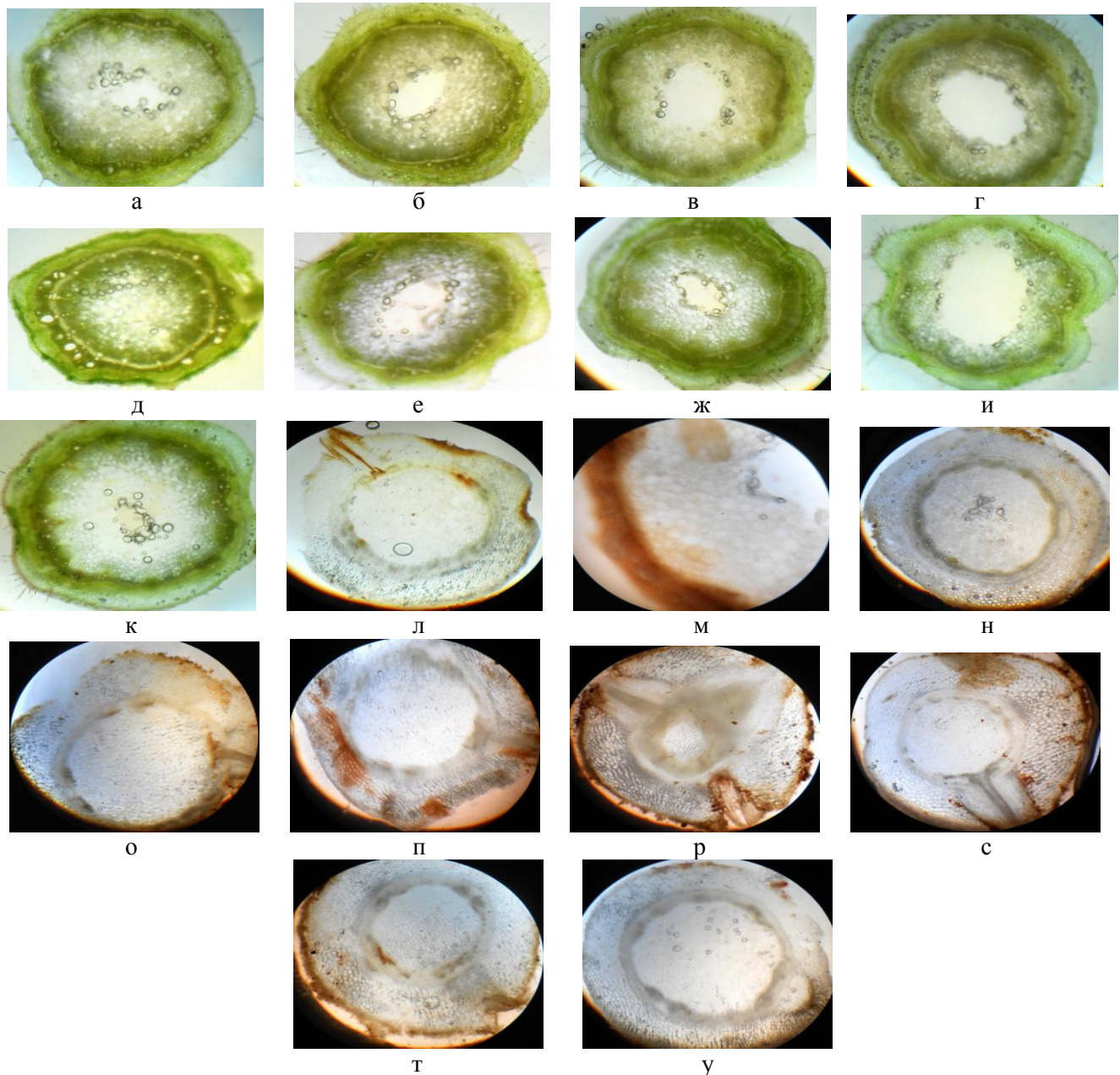


Рис. 6. Микроструктура фасоли. Поперечный срез стебля фасоли: а – 5 ПДК  $\text{Cu}^{2+}$  + УФ (6 ч); б – 15 ПДК  $\text{Cu}^{2+}$  + УФ (6 ч); в – 5 ПДК  $\text{Cu}^{2+}$  + ПМП (6 ч); г – 15 ПДК  $\text{Cu}^{2+}$  + ПМП (6 ч); д – 5 ПДК  $\text{Cd}^{2+}$  + УФ (6 ч); е – 15 ПДК  $\text{Cd}^{2+}$  + УФ (6 ч); ж – 5 ПДК  $\text{Cd}^{2+}$  + ПМП (6 ч); з – 15 ПДК  $\text{Cd}^{2+}$  + ПМП (6 ч); к – контроль; поперечный срез корня фасоли: л – 5 ПДК  $\text{Cu}^{2+}$  + УФ (6 ч); м – 15 ПДК  $\text{Cu}^{2+}$  + УФ (6 ч); н – 5 ПДК  $\text{Cu}^{2+}$  + ПМП (6 ч); о – 15 ПДК  $\text{Cu}^{2+}$  + ПМП (6 ч); п – 5 ПДК  $\text{Cd}^{2+}$  + УФ (6 ч); р – 15 ПДК  $\text{Cd}^{2+}$  + УФ (6 ч); с – 5 ПДК  $\text{Cd}^{2+}$  + ПМП (6 ч); т – 15 ПДК  $\text{Cd}^{2+}$  + ПМП (6 ч); у – контроль

Fig. 6. Pod microstructure. Transversal section of pod stem: а – 5  $\text{Cu}^{2+}$  TLV + UV (6 h); б – 15  $\text{Cu}^{2+}$  TLV + UV (6 h); в – 5  $\text{Cu}^{2+}$  + TLV + CMF (6 h); г – 15  $\text{Cu}^{2+}$  TLV + CMF (6 h); д – 5  $\text{Cd}^{2+}$  TLV + UV (6 h); е – 15  $\text{Cd}^{2+}$  TLV + UV (6 h); ж – 5  $\text{Cd}^{2+}$  TLV + CMF (6 h); и – 15  $\text{Cd}^{2+}$  TLV + CMF (6 h); к – control transversal section of pod bean root: л – 5  $\text{Cu}^{2+}$  TLV + UV (6 h); м – 15  $\text{Cu}^{2+}$  TLV + UV (6 h); н – 5  $\text{Cu}^{2+}$  + TLV + CMF (6 h); о – 15  $\text{Cu}^{2+}$  TLV + CMF (6 h); п – 5  $\text{Cd}^{2+}$  TLV + UV (6 h); р – 15  $\text{Cd}^{2+}$  TLV + CMF (6 h); с – 5  $\text{Cd}^{2+}$  TLV + CMF (6 h); т – 15  $\text{Cd}^{2+}$  TLV + CMF (6 h); у – control

По истечении 28 дней отбирали часть растений и изучали изменения, произошедшие в стеблях и корнях путем гистохимического анализа, а остальную часть растений оставили еще на 28 дней, чтобы сравнить результаты анализа в разные периоды роста растений. Живые клетки сильно ограничивают проницаемость внутрь органических веществ, и помещенные в раствор красителя они практически не окрашиваются. В мертвые клетки краска проникает свободно.

Для исследования изменений, происходящих с растениями в работе, использовали гистохимический метод анализа. Срезы растений для определения меди предварительно обрабатывали раствором диэтилдитио-карбамата натрия ( $C_5H_{10}NS_2Na$ ) – в 1,5% растворе карбоната натрия растворяли навеску диэтилдитиокарбамата до массовой доли 0,1%. Раствор перемешивали, фильтровали. Хранили в течение 2-3 недель, в склянке из темного стекла. Цвет комплекса с медью – буро-желтый. Для гистохимического выявления кадмия в растениях использовали раствор дитизона ( $C_{13}H_{12}N_4S$ ): для приготовления основного 1%-го водно-аммиачного раствора дитизона в колбу с притертой пробкой наливали 45 мл дистиллированной воды, добавляли 0,9 мл 25%-го раствора гидроокиси аммония и 600 мг дитизона. Смесь перемешивали на водяной бане (+70 °С) в течение 10 мин, затем фильтровали через беззольный фильтр. Рабочий 0,2%-ый раствор дитизона для цитохимических исследований готовили пятикратным разбавлением дистиллированной водой основного раствора.

Анализ проводили на микроскопе «МИНИМЕД-502». Срезы накрывали покровным стеклом и анализировали при 100-кратном увеличении. Фотографии препаратов делали с помощью цифрового фотоаппарата. Масштаб определяли объект микрометром отраженного света ОМО. Снимки обрабатывали на компьютере с использованием программы Gimp 2.8.

По окрашенной площади судили о распределении металла в фитомассе, процессах цитоплазмоллиза или некроза растений.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. **Луппа Х.** Основы гистохимии. М.: Мир. 1980. 344 с.
2. Гистохимия. Пушчинский госуниверситет: учебное пособие [электронный ресурс] Режим доступа: <http://himsnab-spb.ru/article/mag/histochemistry/>
3. **Пирс Э.** Гистохимия. М.: Иностр. лит. 1962. 964 с.
4. **Hassan E.A.** // Nature and Science. 2013. N 11(12). P. 54-67.
5. **Бакланов И.А.** Накопление, распределение и действие никеля на растения - гипераккумуляторы и исключатели из рода *Alyssum*. Автореф. дис. ... к.б.н. Москва. 2011. 24 с.

Микроструктура сои представлена на рис. 5. Микроструктура фасоли представлена на рис. 6.

Анализ полученных данных указывает на то, что активное накопление ТМ наблюдается в корнях растения. Было отмечено окрашивание корневых волосков, ризодермы, паренхимы корня. Причём при концентрации металлов 15 ПДК выявлено более интенсивное окрашивание тканей, чем при концентрации металлов 5 ПДК.

В тканях стебля и листа присутствие металлов не выявлено. С течением времени (до 56 сут.) изменений в местоположении металлов не выявлено. Металлы вглубь стебля не прошли.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что локализация меди и кадмия происходит преимущественно в корне растения, ткани которого выполняют барьерную функцию (эндодерма), защищая стебли и листья, а также генеративные органы от поллютантов, что соответствует растениям-исключителям [26] и согласуется с литературными данными [27].

#### ВЫВОДЫ

Анализ научно-технической литературы показал, что гистохимические методы анализа могут с успехом использоваться для определения локализации металлов в тканях и органах растений. В настоящее время, судя по литературным данным, эти эффективные и простые в использовании методы исследования не адаптированы и применяются крайне редко.

Проведенные исследования позволили установить, что локализация ТМ меди и кадмия происходит преимущественно в корнях растений фасоли и сои, ткани которых выполняют барьерную функцию, защищая стебли и листья, а также генеративные органы от воздействия поллютантов. По истечении 28 и 56 сут. присутствия металлов в стеблях и листьях не обнаружено.

*Работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации в рамках проектной части государственного задания № госрегистрации № 114112570078.*

#### REFERENCES

1. **Luppa H.** Bases of histochemistry. M.: Mir. 1980. 344 p. (in Russian).
2. Histochemistry. Pushchino State University: training manual [electronical resource] – Access mode: [spb.ru/article/mag/histochemistry/](http://himsnab-spb.ru/article/mag/histochemistry/) (in Russian).
3. **Pirs E.** Histochemistry. M.: Inostr. Lit. 1962. 964 p. (in Russian).
4. **Hassan E.A.** // Nature and Science. 2013. N 11(12). P. 54-67.
5. **Baklanov I.A.** Accumulation, distribution and effects of nickel on hyperaccumulator and excluder plants belonging to the Genus *Alyssum*. Extended abstract of dissertation for

6. **Серегин И.В.** Распределение тяжелых металлов в растениях и их действие на рост растений. Автореф. дис. ... д.б.н. Москва. 2009. 53 с.
7. **Bhatia N., Walsh K., Orlic I.** // *Functional plant biology*. 2004. N 31. P. 1061-1074.
8. **Пожванов Г.А., Медведев С.С.** // *Физиология растений*. 2008. Т. 55. № 5. С. 786-792.
9. **Gramlich A.** [Электронный ресурс]: режим доступа: <http://e-collection.library.ethz.ch/eserv/eth:30274/eth-30274-01.pdf> (in Russian).
10. **Gramlich A., Moradi A. B., Brett H.** // *Environmental and Experimental Botany*. 2011. V. 71. P. 232-240.
11. **Серегин И.В., Иванов В.Б.** // *Физиология растений*. 1997. Т. 44. С. 915 — 921.
12. **Серегин И.В., Кожевникова А.Д.** // *Физиология растений*. 2011. Т. 58. № 4. С. 617-623.
13. **Прохорова Н.В., Макарова Ю.В.** // *Вестн. СамГУ. Естественнонауч. сер.* 2006. № 7. С. 177-185.
14. **Vollenweider P., Cosio C., Günthardt-Goerg M.S.** // *Environmental and Experimental Botany*. 2006. V. 58. P. 25-40.
15. **Макарова Ю.В.** // *Вестн. СамГУ. Естественнонаучная серия*. 2010. № 6. С. 217-225.
16. **Макарова Ю.В.** Гистохимическая оценка накопления и распределения тяжелых металлов в органах и тканях сельскохозяйственных растений в зависимости от условий произрастания. Автореф. дис. ... к.б.н. Тольятти. 2006. 19 с.
17. **Baklanov I.A., Seregin I.V., Ivanov V.B.** // *Doklady Biological Sciences*. 2009. V. 429. N 1. P. 548-550.
18. **Серегин И.В., Кожевникова Л.Д.** // *Физиология растений*. 2004. Т. 51. С. 241-248.
19. **Кузнецова Е.А.** // *Фундаментальные исследования*. 2013. № 10. Ч. 6. С. 1266 - 1270.
20. **Рогулева Н.О.** // *Вопросы современной науки и практики*. 2007. № 4(10). Т. 1. С. 23-27.
21. **Еремченко О.З., Чудинова Л.А.** [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.science-education.ru/pdf/2012/5/162.pdf>
22. **Wójcik M., Tukiendorf A.** // *Acta Physiol. Plant*. 1999. V. 21. N 2. P. 99-107.
23. **Маджугина Ю.Г.** Исследование способности вейника наземного аккумулялировать тяжелые металлы с целью разработки технологии фиторемедиации. Автореф. дис... к.б.н. Москва. 2008. 25 с.
24. **Щудло М.М., Ступина Т.А., Щудло Н.А.** // *Изв. Челябинского науч. центра*. 2004. Т. 25. С. 17 - 22.
25. **Startseva M.S., Chertok V.M.** // *Pacific Medical Journal*. 2012. № 1. P. 121-123.
26. **Antosiewicz D.M.** // *Acta Soc. Bot. Pol.* 1992. V. 61. P. 281-299.
27. **Wójcik M., Tukiendorf A.** // *Biol. Plant*. 2005. V. 49. N 2. P. 237-245.
28. **Bornman J.F.** // *J. Photochem. Photobiology*. 1991. V. 8. N 3. P. 337- 341.
29. **Али-Заде Г.И.** // *Современ. пробл. науки и образования*. 2009. № 4. С. 18 - 26.
30. **Бердонос С.С., Сапожников Ю.А.** // *Сорос. Образоват. журн.* 2001. Т. 7. № 2. С. 40 - 46.
31. **Алтухов И.В., Федотов В.А., Очиров В.Д.** // *Вестн. ИрГСХА: сб. науч. тр. Иркутск: ИрГСХА*. 2010. Вып. 40. С. 107 - 115.
32. **Алтухов И.В., Федотов В.А.** // *Ползуновский вестник* 2011. № 2/1. С. 156-159.
33. **Савельев В.А.** // *Сибир. вестн. науки*. 1981. № 5. С. 26 - 29.
34. **Савельев В.А.** // *Физические факторы в растениеводстве в аспекте экологических проблем Средней Азии и Казахстана: сборник докладов*. Ташкент. 1990. С. 98 - 99.
- candidate degree on biological sciences. Moscow. 2011. 24 p. (in Russian).
6. **Seregin I.V.** Distribution of heavy metals in plants and their effects on plant growth. Extended abstract of dissertation for doctor degree on biological sciences. Moscow. 2009. 53 p. (in Russian).
7. **Bhatia N., Walsh K., Orlic I.** // *Functional plant biology*. 2004. N 31. P. 1061-1074.
8. **Pozhvanov G.A., Medvedev S.S.** // *Fiziologiya rasteniy*. 2008. V. 55. N 5. P. 786-792 (in Russian).
9. **Gramlich A.** <http://e-collection.library.ethz.ch/eserv/eth:30274/eth-30274-01.pdf> (in Russian).
10. **Gramlich A., Moradi A. B., Brett H.** // *Environmental and Experimental Botany*. 2011. V. 71. P. 232-240.
11. **Seregin I.V., Ivanov V.B.** // *Fiziologiya rasteniy*. 1997. V. 44. P. 915-921 (in Russian).
12. **Seregin I.V., Kozhevnikova A.D.** // *Fiziologiya rasteniy*. 2011. V. 58. N 4. P. 617-623 (in Russian).
13. **Prokhorova N.V., Makarova Yu.V.** // *Vestnik SamGU*. 2006. N 7. P. 177-185 (in Russian).
14. **Vollenweider P., Cosio C., Günthardt-Goerg M.S.** // *Environmental and Experimental Botany*. 2006. V. 58. P. 25-40.
15. **Makarova Yu.V.** // *Vestnik SamGU*. 2010. N 6. P. 217-225 (in Russian).
16. **Makarova Yu.V.** Histochemical evaluation of accumulation and distribution of heavy metals in the organs and tissues of agricultural plants under different growing environments. Extended abstract of dissertation for candidate degree on biological sciences. Tolyatti. 2006. 19 p. (in Russian).
17. **Baklanov I.A., Seregin I.V., Ivanov V.B.** // *Doklady Biological Sciences*. 2009. V. 429. N 1. P. 548-550.
18. **Seregin I.V., Kozhevnikova L.D.** // *Fiziologiya rasteniy*. 2004. V. 51. P. 241-248 (in Russian).
19. **Kuznetsova E.A.** // *Fundamentalnye Issledovaniya.* 2013. N 10. N 6. P. 1266-1270 (in Russian).
20. **Roguleva N.O.** // *Voprosy sovremennoy nauki i praktiki*. 2007. N 4 (10). V. 1. P. 23-27 (in Russian).
21. **Eremchenko O.Z., Chudinova L.A.** [electronical resources] - Access mode (in Russian): <http://www.science-education.ru/pdf/2012/5/162.pdf> (in Russian).
22. **Wójcik M., Tukiendorf A.** // *Acta Physiol. Plant*. 1999. V. 21. N 2. P. 99-107.
23. **Madzhugina Yu.G.** Investigation of ability of Calamagrostis to accumulate of heavy metals for develop a phytoremediation technology. Extended abstract of dissertation for candidate degree on biological sciences. Moscow. 2008. 25 p. (in Russian).
24. **Shchudlo M.M., Stupina T.A., Shchudlo N.A.** // *Izvestia of Chelayskogo nauchnogo tsentra*. 2004. V. 25. P. 17-22 (in Russian).
25. **Startseva M.S., Chertok V.M.** // *Pacific Medical Journal*. 2012. N 1. P. 121-123.
26. **Antosiewicz D.M.** // *Acta Soc. Bot. Pol.* 1992. V. 61. P. 281-299.
27. **Wójcik M., Tukiendorf A.** // *Biol. Plant*. 2005. V. 49. N 2. P. 237-245.
28. **Bornman J.F.** // *J. Photochem. Photobiology*. 1991. V. 8. N 3. P. 337- 341.
29. **Ali-Zade G.I.** // *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2009. N 4. P. 18-26 (in Russian).
30. **Berdonosov S.S., Sapozhnikov Yu.A.** // *Soros obrazovatelnyy zhurnal*. 2001. V. 7. N 2. P. 40-46 (in Russian).
31. **Altukhov I.V., Fedotov V.A., Ochirov V.D.** // *Vestnik IrSAA. Irkutsk IrSAA*. 2010. N 40. P. 107-115 (in Russian).
32. **Altukhov I.V., Fedotov V.A.** // *Polzunovskiy vestnik*. 2011. N 2/1. P. 156-159 (in Russian).

35. Бобрышев Ф.И., Редькин В.М., Стародубцева Г.П., Габриелян Ш.Ж. Пути повышения урожайности сельскохозяйственных культур. Ставрополь. 1995. С. 33 - 36.
36. Насибова А. Н., Ахмедов И.С. , Халилов Р.И. // Научни трудове на русенския университет. 2009. Т 48. № 1,2. С. 171-173.
37. Халилов Р.И. Гольдфельд М.Г. // ДАН СССР. 1992. Т. 325. № 3. С. 609-612.
38. Халилов Р.И., Тихонов А.Н. // Биофизика. 1992. Т. 37. № 5. С. 935-938.
39. Владимирский Б.М., Нарманский В.Я., Темуриянц Н.А. // Биофизика. 1995. Т.40. №. 4. С. 749 - 754.
40. Куклев Ю.И. Физическая экология: учеб. пособие. М.: Высш. шк. 2001. 357 с.
41. Нефёдов Е.И., Протопопов А.А., Семенов А.И., Яшин А.А. Взаимодействия физических полей с живым веществом: монография / Под общ. ред. А.А. Хадарцева. Тула: ТГТУ. 1995. 98 с.
42. Холодов Ю.А. О механизме биологического действия постоянного магнитного поля / Под ред. Ю. А. Холодова. М.: Наука. 1971. 215 с.
43. Ольшанская Л.Н., Собгайда Н.А., Стоянов А.В. // Экология и промышленность России. 2011. февраль. С. 53-56.
44. Ольшанская Л.Н., Собгайда Н.А., Стоянов А.В. // Изв. вузов. Химия и хим. технология. 2010. Т. 53. Вып. 9. С. 87-91.
45. Стоянов А.В., Собгайда Н.А., Ольшанская Л.Н. // Химич. и нефтегаз. машиностр. 2010. № 6. С. 38 - 41.
46. Ольшанская Л.Н., Собгайда Н.А., Тарушкина Ю.А., Стоянов А.В. // Химич. и нефтегаз. машиностр. 2008. № 8. С.41-44.
47. Ольшанская Л.Н. // Вестн. СГТУ. 2011. № 4 (61). Вып. 3. С. 140 – 147.
48. ГН 2.1.7.2041 - 06 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве». М.: Изд-во Стандартов. 2006. 8 с. <http://www.opengost.ru>
33. Savelyev V.A. // Sibirskiy vestnik nauki. 1981. N 5. P. 26-29 (in Russian).
34. Savelyev V.A. // Physical factors in plant cultivation in the aspect of environmental problems of Central Asia and Kazakhstan: Coll. of presentations. Tashkent. 1990. P. 98-99 (in Russian).
35. Bobryshev F.I., Redkin V.M., Starodubtseva G.P., Gabrielayn Sh.Zh. Ways of increase of productivity of crops. Stavropol: 1995. P. 33-36 (in Russian).
36. Nasibova A.N., Akhmedov I.S., Khalilov R.I. // Nauchni trudove na rusinskia universitet. 2009. V. 48. N 1.2. P. 171-173 (in Russian).
37. Khalilov R.I., Goldfeld M.G. // DAN USSR. 1992. V. 325. N 3. P. 609-612 (in Russian).
38. Khalilov R.I., Tikhonov A.N. // Biofizika. 1992. V. 37. N 5. P. 935-938 (in Russian).
39. Vladimirskiy B.M., Narmanskiy V.Ya., Temuriants N.A. // Biofizika. 1995. V. 40. N 4. P. 749-754 (in Russian).
40. Kuklev Yu.I. Physical ecology: training manual. M.: Vyssh. Shkola. 2001. 357 p. (in Russian).
41. Nefedov E.I., Protopopov A.A., Sementsov A.I., Yashin A.A. Interaction of physical fields with living matter: monograph / Ed by A.A. Khadartsev. Tula: TSTU. 1995. 98 p. (in Russian).
42. Kholodov Yu.A. On the mechanism of biological effect of constant magnetic field / Editor Yu. A. Kholodov. M.: Nauka. 1971. 215 p. (in Russian).
43. Olshanskaya L.N., Sobgaiyda N.A., Stoyanov A.V. // Ecologiya i promyshlennost Rossii. 2011. february P. 53-56 (in Russian).
44. Olshanskaya, L.N., Sobgaiyda N.A., Stoyanov A.V. // Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol. 2010. V. 53. N 9. P. 87-91 (in Russian).
45. Stoyanov A.V., Sobgayda N.A., Olshanskaya L.N. // Khimich. i Neftegas. Mashinostr. 2010. N 6. P. 38-41 (in Russian).
46. Olshanskaya L.N., Sobgaiyda N.A., Tarushkina Yu.A., Stoyanov A.V. // Khimich. i Neftegas. Mashinostr. 2008. N 8. P. 41-44 (in Russian).
47. Olshanskaya L.N. // Vestnik SSTU. 2011. N 4 (61). N 3. P. 140 - 147 (in Russian).
48. HS 2.1.7.2041-06 «Maximum permissible concentration (MPC) of chemical substances in soil». M. 2006. 8 p. <http://www.opengost.ru> (in Russian).

*Поступила в редакцию 12.03.2016  
Принята к опубликованию 18.05.2016*

*Received 12.03.2016  
Accepted 18.05.2016*