

**ПРИМЕНЕНИЕ СПЕКТРОСКОПИИ ПРИ ИЗУЧЕНИИ
МЕДЬ-ИНДУЦИРОВАННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В РАСТЕНИЯХ ОГУРЦА
(*CUCUMIS SATIVUS L.*)**

Черепанов Игорь Сергеевич¹, Крюкова Полина Сергеевна²

*ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»,
426034, Россия, г. Ижевск, ул. Университетская, д. 1*

¹ – к. х. н., доцент каф. Фундаментальной и прикладной химии; e-mail: cherchem@mail.ru

² – студент 4 курса бакалавриата направления подготовки «Химия»

*В настоящей статье приводятся результаты изучения влияния ионов меди в присутствии органических веществ на прорастание и структурные изменения огурца (*Cucumis sativus L.* сорт «Нежинский») на ранних этапах онтогенеза с использованием метода ИК-Фурье спектроскопии. Показано, что среда для биотестирования, содержащая 25 мг/л меди, вызывает угнетающее действие на проростки огурца, при этом происходят структурные изменения, обусловленные взаимодействиями растительных компонентов с ионами металла. На основании анализа ИК-Фурье спектров корней *Cucumis sativus L.* предположено, что катионы меди реализуют механизм проявления токсичности посредством связывания карбоксильных и фосфодиэфирных групп белков, свободных кислот и фосфатных производных. Совпадение характеристических частот amino- и карбоксильных групп в ИК-Фурье спектрах твердых продуктов, которые выделены из растворов, содержащих органические гуминоподобные вещества и те же вещества в присутствии $Cu(II)$, свидетельствует об отсутствии сильного координационного взаимодействия между ионами меди и органическими веществами среды вследствие низкой хелатирующей способности последних.*

Ключевые слова: *органические вещества, огурец, *Cucumis sativus L.*, ИК-Фурье спектроскопия, медь, хелатирование.*

Ионы биогенных металлов при взаимодействии с биологически активными веществами растений способны как к проявлению токсических свойств [1, 2], так и к стимуляции роста [3], при этом влияние на ростовые процессы зависит от индивидуальных адаптационных особенностей различных растений. Одним из наиболее важных биогенных металлов является медь, химическое и биохимическое поведение которой разнообразно, при этом механизмы ингибирования ростовых процессов изучены недостаточно [4]. Диапазон исследуемых в вегетационных экспериментах концентраций ионов металлов достаточно широкий – от 5 до 1000 мг/л, при этом показано, что граничная концентрация токсичности ионов меди составляет порядка 25 мг/л для семян редиса [5]. В растворах веществ, способных к химическому связыванию ионов металлов, граничные концентрации токсичности ионов могут существенно повышаться [3]. Так, обогащение почвы органическим веществом является известным агрономическим приемом, препятствующим поступлению тяжелых металлов в растения [6]. Механизмы проявления токсичности металлов при их воздействии на растения выражаются в реакциях ионов с функциональными SH-группами белков, вытеснение кальция из клеток, связывании с карбоксильными и аминогруппами, развитии окислительного стресса [6, 7]. Образование новых химических

связей и изменение структурно-группового состава органических соединений растений при биохимическом связывании металлов наиболее эффективно и надежно диагностируется методами электронной и ИК-спектроскопии [8–10]; из чего следует, что спектральная информация полезна при анализе механизмов взаимодействия и проявления токсического действия тяжелых металлов на растения. В связи с этим целью исследования являлось изучение механизмов влияния ионов меди на растения огурца (*Cucumis sativus L.*) методами спектроскопии при проращивании в среде, обогащенной органическим веществом.

Методика. Получение водорастворимой фракции синтетического гумина проводилось по предложенной ранее методике [8] термостатированием (70°C) эквимолярной смеси (0,002 моль) D-глюкозы с п-аминобензойной кислотой в 25 мл этанола в присутствии $CuCl_2$ (конечная концентрация в растворе 100 мг/л) в колбах с обратным холодильником в течение 2 ч. По окончании синтеза растворитель удаляли, твердую фазу промывали водой для разделения водонерастворимой и водорастворимой фракций. Последнюю собирали и высушивали при 25°C получая водорастворимую фракцию синтетического гумина, которую растворяли в дистиллированной воде и в водном растворе $CuSO_4$ (25 мг/л ионов Cu^{2+}). Эти растворы использовали

1. Основные полосы (см⁻¹) ИК-Фурье спектров твердофазных продуктов, выделенных из водорастворимой фракции

Водорастворимый синтетический гумин [8]	Твердая фаза модельной системы 0,01% водорастворимый синтетический гумин + 25 мг/л Cu(II)	Отнесение полос к структурным фрагментам
820	810	$\delta_{\text{CH}}(\text{Ar})$
1000–1100	1000–1100	$\nu_{\text{COC}}, \nu_{\text{CO}}$
1150, 1240	1172	ν_{COH}
1405	1396	$\nu^{\text{s}}_{\text{COO-}}$
1520	1530	$\nu_{\text{C=C}}(\text{Ar})$
1605	1610	$\delta_{\text{NH}} + \nu_{\text{C=C}}$
1630	1630	$\nu^{\text{as}}_{\text{COO-}}$
1690	1680	$\nu_{\text{C=O}}$

в качестве сред для проращивания семян. Концентрация водорастворимой фракции синтетического гумина в обоих растворах составляла 0,01%.

Электронные спектры растворов регистрировали в кварцевых кюветах в диапазоне длин волн 200–750 нм (спектрофотометр СФ-2000), ИК-Фурье спектры твердых фаз получали на ИК-Фурье спектрометре ФСМ-2201 в интервале волновых чисел 4000–500 см⁻¹ с разрешением 4 см⁻¹ в таблетках KBr (1:300), содержание ионов меди в растворах контролировали атомно-абсорбционным методом на атомно-абсорбционном спектрометре «Shimadzu AA-7200».

В чашках Петри, выложенных фильтровальной бумагой, которую пропитывали средами для проращивания, размещали по 15 предварительно обработанных 0,01% раствором KMnO₄ семян огурца (*Cucumis sativus* L. сорт Нежинский). Проращивание в 0,01% растворах выделенного из водорастворимой фракции твердого остатка (ОВФ) в присутствии и отсутствии ионов меди (II) осуществлялось в течение 4 сут., оценка морфологических параметров проводилась сравнением с контролем (вода). Эксперимент был поставлен в 3-кратной повторности при температуре 20±1°C. При статистической оценке результатов был принят уровень значимости p=0,05. Для изучения механизма действия ионов меди на тест-растение пробы (5 мг) корней биотестируемых образцов семян промывали, сушили, измельчали, гомогенизировали, таблетировали с KBr (1:300) и снимали ИК-Фурье спектры [9]. Количественная обработка ИК-Фурье спектров с оценкой интегральной интенсивности полос поглощения проводилась по методу базовой линии в программном пакете F-Spec. Для получения дополнительной информации о механизме токсичности

ионов меди также отдельно изучалась модельная система: твердый остаток, выделенный из 0,01% водного раствора + 25 мг/л Cu(II), полученный высушиванием при 25°C.

Результаты и обсуждение. Ранее выполненное исследование структурно-группового состава твердого продукта водорастворимой фракции методом ИК-Фурье спектроскопии подтверждает его структурную близость к природным органическим гуминовым соединениям (табл. 1) [8].

В частности, отнесение полос в ИК-Фурье спектрах показывает наличие характерных для гуминовых веществ функциональных групп (карбонильные, карбоксильные, аминогруппы), ароматической составляющей и углеводных фрагментов.

Результаты биотестирования показали угнетающее действие ионов меди даже в растворе, проявляющем ростстимулирующие свойства по отношению к тест-растению (табл. 2).

ИК-Фурье спектры корней (рис. 1) показали наличие характерных для структурных составляющих органических растительных веществ полос поглощения [9, 10].

Наиболее важной с позиций анализа структурно-группового состава является спектральный диапазон 1800–800 см⁻¹. Интенсивные сигналы с максимумами 1630, 1414, 1400, 1170, 1055, 870 см⁻¹ отвечают колебаниям карбонильных групп, кратных C=C-связей, карбоксилатов, гидроксильных групп и гликозидных циклов как структурных фрагментов липидных, белковых и углеводных составляющих. Основные структурные изменения при катионном обмене наблюдаются в среднечастотной (1800–1200 см⁻¹) области спектра (рис. 1) [10], в частности важными являются полосы валентных колебаний $\nu_{\text{C=O}}$ (COOH;

2. Влияние меди на морфологические параметры огурца (*Cucumis sativus* L. сорт Нежинский)

Среда для проращивания	Длина корня, см	Изменение длины корня, %	Лабораторная всхожесть, %
Контроль (вода)	4,72 ± 0,02	–	87,5
0,01% раствор ОВФ + 25 мг/л Cu ²⁺	3,02 ± 0,02	–56,3	62,5
0,01% раствор ОВФ	5,21 ± 0,03	9,4	93,2

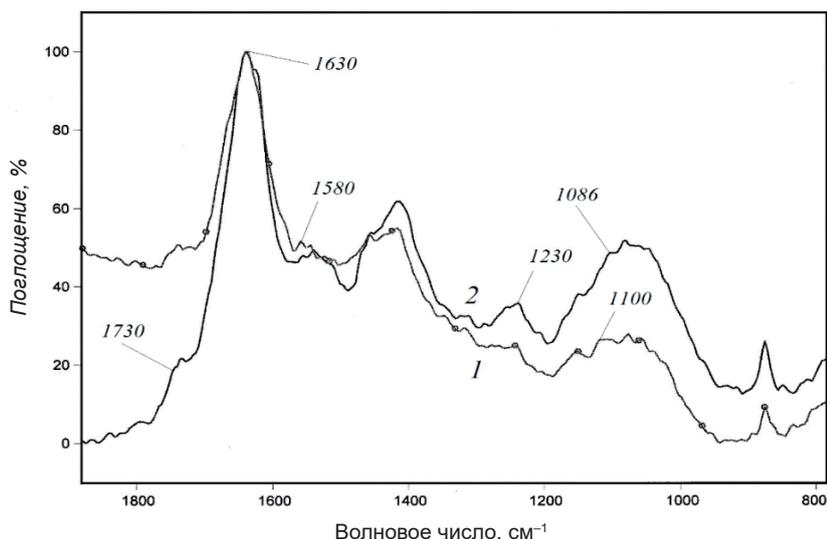


Рис. 1. ИК-Фурье спектры корней огурца (*Cucumis sativus* L. сорт Нежинский) после проращивания: 1 – в 0,01% растворе ПВФ + 25 мг/л Cu^{2+} ; 2 – в воде (контроль).

1730 cm^{-1}), составных колебаний $\nu^{\text{as}}_{\text{P=O}} + \nu_{\text{C-O}}$ (PO_2^- , COOH ; 1230 cm^{-1}) [11]. Как видно из сопоставления профилей спектральных полос, интенсивность указанных сигналов образцов, пророщенных в среде в присутствии ионов меди, снизилась. Произошел также незначительный сдвиг сигнала 1230 cm^{-1} , что связано с суперпозицией эффектов комплексообразования, смещающих полосы в сторону меньших частот за счет изменения силовых постоянных связей и конформационных эффектов лигандов [12]. Слабая полоса симметричных колебаний фосфатных групп при 1086 cm^{-1} несколько усилилась, что может быть обусловлено дополнительной поляризацией связей в фосфатных группах при комплексообразовании, увеличивающей дипольный момент. Как следствие, интенсивность полосы возрастала и она смещалась к значениям 1100 cm^{-1} , что обусловлено пространственными изменениями при координации ионов металлов с фосфоновыми группами полинуклеотидов [12]. Описанные эффекты свидетельствуют о взаимодействии катионов меди с карбоксильными и фосфодиэфирными группами органических компонентов тест-растения [9–13]. Следует отметить, что полосы деформационных δ_{NH} колебаний (NH_2 , NH ; 1580 cm^{-1}) и колебаний углеводных фрагментов (C-O-C , C-O , C-S-O ; 1170, 1055 cm^{-1}) в целом сохраняли свое положение, и указанные функциональные группы практически не участвовали в образовании связей с Cu . Таким образом, сопоставление спектральных профилей позволяет прийти к выводу о том, что существенной составляющей механизма проявления токсичности ионов меди в условиях эксперимента являлось связывание функциональных групп биологически активных веществ.

Данные авторов [3] свидетельствуют о возможности снижения токсического эффекта меди

при условии присутствия в среде реагентов, хелатирующих ионы металлов. Полосы в ИК-Фурье спектрах твердой фазы, выделенной из системы, которая моделирует среду биотестирования (табл. 1) свидетельствуют об отсутствии образования прочных комплексов органических веществ с ионами меди. В частности, полоса 1610 cm^{-1} относится к $\nu_{\text{C=C}} + \delta_{\text{NH}}$ колебаниям, и смещения последней в низкочастотную область не наблюдалось, что свидетельствует об отсутствии координационного взаимодействия типа $\text{N} \rightarrow \text{Cu}$, вероятно, по пространственным причинам. Сигнал при 1680 cm^{-1} , отвечающий колебаниям $\nu_{\text{C=O}}$ неионизированной карбоксильной группы *p*-аминобензойной кислоты, снижен по интенсивности в пользу валентных колебаний карбоксилатов (1630, 1396 cm^{-1}) [14, 15]. Кроме того, по данным [14] образование хелатных комплексов должно смещать максимумы поглощения последних в область 1340–1280 cm^{-1} , чего не наблюдалось в изучаемой системе.

Можно предположить, что продукты водорастворимой фракции синтетических гуминов системы D-глюкоза – *p*-аминобензойная кислота образуют с ионами меди преимущественно ионные структуры со слабой монодентантной ($\Delta\nu^{\text{as-s}}_{\text{COO}^-} > 200$) координацией Cu^{2+} по карбоксильным группам [15]. Препятствием для образования прочных комплексов, вероятно, являлось низкое содержание способных к координации донорных центров органических веществ в среде биотестирования.

Заключение. Проведенные модельные эксперименты показали возможность спектральной оценки структурных изменений при проявлении токсичности металлов по отношению к растениям. На основании анализа профиля полос поглощения в среднечастотной области предположен механизм токсического влияния меди на *Cucumis sativus* L.

в форме связывания карбоксильных и фосфатных групп в хелатные комплексы. Последнее предполагает основную роль свободных кислот и фосфорсодержащих метаболитов растений во взаимодействии с ионами Cu(II). Полученные результаты свидетельствуют о возможности подавления токсического действия ионов тяжелых металлов посредством связывания их избытка в прочные комплексы с компонентами среды, обладающими выраженными комплексообразующими свойствами.

Литература:

1. Пирахунова Ф., Нуреддинова Ф., Абзалов А. Влияние меди, бора и стимулятора диацетатмоноэтанол-амина на рост, развитие и плодообразование хлопчатника // Международный журнал экспериментального образования. – 2016. – № 11. – С. 183–185.
2. Коротченко И.С., Кириченко Н.Н. Влияние регулятора роста «Рибав-Экстра» на степень токсичности тяжелых металлов для тест-растений // Вестник КрасГАУ. – 2013. – № 9. – С. 117–122.
3. Курдей Т.А., Веселов А.Н. Фитопротекторный эффект гумата аммония при высоких концентрациях меди в среде // Поволжский экологический журнал. – 2016. – № 4. – С. 390–398.
4. Alaoui-Sosse B., Genet P., Vinit-Dunand F., Toussaint M.-L., Epron D., Badot P.-M. Effect of copper on growth in cucumber plant (*Cucumis sativus*) and its relationship with carbohydrate accumulation and changes in ion contents // Plant Sci. – 2004. – V. 166. – P. 1213–1218.
5. Елизарьева Е.Н., Янбаев Ю.А., Редькина Н.Н., Кудашкина Н.В., Байков А.Г., Смирнова А.П. Влияние соединений некоторых тяжелых металлов на процесс формирования проростков редиса // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 6. – С. 1–9.
6. Пищик В.Н., Воробьев Н.И., Проворов Н.А., Хомяков Ю.В. Механизмы адаптации растений к тяжелым металлам // Агрофизика. – 2015. – № 2. – С. 38–49.

7. Гладков Е.А., Гладкова О.Н., Глушецкая Л.С. Оценка устойчивости к тяжелым металлам полевицы побегоносной (*Agrostis stolonifera*), полученной в результате клеточной селекции на устойчивость к этим контаминантам во втором поколении и ее способности к аккумуляции этих веществ // Биотехнология. – 2010. – № 5. – С. 76–80.
8. Черепанов И.С., Сергеева К.А., Корнев В.И. Взаимодействие D-глюкозы с p-аминобензойной кислотой в присутствии ионов меди (II) в водно-этанольных средах // Бутлеровские сообщения. – 2017. – № 1. – С. 71–75.
9. Шукуров Т., Рахматова З.М., Марупов Р.М. Спектроскопические свойства дикорастущего лекарственного растения цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) // Доклады АН Таджикистана. – 2009. – № 6. – С. 449–454.
10. Rico C.M., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. Differential effect of Cerium oxide nanoparticles on rice, wheat, and barley roots: a Fourier transform infrared (FT-IR) microspectroscopy study // Applied Spectroscopy. – 2015. – V. 69. – P. 287–295.
11. Yee N., Benning L., Phoenix V., Ferris F. Characterization of metal-cyanobacteria sorption reaction: a combined macroscopic and infrared spectroscopic investigation // Environ. Sci. Technol. – 2004. – V. 38. – P. 775–782.
12. Хакл Е.В., Корнилова С.П., Благой Ю.П. Изучение влияния Cu²⁺ на ДНК в водных растворах, содержащих 1,2-пропандиол и глицерин, методом ИК-спектроскопии // Биофизический Вестник. – 1998. – № 1. – С. 62–70.
13. D'Souza L., Devi P., Shridhar D., Naik C. Use of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy to study cadmium-induced changes in *Padina tetrastrum* (Hauck) // Anal. Chem. Insights. – 2008. – V. 3. – P. 135–142.
14. Касумова С.А. Синтез и исследование парааминобензоатов Ho(III), Tm(III), Eu(III) // Kimya Problemleri. – 2018. – No. 1. – P. 114–118.
15. Азизкулова О.А., Бобоева Б.Т. Координационные соединения цинка (II) с пара-аминобензойной кислотой // Доклады АН Таджикистана. – 2010. – № 9. – С. 696–700.

Cherepanov I.S., Kryukova P.S.

USE OF SPECTROSCOPY TO STUDY OF COPPER-INDUCED CHANGES IN CUCUMBER PLANTS (*CUCUMIS SATIVUS* L.)

*The paper presents the results of spectroscopic study of copper ions effect in the presence of organic substances on seed germination and structural changes of cucumber plants (*Cucumis sativus* L. 'Nezhinskiy' variety) in the early stages of ontogenesis. The biotest medium containing 25 mg/L of copper ions has been shown to cause inhibitory effect, with structural changes occurring due to interactions of plant components with metal ions. Based on the IR-Fourier transform analysis of spectra of *Cucumis sativus* L. roots, it is suggested that copper cations implement the mechanism of toxicity by binding carboxyl and phosphodiester groups of proteins, free acids and phosphates. Congruence of the characteristic frequencies of amino and carboxyl groups in IR-Fourier spectra of solid products isolated from solutions containing humin-like substances and the same substances in the presence of Cu (II), indicate no interaction between copper ions and organic substances in solutions due to their low chelating capacity.*

Keywords: organic substances, cucumber, *Cucumis sativus* L., IR Fourier transform spectroscopy, copper, chelation.