

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ХИМИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ СВЕТОНЕЗАВИСИМЫХ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ В СТАДИИ ПРОРАЩИВАНИЯ СЕМЕННОГО МАТЕРИАЛА

Сергей Николаевич Сергеев¹, доктор биологических наук
 Константин Александрович Тараскин¹, доктор химических наук
 Ольга Тарасовна Касаикина², доктор химических наук
 Антон Валерьевич Лобанов^{2,3}, доктор химических наук
 Михаил Иванович Будник⁴, кандидат биологических наук
 Андрей Вячеславович Грудзинский⁴, кандидат технических наук
 Павел Александрович Сорокин¹, кандидат химических наук
 Екатерина Константиновна Барнашова⁵, кандидат сельскохозяйственных наук
 Людмила Магомедовна Апашева², кандидат биологических наук
 Елена Николаевна Овчаренко², кандидат химических наук
 Сергей Владимирович Лебедев¹
 Элла Александровна Щербакова¹
 Юлия Валерьевна Бондар¹
 Ксения Станиславовна Касимцева⁶

¹Научно-исследовательский институт прикладной акустики, г. Дубна, Россия

²ФИЦ химической физики имени Н.Н. Семенова Российской академии наук, г. Москва, Россия

³Московский педагогический государственный университет, г. Москва, Россия

⁴Российская академия ракетных и артиллерийских наук, г. Москва, Россия

⁵Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К.А. Тимирязева, г. Москва, Россия

⁶Государственный университет «Дубна», г. Дубна, Россия

E-mail: kant1958@yandex.ru

Аннотация. Исследования биохимических процессов, происходящих в тканях растений, указывают на значимость взаимодействий с участием кислородсодержащих соединений. Пероксид водорода — один из окислительных агентов, обнаруженных в структуре растительных тканей, наиболее стабильное кислородсодержащее вещество. По результатам экспериментальных исследований действия кислородсодержащих соединений, в том числе в качестве активаторов пероксида водорода, введенных в состав увлажняющей жидкости, используемой при проращивании семян культурных растений, установили, что их применение увеличивает активность ростовых процессов. На примере семян огурцов сорта Мазай F1 лучшие показатели установлены у двухкомпонентного водного раствора, содержащего пероксид водорода ($3,5 \times 10^{-5}$ М) и циклогексанон ($1,75 \times 10^{-5}$ М). Прирост в ходе 48-часового эксперимента составил 175% по отношению к опыту сравнения, проведенному в дистиллированной воде. Оценка экологической безопасности предлагаемых растворов, содержащих в своем составе кислородсодержащие соединения, показала, что они безопасны в рекомендуемых концентрациях в качестве увлажняющих жидкостей для проращивания семян.

Ключевые слова: проращивание семян, пероксид водорода, активирующие добавки, окислительные процессы, экологическая безопасность

RESEARCH DEVELOPMENT METHOD OF CHEMICAL ACTIVATION OF LIGHT-INDEPENDENT OXIDATIVE PROCESSES AT THE SEED MATERIAL GERMINATION STAGE

S.N. Sergeev¹, *Grand PhD in Biological Sciences*
 K.A. Taraskin¹, *Grand PhD in Chemical Sciences*
 O.T. Kasaikina², *Grand PhD in Chemical Sciences*
 A.V. Lobanov^{2,3}, *Grand PhD in Chemical Sciences*
 M.I. Budnik⁴, *PhD in Biological Sciences*
 A.V. Grudzinskiy⁴, *PhD in Engineering Sciences*
 P.A. Sorokin¹, *PhD in Chemical Sciences*
 E.K. Barnashova⁵, *PhD in Agricultural Sciences*
 L.M. Apasheva², *PhD in Biological Sciences*
 E.N. Ovcharenko², *PhD in Chemical Sciences*
 S.V. Lebedev¹
 E.A. Scherbakova¹
 Yu.V. Bondar¹
 K.S. Kasimtseva⁶

¹Institute of Engineering Acoustics, Dubna, Russia

²N.N. Semenov Federal Research Centre for Chemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³Moscow Pedagogical State University, Moscow, Russia

⁴Russian Academy of Missile and Artillery Sciences, Moscow, Russia⁵Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia⁶Dubna State University, Dubna, Russia

E-mail: kant1958@yandex.ru

Abstract. Studies of biochemical processes occurring in plant tissues indicate a significant role of interactions involving oxygen-containing compounds. Hydrogen peroxide is one of the oxidizing agents found in the structure of plant tissues, the most stable oxygen-containing substance. According to the results of experimental studies of the action of oxygen-containing compounds, including as activators of hydrogen peroxide, introduced into the composition of the moisturizing liquid used in the germination of seeds of cultivated plants, it was found that their use increases the activity of growth processes. Using the example of cucumber seedlings of the Mazai F1 variety, the best indicators were found in a two-component aqueous solution containing hydrogen peroxide (3.5×10^{-5} M) and cyclohexanone (1.75×10^{-5} M). The increase during the 48-part experiment was 175% compared to the comparison experiment conducted in distilled water. An assessment of the environmental safety of the proposed solutions containing oxygen-containing compounds in their composition has shown that they are safe in recommended concentrations as moisturizing liquids for seed germination.

Keywords: seed germination, hydrogen peroxide, activating additives, oxidative processes, environmental safety

Ключевую роль в развитии растительных процессов играют биохимические взаимодействия, происходящие под воздействием катализаторов. Процессы метаболизма в клетках живых организмов активно изучали на протяжении многих лет. Однако даже в сфере классических представлений в данном вопросе существуют области, требующие более тщательного изучения и обоснования имеющегося фактического материала. Поэтому важно более глубоко исследовать биохимические взаимодействия, происходящие на определенных стадиях развития живых организмов, в частности, влияние различных внешних факторов, например, рострегулирующих агентов.

Настоящая работа посвящена изучению важности активных химических субстанций, интенсифицирующих окислительные связи в процессе развития зародышей растений при теневой генерации. Окислительные реакции влияют на метаболические взаимодействия в живых организмах, также велика их роль в биохимических превращениях, обеспечивающих рост. [9] Пероксид водорода — один из важных природных окислительных агентов, необходимый для жизнедеятельности растений, наиболее стабильное среди активных форм кислорода низкомолекулярное кислородсодержащее соединение, образующееся в основном в атмосфере Земли, выпадающее с дождевой водой (концентрация — до 10^{-4} M). [8] По наблюдению Д.И. Менделеева, чем слабее раствор перекиси водорода в воде, тем он постояннее. [7] Это фундаментальное условие, обеспечивающее его участие в биологических процессах, в частности, жизнедеятельности растений. Роль этого химического вещества в биохимических превращениях многофункциональна и до конца не изучена. Установлено влияние пероксида водорода на регулирование ряда биохимических процессов в качестве сигнального медиатора, но как источник ряда высокоагрессивных кислородсодержащих агентов (ионы и радикалы), он представляет опасность для клеточных структур живого организма. [10, 11]

При нормальном течении процессов жизнедеятельности, концентрация пероксида в живых клетках невысока (10^{-5} ... 10^{-8} M). Даже в столь малых количествах, это соединение способствует образованию органических гидропероксидов (R-O-O-H) при контакте с содержащимися в тканях растений малыми молекулами и высокомолекулярными со-

единениями (ДНК-структуры, липиды, белки). [6] Они значительно повышают химическую активность молекул, которые в результате дальнейших метаболических взаимодействий участвуют в реакциях с образованием спиртов, эпоксидов, альдегидов и других окси-соединений. Таким образом, введение в зону ростовой активности клеток повышенной концентрации экзогенного пероксида водорода может обеспечить интенсификацию указанных взаимодействий и активацию процесса генезиса.

Это предположение нашло подтверждение в экспериментальных данных, определивших роль активных форм кислорода (АФК) и соединений типа липидных структур (R-O-O-H), при индуцировании процесса деления клеток. [12] Результаты опытов, свидетельствующие об увеличении накопления в тканях живых организмов соединений АФК под действием факторов роста клеток, а также ингибирование или снижение функций этих гормонов при блокаде антиоксидантами, указывают на тесную взаимосвязь наблюдаемых биохимических процессов. Повышение до определенного уровня концентрации пероксида водорода или активация его молекулы в результате структурных преобразований могут способствовать инициации или увеличению активности роста клеток в прорастающих семенах.

Цель работы — установить влияние активирующих добавок на основе окси-соединений с внесением в водный раствор пероксида водорода, используемого в качестве ростактивного соединения, на скорость прорастивания семян культурных растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследованиях использовали семена огурца сорта *Мазай F1*. Опыты закладывали в специальной камере, предотвращающей попадание в область проведения эксперимента различных источников светового излучения. Для исключения влияния теплового эффекта, связанного со спонтанными колебаниями факторов окружающей среды, семена помещали в термостатируемую ячейку с поддержанием постоянной температуры $18,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

Поврежденные образцы отбраковывали. Прорастивали семена в чашках Петри. В каждом опыте по 6 семян, их накрывали хлопчатобумажной тканью и заливали 5,0 мл увлажняющего раствора. Дополнительно увлажняли через 18, 24 и 36 ч эксперимента

порциями по 2,5 мл свежеприготовленного раствора того же состава. Среда для увлажнения: дистиллированная (деионизированная) вода, растворы пероксида водорода и растворы с кислородосодержащими добавками, способствующие активации окислительных каталитических процессов. При этом дистиллированная вода была позиционирована в экспериментах для опытов сравнения; растворы пероксида водорода рассматривали в качестве инициаторов окислительных процессов в биологической среде, а в качестве каталитических добавок в растворы вводили химически чистые вещества (диметилкетон, α -бутанон, 1-тетралон, циклогексанон).

Пероксид (перекись) водорода, получаемый в промышленных масштабах по ГОСТ 177-88 «Водорода перекись. Технические условия», содержит токсические стабилизаторы для замедления разложения (серная кислота, мышьяк и другие), которые не позволяют использовать его в растениеводстве, так как они могут быть ингибиторами окислительных процессов. Поэтому в описываемых экспериментах применяли раствор чистого пероксида водорода, полученного методом микроволнового воздействия на дистиллированную воду.

Методика получения раствора чистого пероксида водорода

В ампулу из кварцевого стекла помещают 8 мл дистиллированной воды. Лабораторный прибор микроволнового излучения Biotage Initiator Eight работает в режиме: температура — 40°C, давление — 30 бар. При достижении указанных параметров ампула помещается с помощью привода робота-манипулятора в зону активного воздействия. Содержимое ампулы подвергается микроволновому излучению мощностью 50...60 Вт, частотой — 50...60 ГГц в течение 20 сек. Затем ампулу извлекают из прибора, пробу раствора пероксида водорода направляют на анализ.

Методика анализа раствора пероксида водорода

Содержание пероксида водорода определяли методом титрования. В коническую колбу вместимостью 100 мл вносят пипеткой 20 мл анализируемого раствора с пероксидом водорода. Прибавляют 10 мл 1 М раствора серной кислоты и титруют 0,001 Н (2×10^{-5} М) раствором перманганата калия до появления бледно-розовой окраски, которая должна быть устойчивой в течение 30 сек. По результатам рассчитывают концентрацию пероксида водорода. Предел обнаружения методики — 1×10^{-6} М.

Приготовление экспериментальных растворов

Для работы использовали водные растворы, содержащие активное вещество пероксида водорода с концентрацией $1,75...7,00 \times 10^{-5}$ М. Каталитические добавки диметилкетона, α -бутанона, 1-тетралона, циклогексанона вносили в готовый раствор пероксида водорода в концентрации $1,75 \times 10^{-5}$ М. Все растворы тщательно перемешивали и хранили до начала эксперимента в герметичной стеклянной таре в темноте при температуре 4°C.

Оценивали интенсивность ростовых процессов в стадии прорастания семян по размеру образовавшегося зародыша (мм). Для упрощения все эксперименты длились 48 ч. В каждом из опытов регистрировали результаты через 12, 24, 36 и 48 ч после размещения семян в увлажненную среду. За

результат измерения в отдельной экспериментальной точке принимали среднее арифметическое значение всех шести образцов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные по оценке влияния различных природных концентраций пероксида водорода на скорость прорастания семян представлены на рисунке 1, 2-я стр. обл. В качестве объекта сравнения применяли дистиллированную воду.

На рисунке 2 (2-я стр. обл.) — типичный пример пророщенного семени огурца в течение 48 ч (увлажняющая жидкость — дистиллированная вода), рисунке 3 (2-я стр. обл.) — пример, где в качестве увлажняющей жидкости использовали раствор пероксида водорода (концентрация — $7,00 \times 10^{-5}$ М).

Установлено, что пероксид водорода ускоряет процесс прорастания. Эффективность воздействия на ростовые процессы определяется его концентрацией в растворе.

Наилучшие показатели были достигнуты при использовании раствора с концентрацией пероксида водорода $3,50 \times 10^{-5}$ М, прирост составил 150% ($2,1 \times 100/1,4$), по отношению к опыту сравнения. Увеличение концентрации пероксида водорода до $7,00 \times 10^{-5}$ М приводило к замедлению процесса роста, что согласуется с ранее полученными данными. [1] Снижение содержания пероксида водорода до концентрации $1,75 \times 10^{-5}$ М также замедляло скорость прорастания семян, по сравнению с концентрацией $3,50 \times 10^{-5}$ М, но менее выражено, чем при $7,00 \times 10^{-5}$ М. Для проведения дальнейших исследований в качестве оптимального был принят раствор пероксида водорода с концентрацией $3,50 \times 10^{-5}$ М.

Известно, что одно из ключевых положений перекисной теории биологического окисления А.Н. Баха, впервые обнаружившего в клетках растений и грибов пероксид водорода (H_2O_2), — необходимость предварительной активации кислородсодержащих молекул в биологических системах, что было в последующем экспериментально подтверждено. [3, 5]

В качестве потенциальных активаторов пероксида водорода в биохимических процессах роста были рассмотрены соединения, содержащие окси-группу (диметилкетон, α -бутанон, 1-тетралон, циклогексанон). Первоначально изучили влияние на процесс прорастания семян водных растворов этих соединений с концентрацией $1,75 \times 10^{-5}$ М (рис. 4, 2-я стр. обл.).

Вещества диметилкетон, α -бутанон, 1-тетралон, циклогексанон, применяемые в качестве кислородосодержащих водных растворов с концентрацией $1,75 \times 10^{-5}$ М, ускоряли прорастание семян, по сравнению с увлажняющей жидкостью на основе дистиллированной воды от 121 до 130%, не имея существенных различий между собой по параметру скорости прорастания.

В следующем эксперименте изучены те же соединения в качестве потенциальных активирующих добавок для раствора пероксида водорода. Для приготовления необходимых смесей к раствору пероксида водорода ($3,50 \times 10^{-5}$ М) добавляли расчетную навеску окси-соединения для достижения содержания в растворе концентрации $1,75 \times 10^{-5}$ М. Сравнительная оценка влияния на скорость про-

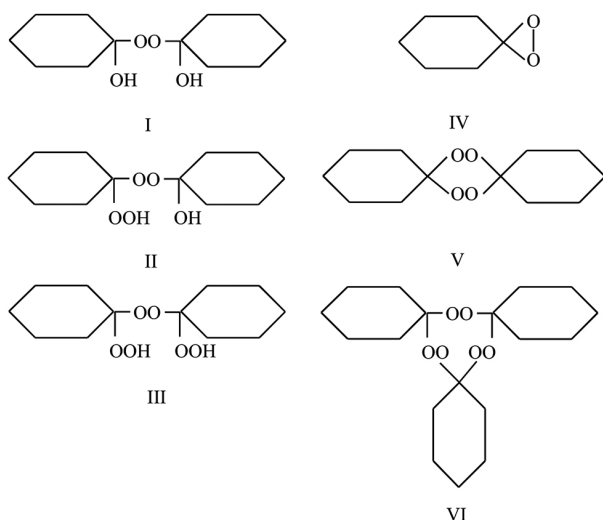


Рис. 7. Структурное строение соединений, образующихся при взаимодействии пероксида водорода и циклогексанона в водном растворе.

рашивания семян двухкомпонентных водных растворов на основе пероксида водорода представлена на рисунке 5 (2-я стр. обл.).

На рисунке 6 (2-я стр. обл.) типичный пример пророщенного семени огурца с использованием в качестве увлажняющей жидкости двухкомпонентного водного раствора на основе пероксида водорода и добавкой циклогексанона.

Установлено, что диметилкетон не оказывает влияния как активатор пероксида водорода на прорастание семян огурца в то время, как другие вещества, содержащие окси-группы (α -бутанон, 1-тетралон, циклогексанон), увеличивают показатели ростовых процессов. Наилучшие результаты в 48-часовом эксперименте зарегистрированы при использовании в качестве увлажняющего раствора двухкомпонентной смеси, содержащей $3,50 \times 10^{-5}$ М пероксида водорода и $1,75 \times 10^{-5}$ М циклогексанона в воде. Приrost в этом случае составил 175% ($2,45 \times 100 / 1,4$), по отношению к опыту сравнения, проведенному в дистиллированной воде.

Возможно лучший биоэффект при добавлении к пероксиду водорода именно циклогексанона обусловлен дополнительным образованием разнообразных кислородосодержащих соединений второго порядка (рис. 7, I–VI) при окислении циклогексанона пероксидом водорода. [4]

Наличием и потенциально высокой биологической активностью разнообразных кислородосодержащих соединений, образующихся при взаимодействии пероксида водорода и циклогексанона в водном растворе, можно объяснить высокий стимулирующий эффект ростовой активности получаемых растворов, что наглядно продемонстрировано на примере прорастания семян огурцов сорта *Мазай F1*. Отсутствие подобных биологически активных структур в растворах, содержащих пероксид водорода и диметилкетон, определяют их более низкие показатели стимулирования процессов прорастания семян.

Замачивание семян — операция, осуществляемая в начальный период генезиса растений, сбор

и потребление продукции растениеводства — в заключительной стадии вегетации. Поэтому, учитывая низкую стабильность предлагаемых кислородсодержащих активаторов в объектах окружающей среды, можно полагать, что они безопасны при их использовании в рекомендуемых концентрациях в составе увлажняющих жидкостей для прорастания семян. [2] Концентрация применяемого в опытах пероксида водорода не превышает максимальный природный уровень в дождевой воде.

Таким образом, экспериментальные исследования по оценке влияния ряда кислородсодержащих соединений, в том числе в качестве активаторов пероксида водорода, введенных в состав увлажняющей жидкости, используемой в процессе прорастания семян культурных растений, показали, что они увеличивают активность ростовых процессов.

Полученные результаты можно рассматривать как важный шаг в поиске новых подходов к химической активации светонезависимых окислительных процессов в стадии прорастания семенного материала, направленных на повышение урожайности сельскохозяйственных культур.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Апашева Л.М., Будник М.И., Лобанов А.В. и др. Экологически чистый пероксид водорода: получение, рострегулирующие свойства // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2021. Т. 6. № 2. С. 358–361.
2. Барнашова Е.К., Назаров Г.В., Тараскин К.А. и др. Выбор метода контроля динамики накопления экотоксикантов в объектах окружающей среды // Доклады Академии военных наук. 2008. № 4 (33). С. 37–39.
3. Бах А.Н. Собрание трудов по химии и биохимии. М.: АН СССР, 1950. 648 с.
4. Гайфуллин А.А., Тунцева С.Н., Гайфуллин Р.А. и др. Получение пероксида циклогексанона с использованием пероксидсодержащих сточных вод // Вестник Казанского технологического университета. 2012. Т. 15. № 15. С. 26–30.
5. Гесслер Н.Н., Аверьянов А.А., Белозерская Т.А. Активные формы кислорода в регуляции развития грибов // Биохимия. 2007. Т. 72. Вып. 10. С. 1342–1364.
6. Лушак В.И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма // Биохимия. 2007. Т. 72. Вып. 8. С. 995–1017.
7. Менделеев Д.И. Основы химии. 12-е изд. М.-Л.: Госхимтехиздат, 1934.
8. Стребков Д.С., Будник М.И., Душков В.Ю. и др. Повышение урожайности озимой пшеницы с помощью экологически чистого водного раствора пероксида водорода природной концентрации // Вестник российской сельскохозяйственной науки. 2022. № 4. С. 64–67. DOI: 10.31857/2500-2082/2022/4/64-67, EDN: BJSFKJ
9. Турпаев К.Т. Активные формы кислорода и регуляция экспрессии генов // Биохимия. 2002. Т. 67. Вып. 3. С. 339–352.
10. Шлапакова Т.И., Костин Р.К., Тягунова Е.Е. Активные формы кислорода: участие в клеточных процессах и развитии патологии // Биоорганическая химия. 2020. Т. 46. № 5. С. 466–485.
11. Lander H.M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction // FASEB J. 1997. V. 11. № 1. P. 118–124.

12. Suzuki Y.J., Forman H.J., Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction // *Free Radical Biol. Med.* 1996. V. 22. № 1/2. P. 269–285.

REFERENCES

1. Apasheva L.M., Budnik M.I., Lobanov A.V. i dr. Ekologicheski chistoy peroxid vodoroda: poluchenie, rostreguliruyushchie svoystva // *Aktual'nye voprosy biologicheskoy fiziki i himii.* 2021. T. 6. № 2. S. 358–361.
2. Barnashova E.K., Nazarov G.V., Taraskin K.A. i dr. Vybora metoda kontrolya dinamiki nakopleniya ekotoksikantov v ob'ektah okruzhayushey sredy // *Doklady Akademii voennykh nauk.* 2008. № 4 (33). S. 37–39.
3. Bach A.N. *Sobranie trudov po himii i biologii.* M.: AN SSSR, 1950. 648 s.
4. Gayfulin A.A., Tunsceva S.N., Gayfulin R.A. i dr. Poluchenie peroksida cyklogexanona s ispol'zovaniem peroxidsoderzhashih stochnih vod // *Vestnik Kazanskogo tehnologicheskogo universiteta.* 2012. T. 15. № 15. S. 26–30.
5. Gesler N.N., Aver'yanov A.A., Belozerskaya T.A. Aktivnie formi kisloroda v regulyatsii razvitiya gribov // *Biohimiya.* 2007. T. 72. Vyp. 10. S. 1342–1364.
6. Lushchak V.I. Svobodno-radikal'noe okislenie belkov i ego svyaz' s funkcional'nim sostoyaniem organizma // *Biohimiya.* 2007. T. 72. Vyp. 8. S. 995–1017.
7. Mendeleev D.I. *Osnovi himii.* Isdanie 12. M.-L.: Goshmizdat, 1934.
8. Strebkov D.S., Budnik M.I., Dushkov V.U. i dr. Povysheniye urozaynosti ozimoy pshenicy s pomoschyu ekologicheskoy chistogo vodnogo rastvora peroksida vodoroda prirodnoy koncentracii // *Vestnik Rossiyskoy sel'skohozyaystvennoy nauki.* 2022. № 4. S. 64–67. DOI: 10.31857/2500-2082/2022/4/64-67, EDN: BJSFKJ.
9. Turpaev K.T. Aktivnie formi kisloroda i regulyatsiya ekspressii genov // *Biohimiya.* 2002. T. 67. Vyp. 3. S. 339–352.
10. Shlapakova T.I., Kostin R.K., Tyagunova E.E. Aktivnie formi kisloroda: uchastie v kletochnykh processakh i razvitiy patologii // *Bioorganicheskaya himiya.* 2020. T. 46. № 5. S. 466–485. DOI: 10.31857/S013234232005022X.
11. Lander H.M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction // *FASEB J.* 1997. V. 11. № 1. P. 118–124.
12. Suzuki Y.J., Forman H.J., Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction // *Free Radical Biol. Med.* 1996. V. 22. № 1/2. P. 269–285.

Поступила в редакцию 20.07.2023

Принята к публикации 03.08.2023