

Санкт-Петербургский Государственный Университет

ПАМПУР Данил

Выпускная квалификационная работа

**Влияние фуллеренола C₆₀ на функциональную устойчивость почвы и растений к
избытку меди**

Уровень образования: бакалавриат

Направление 06.03.02. «Почвоведение»

Основная образовательная программа СВ.5022 «Почвоведение»

Научный руководитель:
доцент кафедры агрохимии
биологического ф-та СПбГУ
к.б.н.
Якконен Кирилл Леонидович

Рецензент:
старший научный сотрудник
СПб ФИЦ РАН
к.б.н.
Маячкина Наталья Викторовна

Санкт-Петербург

2023 год

Содержание

Введение.....	3
1. Медь в почвах и растениях.....	5
1.1. Формы и содержание меди в почвах.....	5
1.2. Загрязнение почвы медью.....	6
1.3. Физиологические функции меди в растениях	9
1.4. Токсическое действие меди на растения	11
2. Характеристика фуллеренов и его производных (фуллеренола C ₆₀).....	14
2.1. Действие фуллеренола на почву.....	14
2.2. Действие фуллеренола на растения	15
3. Материалы и методы	19
3.1. Материалы	19
3.2. Методы.....	19
3.2.1. Выращивание растений.....	19
3.2.2. Анализы растений.....	20
3.2.3. Анализы почвы	21
3.2.4. Статистический анализ	21
4. Результаты и обсуждения	22
4.1. Влияние фуллеренола на рост и развитие растений огурца при избытке меди.....	22
4.2. Влияние наночастиц фуллеренола на поступление элементов минерального питания в растениях огурца при избытке меди	24
4.3. Влияние наночастиц фуллеренола на концентрацию меди в питательных растворах.....	31
4.4. Влияние наночастиц фуллеренола на токсическое действие меди в почве.....	32
Заключение.....	35
Выводы.....	36
Список литературы	37

Исследования проведены с использованием оборудования ресурсного центра «Методы анализа состава вещества» научного парка СПбГУ.

Введение

Медь является жизненно важным микроэлементом, необходимым для роста и развития растений, который выполняет множество функций и участвует в важнейших метаболических процессах (Marschner, 1995). Большинство функций, которые выполняет медь, связано с ее участием в ферментативных окислительно-восстановительных реакциях (Sandman, Böger, 1983). Медьсодержащие ферменты участвуют в процессах фотосинтеза, транспорта электронов, формировании клеточных стенок, защитных реакций и т.д. (Marschner, 1997).

Хотя медь и является необходимым химическим элементом для роста и развития растений, избыточные концентрации данного микроэлемента могут оказывать негативное воздействие на функционирование основных систем организма растения, вызывая хлороз, замедление роста и препятствие поглощению других микроэлементов (Иванова, 2011). Избыточные концентрации меди достигаются в основном за счет загрязнения, вызванного деятельностью человека (Яровенко, 2009). Медь входит в состав различных удобрений, пестицидов и фунгицидов, избыточное использование которых может привести к загрязнению почвы и негативному влиянию на плодородие и качество почвы, растения и сообщества почвенных микроорганизмов, что впоследствии снижает урожай (Зырин, 1985). Негативному воздействию также подвергаются почвы вблизи металлургических и металлодобывающих предприятий, а также в окрестностях энергетической инфраструктуры (Яровенко, 2009).

Для эффективного противодействия токсических эффектам, вызванных накоплением в среде поллютантов, необходимы исследования и разработка новых и экономически оправданных средств. Одним из наиболее перспективных направлений для исследований по разработке решений для этой проблемы являются нанотехнологии.

На данный момент проводятся исследования на предмет увеличения урожайности и защиты растений от негативных факторов с помощью применения различных наноматериалов (Wang et al., 2016; Zaytseva, Neumann, 2016). В их число входят и углеродные наночастицы, которые за счет своих малых размеров и уникальных физико-химических свойств имеют перспективы применения в сельском хозяйстве.

Среди углеродных наночастиц выделяется фуллеренол C_{60} – водорастворимая форма фуллерена, полученная с помощью гидроксирования (Krotto et al., 1985; Ruoff et al., 1993). Было показано, что фуллеренол C_{60} увеличивает биомассу, количество плодов и содержания фитопрепаратов в горькой дыне (*Momordica charantia*) (Kole et al. 2013). Также зафиксирована способность наночастиц фуллеренола противостоять различным стрессовым факторам, таким как УФ-В излучение и солевой стресс (Panova, 2016).

Фуллеренол стимулировал удлинение гипокотыля у растения арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) и корней у ржи (*Hordeum vulgare*) (Gao et al. 2011; Panova, 2016). Однако сведения, об использовании фуллеренола для снижения негативных последствий тяжелых металлов на растения и почвы немногочисленны и противоречивы.

Данная работа проводилась для изучения влияния фуллеренола C₆₀ на растения при избытке меди и оценки перспектив применения данной углеродной наночастицы в дальнейшем.

Цель работы – изучить влияние фуллеренола C₆₀ на функциональную устойчивость почвы и растений к избытку меди.

Задачи работы:

1. Охарактеризовать токсические эффекты избытка меди на растения огурца.
2. Оценить влияние фуллеренола C₆₀ на устойчивость растений огурца к избытку меди в среде.
3. Изучить действие фуллеренола C₆₀ на нитрификационную способность и дегидрогеназную активность почвы при избытке меди.

1. Медь в почвах и растениях

1.1. Формы и содержание меди в почвах

Медь содержится в земной коре в сравнительно небольших концентрациях – около 20 мг/кг. Наиболее богатыми источниками меди являются основные эффузивные горные породы, меньшее ее количество содержится в кислых интрузивных горных породах. Также в незначительных количествах медь содержится в осадочных горных породах, известняках, доломитах, песках и валунных суглинках. В составе этих горных пород медь является компонентом множества минералов, в основном первичных. Среди наиболее распространенных первичных минералов, образованных медью – сульфиды, как простые, так и сложные. Эти минералы вовлекаются в процессы почвообразования вследствие выветривания особенно в условиях кислой реакции среды и являются источниками ионов меди в почве (Добровольский, 2003).

В почвах содержатся различные формы меди, среди которых присутствуют водорастворимые, обменные, труднорастворимые медные соли, медьсодержащие минералы, а также комплексные органические соединения. Наиболее распространенной формой меди, преобладающей по своему содержанию относительно других форм, является двухвалентный катион Cu^{2+} , однако, встречаются другие формы, в числе которых отмечается и анионная (Виноградова, 1957).

Помимо низкой концентрации, медь также является одним из наименее подвижных микроэлементов в почве. Попадая в почву, ионы меди так или иначе адсорбируются ее минеральной частью. Практически всем содержащимся в почве минералам свойственна способность адсорбировать ионы меди. Адсорбция зависит от реакции среды, от которой зависит заряд поверхности адсорбента. Наиболее выражена эта способность у оксидов марганца и железа, глинистых минералов и аморфных гидроксидов железа и алюминия. Растворимость большинства как катионных, так и анионных форм меди напрямую зависит от реакции среды. Было выявлено, что концентрация извлекаемой ДТПА меди из почвы обратно пропорциональна значениям pH среды (Кабата-Пендиас, 1989).

Помимо адсорбции, ионы меди образуют различные растворимые и нерастворимые комплексы с органическими веществами, в том числе и с гуминовыми веществами почвы. На растворимость этих комплексов влияют как содержание и параметры органических соединений, так и сами условия комплексообразования (Орлов, 1960). Учитывая высокую комплексообразующую способность меди, среди растворимых форм преобладают именно комплексы меди, как правило, с органическими соединениями. Это объясняется в том числе тем, что исследования выявили положительную корреляцию между содержанием

органических форм углерода в почве и количеством экстрагированной с помощью ДТПА меди (Кабата-Пендиас, 1989).

Что касается свойств меди, то, если в литосфере она обладает халькофильными свойствами (Гольдшмит, 1930), в почве роль данного металла иная. В результате анализа меди на предмет химического сродства была отмечена и доказана ее органофильность (McBride, 1989). Это подтверждается, в том числе, высокими значениями константы устойчивости меди со многими органическими лигандами (Лурье, 1979). С учетом ее свойств, медь часто выступает в качестве индикатора нефтяного загрязнения почвы (Нечаева, 2007). В самих же гумусовых горизонтах почв техногенная медь в большей степени содержится в виде комплексов с органическими соединениями, в то время как оксиды (CuO), почти полностью отсутствуют.

Также было выявлено, что сродство меди к различным фазам почвы зависит не столько от их состава, сколько от концентрации самой меди. Экспериментально, на примере чернозема, было установлено, что при низких концентрациях медь в основном связывается с органическим веществом почвы, образуя комплексы, в то время как при ее избытке, помимо комплексообразования, в большей степени происходит адсорбция меди минеральной частью, в частности оксидами железа и марганца (Пампура и др., 1993).

Для растений наиболее доступными соединениями меди являются водорастворимые и обменно-сорбированные почвой. По содержанию подвижных форм, наименее богатыми являются торфянистые и дерново-подзолистые почвы. Подвижные формы меди в них содержатся в диапазоне от 0,05 до 5 мг/кг. В почвах более засушливого климата, таких как черноземы или каштановые почвы, значения содержания подвижных соединений меди варьируют в среднем в пределах 4-14 мг/кг (Протасова, 2003).

1.2. Загрязнение почвы медью

Медь является природным элементом земной коры и играет важную роль во многих биологических процессах. Основная масса меди, как и тяжелых металлов в целом, формируются за счет их содержания в почвообразующей породе (Лукашев, 1970). Притом естественные источники редко вызывают загрязнение почвы. Однако деятельность человека, такая как добыча полезных ископаемых, промышленные процессы и сельскохозяйственная деятельность, может привести к выбросу большого количества меди в окружающую среду, что приводит к загрязнению почвы. Предельно допустимая концентрация валовой формы меди равна 33, 66 и 132 мг/кг для песчаных и супесчаных, кислых суглинистых и глинистых ($pH_{KCl} < 5,5$), нейтральных и близких к нейтральным суглинистых и глинистых ($pH_{KCl} > 5,5$) почв соответственно. Содержание подвижных форм

превышает ПДК при значениях выше 3 мг/кг (СанПиН 1.2.3685-21). Загрязнение почвы медью стало глобальной проблемой из-за его негативного воздействия на физические и химические свойства почвы, рост растений и здоровье человека. Поэтому крайне важно понять источники и механизмы загрязнения почвы медью для разработки эффективных стратегий его предотвращения и восстановления.

Загрязнение почвы медью стало серьезной экологической проблемой из-за ее потенциального воздействия на рост растений и здоровье человека. Оно может происходить как из естественных, так и из антропогенных источников. Природные источники меди в почве включают выветривание медьсодержащих минералов, извержения вулканов и эрозию. Однако основной причиной загрязнения почвы медью является человеческая деятельность.

Одними из основных загрязнителей являются отрасли энергетики и металлургии, в том числе связанные с ними предприятия по добыче углеводородного сырья и переработки рудосодержащих горных пород. Сжигание различных типов горючего, таких как уголь, горючие сланцы или нефть, вызывают даже большее загрязнение, чем, непосредственно, металлургическое производство, являясь при этом преимущественным его источником (Яровенко, 2009). Ежегодно сжигается до 5 миллиардов тонн ископаемого топлива. В угольной золе и нефти можно найти почти все металлы, иногда в концентрациях, которые могли бы оправдать экономическую целесообразность их извлечения оттуда. Масштабы использования ископаемого топлива велики настолько, что сжигание, в частности, угля, горючего сланца и нефти является основным источником загрязнения, более интенсивным, чем металлургическое производство. Учитывая, что на сегодняшний день добыто более 130 млрд тонн угля и 40 млрд тонн нефти, вместе с золой на поверхность земли вынесены миллионы тонн металлов, значительная часть которых накапливается в верхних горизонтах почвы.

Помимо сжигания, значительную роль в выбросах тяжелых металлов на поверхность является и добыча ископаемого топлива. При бурении нефтяных скважин для добычи самой нефти и газа с пластовыми водами и шламами на поверхность почвы выносятся значительное количество тяжелых металлов.

Агропромышленный комплекс также играет свою роль в загрязнении почвы тяжелыми металлами. Медьсодержащие пестициды, фунгициды и удобрения, обычно используемые в сельском хозяйстве, также могут способствовать загрязнению почвы медью в результате стока и выщелачивания (Зырин, 1985). Чрезмерное использование и неправильная утилизация этих химикатов может привести к высокому уровню меди в почве, что может иметь негативные последствия для плодородия почвы и роста растений.

Применение навоза и осадка сточных вод, которые содержат медь из кормов для животных и отходов жизнедеятельности человека, также может увеличить содержание меди в почве.

Одним из основных последствий загрязнения медью является нарушение микробных сообществ почвы. Медь обладает антимикробными свойствами и может подавлять рост полезных почвенных бактерий, грибов, дождевых червей и других беспозвоночных. Эти организмы играют решающую роль в круговороте питательных веществ, разложении органических веществ и формировании структуры почвы, и их потеря может привести к серьезным экологическим последствиям.

Сток с загрязненной почвы может попадать в близлежащие водоемы и приводить к токсичному воздействию на водные организмы и снижению биоразнообразия. (Бахнов, 1971).

При избытке меди в почве, ухудшаются многие ее химические и физические свойства. Загрязнение меди способствует уменьшению числа микроагрегатов и снижается их водопрочность, что, в свою очередь, приводит к ухудшению почвенной структуры, повышая вероятность эрозии, и приводит к переуплотнению. Также при увеличении концентрации меди изменяется соотношение гумусовых кислот, происходит смена типа гумуса в сторону фульватного за счет возрастания объема фульвокислот (Кононова, 1963). Негативное воздействие избытка меди в почве проявляется, в том числе, в уменьшении числа обменных катионов (Добровольский, 1997).

Помимо экологических последствий, загрязнение медью также может иметь экономические последствия. Снижение плодородия почвы и урожайности сельскохозяйственных культур может оказать существенное влияние на продуктивность сельского хозяйства, что приведет к снижению доходов фермеров и повышению цен на продукты питания для потребителей. Усилия по восстановлению почвы также могут быть дорогостоящими и трудоемкими, особенно в случаях сильного загрязнения.

В целом, загрязнение почвы медью может иметь значительные и долгосрочные последствия для здоровья почвы, растительных и животных сообществ и благополучия человека. Поэтому важно предпринять шаги для предотвращения и смягчения загрязнения медью, а также для продвижения устойчивых методов, обеспечивающих здоровье и продуктивность почвы для будущих поколений.

1.3. Физиологические функции меди в растениях

Медь, необходимый микроэлемент для роста и развития растений. В физиологических условиях медь присутствует в различных состояниях: условно устойчивом окисленном Cu^{2+} и в состоянии нестабильном восстановленном Cu^+ . Медь является органофильным химическим элементом и способна образовывать комплексы с органическими соединениями (Yruela, 2009).

В высших растениях содержание меди относительно невысокое, в пределах 1-20 мг/кг сухой массы (Бойченко, 1976). Из них большая часть, до 99%, содержится в форме комплексов, в то время как содержание свободных ионов крайне низко. Что касается частей растения, то высоким содержанием меди характеризуются листья, где более половины ее находится в хлоропластах, из которых более 50% связано с пластоцианином. В корнях же медь в основном малоподвижна и связана с клеточными стенками. Много меди также содержится в семенах растений. Во флоэме и ксилеме концентрация меди колеблется в диапазоне от крайне низких до 140 мкмоль/л. Медь проявляет в большей степени сродство к аминокислотам, нежели к органическим кислотам.

Медь является кофактором ряда ферментов, принимает участия в процессах фотосинтеза и дыхания, в защите растений от окислительного стресса. Также медь участвует в метаболизме клеточных стенок и восприятии этиленового сигнала и биогенеза молибденового кофактора (Cohn, Pilon, 2010).

Медь как микроэлемент участвует во множестве ферментативных окислительно-восстановительных реакций в составе нескольких групп белков, к которым относятся: белки голубой окраски, которые не обладают оксидазной активностью, участвуют в передаче электронов – пластоцианин; белки, участвующие в окислении монофенолов до дифенолов; белки, содержащие как минимум 4 атома меди в каждой молекуле, обладающие оксидазной активностью – аскорбатоксидаза, дифенолоксидаза (Yadav, 2010).

К важнейшим ферментам, имеющим в своем составе медь, относятся пластоцианин, полифенолоксидаза, супероксиддисмутаза, аскорбатоксидаза и цитохромоксидаза (Yruela, 2009).

Более половины всей меди, содержащейся в хлоропластах, связано с пластоцианином. Данный белок имеет голубую окраску и содержит один атом меди в молекуле. Медь располагается в тетраэдрической конфигурации, связываясь двумя молекулами гистидина, одной молекулой цистеина и одной молекулой метионина. Доля пластоцианина среди всех молекул хлорофилла составляет около 0,3-0,4%. Пластоцианин осуществляет функции цитохром *f*-ФС I-оксидоредуктазы; в связи с этим в условиях Cu-дефицита активность ФС I снижается значительно больше, чем активность ФС II (Yruela, 2009).

Функцию катализации переноса электронов от таких фенолов, как гидрохинон, пирокатехин и пирогаллол на молекулярный кислород выполняет фермент полифенолоксидаза. Данный фермент вовлечен в биосинтез множества соединений, формирующихся при повреждении растительных тканей. К ним относятся алкалоиды, лигнин, меланины. Эти вещества также имеют способность ингибировать прорастание спор грибов и их рост. Содержание меди коррелирует с накоплением в растениях фенолов, меланинов и меланиноподобных веществ. При нехватке меди, их содержание снижается, так как снижается полифенолоксидазная активность, что также может быть одной из причин нарушения цветения растений (Maathius, 2013).

Функцию оксидазы митохондриальной электрон-транспортной цепи выполняет цитохромоксидаза. Фермент имеет в составе два атома меди и два атома железа в гемовой конфигурации. В данном ферменте медь выполняет функцию транспорта электрона от цитохрома к биядерному центру, где затем происходит связывание и восстановление кислорода. При недостатке меди снижается также и цитохромоксидазная активность (Yruela, 2009).

Важную роль в детоксикации супероксидного радикала играет фермент, также имеющий в своем составе медь, супероксиддисмутаза. Одна молекула фермента содержит один атом меди и один атом цинка, связанных гистидином.

Одним из важных показателей обеспеченности растений медью, а также катализатором окисления аскорбиновой кислоты то дегидроаскорбиновой является аскорбатоксидаза (Nagajyoti et al., 2010). Она локализуется в клеточных стенках и цитоплазме растительных клеток. Фермент имеет в своем составе 4 атома меди на одну молекулу, выполняющих функцию восстановления кислорода до воды. Аскорбатоксидаза работает самостоятельно в качестве терминальной дыхательной оксидазы или комбинируясь с полифенолоксидазой, используя как акцептор электронов молекулярный кислород (Yruela, 2009).

Функцию катализатора окислительного дезаминирования аминов выполняет аминоксидаза (Nagajyoti et al., 2010). Cu-изоформа фермента имеет в своем составе медь и принимает участие в защитных реакциях растений, а также в процессах лигнификации и отложения суберина при создании пробковой ткани. Медь в ферменте связана с тремя остатками гистидина и двумя молекулами воды, а сам он главным образом локализуется в апопласте эпидермиса и ксилемы злерых растительных тканей. При работе фермента в реакция окислительного дезаминирования аминов высвобождается перекис водорода – субстрат для пероксидазы при процессах суберинизации и лигнификации. В условиях дефицита меди активность фермента снижается (Demirevska-Kerova et al., 2013).

При загрязнении почвы медью также может проявляться прямое токсическое воздействие на рост растений. Ионы меди могут накапливаться в тканях растений, препятствуя поглощению и транспорту питательных веществ и ингибируя фотосинтез (Иванова, 2011). Это может привести к задержке роста, хлорозу (пожелтению листьев) и даже гибели растения, снижается урожайность сельскохозяйственных культур (Ратников, 2007). Кроме того, медь может поглощаться растениями и попадать в пищевую цепь, создавая потенциальный риск для здоровья людей и животных. Медь также может накапливаться в тканях животных, которые питаются зараженными растениями, что может привести к проблемам со здоровьем как у животных, так и у людей, которые их потребляют.

1.4. Токсическое действие меди на растения

За последние годы проводилось большое количество различных исследований на влияние тяжелых металлов на отдельные физиологические функции растений. Многие из тяжелых металлов являются необходимыми для функционирования растения как организма, участвуя в метаболизме, росте и развитии, являясь компонентом различных ферментов. Активно участвуя в метаболизме, тяжелые металлы проявляют крайне токсическое воздействие на растения при их избытке (Ильин, 1991). В частности, медь, будучи одним из самых токсичных тяжелых металлов, входит в состав пластоцианина, который участвует в фотосинтезе, и других белков, и окислительных ферментов, содержащих медь. Она также повышает засухо-, морозо- и жароустойчивость у растений (Школьник, 1974). Тем не менее, медь находится в довольно узком диапазоне концентраций, при котором она не проявляет своего токсического действия.

Для многих видов растений существует так называемое "окно незаменимости", которое означает оптимальный диапазон концентраций, при которых организм может выживать. Концентрации меньше оптимальной могут вызвать симптомы недостаточности, а превышающие концентрации – токсические эффекты (Hopkin, 1991). Симптомы недостаточности наблюдаются в случаях, когда меди недостаточно для нормального функционирования ферментов. Для растений концентрации в почве меди менее 5 мг/кг часто считают недостаточными (Scheinberg, 1991). Дефицит особенно выражен в торфяной и унавоженной почвах, где слишком мало меди находится в доступной гидратной форме.

В почвах медь обнаруживается в нескольких формах, среди которых свободный гидрат-ион $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ является наиболее биодоступным и токсичным. Некоторые медьсодержащие липофильные органические соединения легко доступны для почвенных организмов и в результате высокотоксичны (Baker, 1990).

Токсическое действие меди в избыточных концентрациях отражается в снижении биомассы растений, уменьшении обводненности тканей и содержания хлорофилла; ингибируется поглощение ионов других металлов, например, железа, и их транслокация по растению (Иванова, 2011). Также высокие концентрации меди приводят к развитию металлотоксикозов, в числе которых хлороз, некроз и ингибирование роста корней и побегов, ингибирование активности рубиско, перекисное окисление липидов мембран, затруднение всасывания Fe и других микроэлементов, которые могут привести к гибели растения. Эти пороговые значения отличаются для различных культур и лежат в диапазоне 5-35 мг/кг (Thakur et al, 2022).

Токсическое действие меди зависит от доступности ее растениям, что, в свою очередь, обусловлено свойствами почвы. К ним относятся адсорбционная способность и реакция среды почвы. Так, на почвах легкого гранулометрического состава с кислой реакцией среды содержание меди в диапазоне 5-7 мг/кг может иметь негативное влияние на развитие растений, в то время как при содержании 75 мг/кг на торфяных почвах медь не имеет такого эффекта (Ратников, 2005). Токсичность меди также может зависеть от присутствия других металлов, таких как кобальт, цинк, кадмий, селен и железо. Селен, например, снижает токсичность меди (Balsberg-Pahlsson, 1989).

В районах, где не происходит загрязнение тяжелыми металлами, содержание меди в растениях колеблется в диапазоне от 1 до 30 мг/кг сухой массы, причем содержание выше 20 мг/кг считается пороговым, которое определяет область нормального и избыточного содержания (Бойченко, 1976). В надземной части растения содержание меди составляет в среднем 5-10 мг/кг и редко превышает 30 мг/кг в расчете на сухую массу.

Механизмы адаптации растений к токсическому действию Cu основаны на функционировании общих и специализированных механизмов устойчивости. К ним относятся избегание, иммобилизация, исключение, выделение и ферментативные изменения (Tyler et al., 1989).

Механизм избегания основан на перераспределении биомассы корней – растения избегают отравления с помощью перемещения корней из загрязненной поверхностной толщи в более глубокие слои почвы.

При механизме исключения растениями осуществляется селективное поглощение питательных веществ из субстрата с избыточным содержанием меди. Происходит ограничение поступления металла в побег путем его накопления в корнях.

Иммобилизация подразумевает преобразование меди в безопасную для растений форму. Это происходит за счет лигандов клеточных стенок, синтеза

комплексообразователей (органических кислот, фитина, металлотioneинов и фитохелатинов и т.д.) и внутриклеточной компартментации (Yadav, 2010).

Одним из способов борьбы с избытком меди является выделение, которое производится несколькими способами: испарение с поверхности растения, вывод избытков за пределы клеток с участием АТФаз у Cu-толерантных растений, вымывание дождем с поверхности побега.

Повышение устойчивости клеточной плазмы путем ферментативных изменений является одним из механизмов толерантности растений к избытку микроэлементов. Избыток меди способствует изменению структуры некоторых форм пероксидаз и СОД и появлению в корнях двух новых катионных и двух новых анионных форм пероксидаз. Предполагается, что ферментативные изменения включают в себя процессы, связанные с усилением синтеза чувствительных к тяжелым металлам ферментов или изменением их свойств (Tyler et al., 1989).

2. Характеристика фуллеренов и его производных (фуллеренола C₆₀)

2.1. Действие фуллеренола на почву

Фуллерены это замкнутые наноструктуры на основе углерода. Основной молекулой для фуллеренов считается C₆₀, так как она наиболее симметрична, и, как следствие, наиболее стабильна. 60 атомов углерода, в свою очередь, организованы в сферическую форму, с эффективным диаметром 67 нм. Структура этой сферы образована 20 правильными шестиугольниками и 12 правильными пятиугольниками с атомами углерода в вершинах на сферической поверхности частицы (Krotto et al., 1985, b).

Реакционная способность молекул фуллеренов характеризуется возможностью присоединять множество различных субстратов. Акцепторная способность фуллеренов позволяет присоединять до 12 электронов, что является очень полезным свойством и привлекает внимание исследователей (Караулова и др., 1999). Различные модификации фуллерена приводят даже к возникновению магнитных свойств, что было продемонстрировано в 2001 году с помощью полимеризации молекулы фуллерена (Makarova et al., 2001).

Так как сам по себе фуллерен является нерастворимым в воде, а для многих целей и задач это необходимо, исходная молекула C₆₀ может быть гидроксильрована (Ruoff et al., 1993). Полученное в результате соединение называется фуллеренол. Растворимость в воде в результате будет тем выше, чем больше гидроксильных групп были присоединены.

Также, наряду с гидроксильрованием, гидрофильное соединение с фуллереном можно получить с помощью получения его аддукта с аминокислотами, аминсахарами или гидроксиламином. Фуллерен содержит 30 слабосопряженных двойных связей и проявляет свойства электронодефицитного полиолефина. Основными реакциями по двойной связи для фуллерена будут реакции нуклеофильного и радикального присоединения (Юровская, 2000). В данном случае гидрофильные группы вводятся в ядро фуллерена, что делает его растворение в водной среде приемлемым для потенциально возможного его использования.

Помимо фуллеренола, существуют другие модификации, например, полученные путем гидрирования, галогенирования и окисления, однако, эти соединения на настоящий момент являются предметом интереса, по большей части, исследователей в области химии фуллеренов. Для исследований в области земледелия в основном применяется фуллеренол и в меньшей степени углеродные нанотрубки.

Фуллеренол является водорастворимым производным фуллерена, который широко изучался на предмет его потенциального применения в биомедицинских исследованиях, доставке лекарств и восстановлении окружающей среды. Проводились опыты,

направленные на изучение свойств фуллеренола в различных условиях и средах при выращивании растений, в том числе и почвенные опыты (Панова и др., 2022; Панова и др., 2018).

В некоторых исследованиях рассматривали фуллеренол в качестве потенциально возможного решения проблем, связанных с распространением в почвенной среде ряда микроорганизмов-возбудителей таких заболеваний как сосудистый бактериоз, фузариоз, корневая гниль, темно-бурая пятнистость (Панова, 2022). Фуллеренол в данном опыте не проявил бактерицидных, фунгицидных, бактериостатических или фунгистатических свойств. Однако было выявлено, на основе анализа почвы, что при внесении производных фуллерена C₆₀ в почву происходит ее обогащение фосфором, калием и азотом, что было вызвано увеличением доли подвижных форм макроэлементов. Этот эффект отражался и на самих растениях, где содержание макро- и микроэлементов увеличивалось. Помимо этого, был отмечен эффект повышения устойчивости растений ярового ячменя к эпифитотиям, а также существенное повышение эффективности применения химических фунгицидов в половинных дозах до уровня, близкого к эффектам от полной дозировки. Показано регуляторное воздействие на численный состав и активность микроорганизмов различных таксономических и эколого-трофических групп (Панова и др., 2022).

Воздействие фуллеренола на почву еще мало изучено, количество проведенных в этой сфере опытов на данный момент не позволяет сделать однозначных выводов о возможностях фуллеренола и оценить риски его применения, однако, имеющиеся данные говорят о перспективах и необходимости дальнейшего исследования.

2.2. Действие фуллеренола на растения

Углеродные ядра производных фуллерена обладают высокой липофильностью, что способствует их проникновению через биомембраны (Пиотровский, 2007; Andreev et al., 2008). Наноразмеры предполагают стерическое соответствие биомолекулам, а облако π-электронов на поверхности – участие в свободнорадикальных реакциях, которые могут быть разной направленности. в зависимости от концентрации фуллеренолов, самого объекта и условий окружающей среды (Gao et al., 2011; Zhao et al., 2012).

Механизмы и особенности влияния фуллеренола на растения в агро- и экосистемах практически не изучены, так как эти исследования только начинают активно развиваться (Корнев и др., 2013; Panova et al., 2016). В результате уже имеющихся опытов были выявлены как негативные, так и позитивные эффекты. Среди негативных эффектов было отмечено ингибирование роста, в то время как среди позитивных, наоборот, была выявлена стимуляция роста, развития и продуктивности. Так, например, фуллеренол повреждал

клетки лука (Chen et al., 2010), но, в то же время, способствовал ускорению роста гипокотыля арабидопсиса и увеличению плотности культуры зеленой водоросли *Pseudokirchneriella subcapitata* (Gao et al., 2011). Результатом обработки семян горькой дыни раствором полиоксигидроксилированного фуллерена было увеличение биомассы растений на 54 %, урожайности – на 128 %, содержания питательных веществ – на 90 % (Kole et al., 2013). Позитивный эффект фуллеренола на растения предположительно связан со способностью углеродной наночастицы связывать активные формы кислорода, то есть с проявлением антиоксидантной активности (Gharbi et al., 2005; Yin et al., 2009).

Также у фуллеренола C₆₀ была выявлена способность предотвращения развития окислительного стресса в корнях и их субапикальное утолщение под воздействием ультрафиолетового облучения проростков зерновых культур, что происходит за счет снижения содержания активных форм кислорода.

Как уже было сказано ранее, фуллеренол имеет свойство, в силу своей липофильности, проникать через биомембраны – мембраны растительного и животного происхождения, также фуллеренол способен проникать через мембраны и в нейтральной форме после протонирования (Andreev et al., 2008). На примере проростков редьки (*Raphanus sativus* L.) и пшеницы (*Triticum aestivum* L.) было показано, что поглощение растениями фуллеренола зависит от их концентрации в корнеобитаемом слое, причем их накопление происходило в основном в корнях (Avanasi et al., 2014; Wang et al., 2016).

Увеличение биомассы и устойчивости растений к окислительному стрессу после внесения полигидроксилированного фуллерена в корнеобитаемый слой или внекорневой обработки связано с изменениями в эффективности и структуре фотосинтетического аппарата, а также с влиянием на системы антиоксидантной защиты, то есть на интенсивность перекисного окисления липидов, генерацию активных форм кислорода и активность супероксиддисмутазы (Панова и др, 2018).

Результаты одного из исследований с использованием фуллеренола подтвердили, что присутствие наночастиц в корневой среде повлияло на формирование листьев более крупного размера с более высокими показателями содержания хлорофиллов и более низким содержанием антоцианов. Функциональный потенциал фотосинтетического аппарата под влиянием фуллеренола превышал таковой у растений в контрольном варианте, что повлияло в итоге на увеличение чистой продуктивности (Панова и др., 2018). Уменьшение содержания антоцианов и более высокие темпы роста свидетельствует о том, что эффект от различных абиотических стрессоров в виде засухи, дефицита азота или ультрафиолета, которые обычно индуцируют синтез антоцианов, был уменьшен при внесении фуллеренола, что, в свою очередь, свидетельствует об улучшении физиологического

состояния растений. Фуллеренол воздействуя на растения способствовал удлинению корней, увеличению высоты растений и количеству стеблей и, как следствие, увеличению биомассы растений и их органов (Панова, 2018).

Одно из исследований, проведенное с использованием фуллеренола, показывает то, какие перспективы может иметь внедрение этой углеродной наночастицы на минеральное питание растений. В данной работе было рассмотрено влияние фуллеренола на дефицит железа в растениях огурца (*Cucumis sativus*), выращенных на гидропонике. Мелиоративное действие фуллеренола в данной работе подтверждается значительным увеличением параметров флуоресценции в листьях, а именно максимальной эффективности и скорости транспорта электронов. Увеличение значений этих параметров свидетельствует об активизации реакционных центров фотосистемы II в растениях, испытывающих дефицит железа. Опыт продемонстрировал способность фуллеренола защищать растения, в частности, огурца, от дефицита железа благодаря увеличению его содержания в апопласте корней растений (Bityutskii et al., 2021a). На примере растения кукурузы (*Zea mays*) было также показано, что фуллеренол способен снижать степень выраженности хлороза и увеличению содержания хлорофилла у листьев в условиях дефицита железа (Bityutskii et al., 2022a).

К стрессовым факторам, с которыми углеродные наночастицы помогают справляться, относится и токсичное содержание тяжелых металлов. В исследовании на примере риса, высаженного на сельскохозяйственной почве, была продемонстрирована способность фуллеренола C₆₀ снижать содержание кадмия в растении при его избытке в среде (Chuanzhou et al., 2018). В опыте с кукурузой (*Zea mays*) при избытке меди проводились параллельные исследования с внесением углеродных нанотрубок и других углеродных наночастиц. Исследование показало положительные эффекты в виде улучшения роста растений и снижения стресса от избытка меди. Увеличивался процент всхожести семян, их скорость прорастания, а также содержание антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, пероксидаза и каталаза) (Xin et al., 2022).

Исследования также показывают, что обработка фуллеренолом способна облегчать симптомы нехватки микроэлементов, в частности, цинка, такие как пониженное содержание хлорофилла в листьях, уровень перекисного окисления липидов и замедление роста побегов. Внесение наночастиц имело положительный эффект на транслокацию цинка в ксилеме и листе, что могло быть вызвано увеличением мобилизации цинка в тканях растений, что и позволяет снизить стрессовое воздействие дефицита цинка. Также отсутствовал какой-либо эффект от внесения фуллеренола на растения с отсутствием

дефицита данного микроэлемента, что позволяет делать вывод о безопасности его использования и перспективах применения (Bityutskii et al., 2022b).

Помимо снижения влияния стрессовых факторов на рост и развитие растений, наночастицы полигидроксилированного фуллерена показывали способность участия в метаболических процессах растений. В данном опыте, проведенном на растении огурца (*Cucumis sativus L.*), выращенном на гидропонике, исследовалось влияние фуллеренола C₆₀ на метаболические реакции в растении в зависимости от формы содержания железа в среде (Fe³⁺ или Fe²⁺). При питании трехвалентным железом внесение наночастиц способствовало активации метаболизма углеводов и аминокислот, при питании двухвалентным – метаболизм липофильных соединений и подавление метаболизма аминокислот и углеводов. Метаболические нарушения у растений, обработанных Fe³⁺, индуцированные фуллеренолом, были противоположны таковым у растений, обработанных Fe²⁺, что позволяет предположить, что состояние источников Fe важно для перепрограммирования ответов метаболома огурца на фуллеренол. Это исследование не только показывает новое понимание метаболических нарушений, вызванных фуллеренолом, но также предоставляет важные данные о метаболитах, связанных с гомеостазом железа, для будущих исследований (Bityutskii et al., 2021b).

3. Материалы и методы

3.1. Материалы

Объект исследования – огурец (*Cucumis sativus L.*), сорта «Феникс». Семена получены на Крымской опытно-селекционной станции Всероссийского научно-исследовательского института генетических ресурсов растений.

Использованные в опыте наночастицы – фуллеренол C₆₀. Данный наноматериал был предоставлен сотрудником Первого Петербургского Медицинского университета имени И.П. Павлова К.Н. Семеновым.

Для почвенных опытов использовали образцы из гумусового горизонта с глубины 0-15 сантиметров. Образцы были отобраны на территории Ленинградской области, Гатчинского района в поселке Меньково на опытной станции Агрофизического института из агродерново-подзолистой постагрогенной иллювиально-железистой глееватой супесчаной почвы на девонских красноцветных песках.

Таблица 1. Агрохимические показатели почвы

pH _{водн}	pH _{KCl}	N _{орг} , %	P ₂ O ₅ , мг/кг	K ₂ O, мг/кг
5,95	5,55	0,155	141	83

3.2. Методы

3.2.1. Выращивание растений

Для оценки принципиальной возможности проявления фуллеренолом C₆₀ защитного воздействия по отношению к растениям при избытке меди эксперименты проводились в контролируемых условиях с использованием гидропонной системы.

В качестве раствора для гидропоники использовали полный питательный раствор следующего состава: Ca(NO₃)₂ – 2 мМ/л, KCl – 0,1 мМ/л, KH₂PO₄ – 0,1 мМ/л, MgSO₄ – 0,5 мМ/л. Также в раствор вносили микроэлементы: ZnSO₄ – 1 мкМ/л, CuSO₄*5H₂O – 0,5 мкМ/л, Na₂MoO₄*2H₂O – 0,1 мкМ/л, MnSO₄*5H₂O – 1 мкМ/л. Железо добавляли в виде комплекса Fe-ЭДТА – 10 мкМ/л, а бор – в виде H₃BO₃ – 10 мкМ/л (Bityutskii, 2021a). Избыточное содержание меди в растворе создавалось путем внесения 15 мкМ сульфата меди. Наночастицы фуллеренола C₆₀ приготавливали в ультразвуковой ванне и вносили по 2 и 10 мг на литр раствора с pH 6,0. Питательный раствор обновляли каждые 2-3 дня для поддержания постоянной концентрации компонентов.

В первую очередь проводилось замачивание семян огурца в дистиллированной воде при температуре 28°C в течение 96 часов. Затем проростки по 4 штуки высаживали в сосуды с питательным раствором без добавления меди для выращивания в течение 15 суток, также в один вариант были добавлены наночастицы фуллеренола. Предобработку проводили с целью изучения влияния фуллеренола на модификацию клеточных стенок корня и, как следствие, на поступление меди в растения. Через 15 суток растения были пересажены по 2 шт./сосуд на питательные растворы по следующей схеме:

1. Контроль – полный питательный раствор (К).
2. Полный питательный раствор с добавлением 15 мкМ/л Cu.
3. Полный питательный раствор с добавлением 15 мкМ/л Cu, растения предобработаны наночастицами фуллеренола (Cu (F10))
4. Полный питательный раствор с добавлением 15 мкМ/л Cu и 10 мг/л фуллеренола.

Для каждого варианта использовали четырехкратную повторность. Измерения проводили – спустя 1 и 9 суток. Растения, предобработанные наночастицами фуллеренола, измеряли только через сутки.

3.2.2. Анализы растений

Для определения содержания хлорофилла в листьях использовали прибор Konica Minolta SPAD-502, измеряющий показатель SPAD (Soil Plant Analysis Development). Показатель измеряли у различных по возрасту листьев.

Для определения сухой массы органов растения использовали весовой метод. Срезанные листья, стебли и корни были предварительно высушены в термостате при 70°C. Массу определяли на аналитических весах.

Определение концентрации меди в питательном растворе и ксилемном соке растения проводили при помощи атомно-абсорбционного спектрометрического анализа на приборе МГА-915. Ксилемный сок растений отбирали в течение часа с момента срезания стебля на высоте 2 см от начала корня. Ксилемный сок, или пасока, – жидкость, выделяющаяся из среза в основании стеблей или корней растений под действием корневого давления. В пасоке содержатся сахара, органические кислоты, белки, аминокислоты, и ионы минеральных солей.

Для определения содержания макро- и микроэлементов в корнях и побегах образцы минерализовали в азотной кислоте в СВЧ-минерализаторе MDS-10 (Sineo Microwave Chemistry Technology Co., Ltd., Китай), а затем проводили элементный анализ методом оптико-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой на приборе Shimadzu ICPE-9000 (Shimadzu Corp., Япония).

3.2.3. Анализы почвы

Почвенные опыты проводили в пластиковых емкостях в трехкратной повторности для каждого варианта. В каждый сосуд было добавлено по 1 кг почвы. Вносили медь до достижения содержания 200 мг/кг сухой почвы и фуллерен до 20 и 40 мг/кг сухой почвы для разных вариантов соответственно. Влажность почвы поддерживали на уровне 60% от полной влагоемкости на протяжении всего эксперимента.

Спустя сутки, неделю и месяц определяли показатели содержания нитратов в почве и дегидрогеназной активности. Для определения нитрат-иона в почве применялся дисульфифеноловый метод (Практикум..., 2005). Дегидрогеназную активность определяли методом Ленарда с использованием 2,3,5-трифенил-тетразолийхлорида (ТТХ) (Lehnard, 1962; Хазиев, 2005).

3.2.4. Статистический анализ

Для обработки результатов, полученных в процессе измерения различных показателей, как в опытах с растениями, так и в почвенных опытах, использовали программу IBM SPSS Statistics 28. Данные обрабатывали с применением однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с помощью построения общей одномерной линейной модели с стандартного отклонения для каждого варианта и группировки результатов по однородным подмножествам с помощью критерия Стьюдента-Ньюмена-Келса при уровне значимости 95% ($p < 0,05$). Почвенные опыты выполнялись в трехкратной повторности, опыты с растениями в четырехкратной.

4. Результаты и обсуждения

4.1. Влияние фуллеренола на рост и развитие растений огурца при избытке меди

Растения, выращиваемые на питательных растворах с избытком меди, проявляли типичные признаки токсического эффекта, выразившиеся в виде хлороза листьев и снижением биомассы (Thakur et al, 2022). Это подтверждается снижением концентрации хлорофилла в листьях, что сильнее проявляется на более молодых листьях и поздних сроках токсического действия меди (табл. 2).

Таблица 2. Влияние фуллеренола C₆₀ и избытка меди на значения SPAD индекса растений. Приведены средние значения ± стандартное отклонение (SD). Идентичные буквы обозначают отсутствие достоверных различий

Вариант	1 сут	4 сут	9 сут		
	2 н. л.	3 н. л.	2 н. л.	3 н. л.	4 н. л.
К	40±2a	39±1b	39±1a	40±1b	35±4b
Cu15	38±1a	32±1a	37±2a	30±3a	26±2a
Cu + F10	38±2a	37±2b	38±1a	37±2ab	35±2b
Cu (F10)	38±4a	-			

В данной и последующих таблицах используются следующие обозначения для вариантов: К – контроль; Cu15 – вариант с добавлением меди в количестве 15 мкМ/л; Cu + F10 – вариант с добавлением 15 мкМ/л меди и 10 мг/л фуллеренола; Cu(F10) – вариант с предобработкой фуллеренолом в течение 15 суток, без его последующего внесения, и добавлением 15 мкМ/л меди.

Внесение в питательный раствор 15 мкМ меди вызывало снижение концентрации хлорофилла уже на 4 сутки. Так значения SPAD индекса уменьшилось по сравнению с контролем в 1,2 раза на третьем настоящем листе на 4 сутки и в 1,3 раза на третьем и четвертом листе на 9 сутки. Добавление фуллеренола C₆₀ способствовало полному исключению негативного эффекта на содержание хлорофилла от избытка меди.

Помимо хлороза, избыток меди вызывал снижение биомассы растений, что показывают результаты в таблице 3. Избыток меди имел негативное воздействие на сухую массу различных частей растения, которое не проявлялось на первые сутки. Однако, спустя 9 суток наблюдалось снижение массы побегов на 27% и корней на 42% по сравнению с контролем.

Таблица 3. Влияние фуллеренола C₆₀ и Cu на сухую массу побегов и корней огурца. Приведены средние значения ± SD. Идентичные буквы обозначают отсутствие достоверных различий

Вариант	Сухая масса, г			
	1 сут			
	Листья	Стебли	Побеги	Корни
К	432±45a	89±13a	520±52a	142±24a
Cu15	427±22a	83±9a	510±29a	129±9a
Cu (F10)	393±16a	85±7a	478±19a	112±5a
Cu + F10	421±23a	86±6a	507±19a	123±21a
	9 сут			
К	1230±56b	504±34b	1733±63c	523±35c
Cu15	874±97a	404±11a	1278±106a	282±52a
Cu + F10	1169±51b	435±7a	1604±58b	351±35b

Спустя 9 суток масса листьев в варианте с добавлением фуллеренола на фоне избытка меди была сопоставима с контрольным вариантом. На массу стеблей при избытке меди, наночастицы значительного влияния не оказали. Масса корней относительно варианта с избытком меди без добавления фуллеренола стала больше в 1,5 раза, однако, полного исключения токсического воздействия меди на корни выявлено не было.

В результате было выявлено, что наиболее ярко выраженный токсичный эффект медь оказывала на корни, так как они находились в контакте с раствором. Фуллеренол C₆₀ при добавлении в раствор с избытком меди снизил ее влияние – существенно для листьев и примерно в половину для стеблей и корней растения огурца. Это может быть связано с антиоксидантной активностью фуллеренола, снижающей стрессовые реакции растения и перекисное окисление липидов мембран клеток (Gharbi et al., 2005; Yin et al., 2009), уменьшением генерации активных форм кислорода и увеличением активности супероксиддисмутазы (Borišev et al., 2016; Панова и др., 2018).

4.2. Влияние наночастиц фуллеренола на поступление элементов минерального питания в растениях огурца при избытке меди

При добавлении меди в питательный раствор ее концентрация в листьях увеличилась вдвое по сравнению с контролем спустя сутки, и в 7 раз через 9 суток (табл. 4, 5). Содержание меди в листьях увеличилось по сравнению с контролем на 1 и 9 сутки эксперимента в 1,8 и 4,6 раз соответственно (табл. 4, 5). Концентрация и содержание меди в корнях при ее избытке в питательном растворе увеличились более в 30 раз спустя сутки и в 144 раза через 9 суток. Избыток меди уже через сутки вызывал уменьшение концентрации железа (в 1,3 раза), содержания Са и К в листьях, а также концентрацию железа и цинка через 9 суток в 2 и 1,1 раза соответственно. В корнях растений, обработанных происходило снижение концентрации Mn, Са, К, Mg и S (в 1,5-3,5 раза) на 9 сутки (табл. 5, 7) и увеличение концентрации Fe, Zn и P (в 1,2-7,5 раз). Снижение хлорофилла в листьях растений, обработанных медью на фоне снижения поступления железа в листья, говорит об антагонистическом поступлении этих элементов в побег. Увеличение содержания железа в корнях и уменьшение в листьях также связано с эффектом токсикоза от меди – нарушении транслокации микроэлементов. (Иванова, 2011).

Таблица 4. Влияние фуллеренола C₆₀ и избытка меди на концентрацию и содержание микроэлементов в листьях и корнях растений огурца. Приведены средние значения ± SD. Идентичные буквы обозначают отсутствие достоверных различий. (1 сут)

Вариант	Cu	Fe	Mn	Zn
Листья, мкг/г				
К	6,54±0,38a	130,15±7,06b	49,43±4,77b	26,98±2,36b
Cu15	13,07±0,62c	95,92±21,57a	46,03±4,33ab	24,67±2,13ab
Cu (F10)	10,84±0,61b	97,61±19,97a	43,12±3,20ab	22,29±2,96a
Cu + F10	11,22±1,38b	119,50±8,98ab	39,15±4,49a	21,77±1,42a
Листья, мкг/растение				
К	2,93±0,18a	64,35±5,45b	19,85±0,99b	10,78±0,63b
Cu15	5,58±0,39c	41,78±10,77a	19,59±0,99b	10,51±0,66b
Cu (F10)	4,26±0,08b	41,51±4,46a	16,92±0,66a	8,24±0,47a
Cu + F10	4,62±0,39b	42,33±5,69a	16,13±1,57a	8,98±0,42a
Корни, мкг/г				
К	27,40±2,16a	267,02±12,9a	86,53±8,02c	51,17±2,82a
Cu15	927,59±26,81b	507,63±40,73b	38,53±3,09a	62,37±4,23b
Cu (F10)	1360,21±305,49c	570,79±24,87c	36,79±1,34a	69,31±1,88c
Cu + F10	841,30±47,32b	500,51±34,71b	46,27±1,93b	62,61±4,52b
Корни, мкг/растение				
К	3,20±0,14a	32,31±2,80a	12,09±1,08b	6,38±0,05a
Cu15	119,15±6,71c	66,28±7,05b	4,32±0,58a	8,31±0,37b
Cu (F10)	150,98±31,10c	60,85±4,82b	4,28±0,36a	7,78±0,37b
Cu + F10	96,88±10,64b	58,54±4,57b	4,75±0,18a	7,76±0,34b

Предобработка корней растений фуллеренолом перед помещением их в раствор с избытком меди, а также добавление наночастиц в питательный раствор снизили концентрацию и содержание меди в листьях (в 1,2-1,3 раза) уже в первые сутки эксперимента. Такое же снижение концентрации меди в листьях растений в варианте с добавлением фуллеренола по сравнению с необработанными растениями наблюдали через девять суток (табл. 5). Увеличение накопления меди в листьях через 9 суток при добавлении наночастиц фуллеренола происходило из-за увеличения биомассы листьев в этом варианте.

Предобработка растений наночастицами фуллеренола способствовала увеличению концентрации меди в корнях в 1,5 раза, возможно из-за модификации клеточных стенок корней и лучшей сорбции (табл. 4). Т.к. в этом варианте концентрация меди в листьях

снижалась, то сорбция способствовала снижению поступления меди в листья. Фуллеренол, при его добавлении в питательный раствор при избытке меди, способствовал снижению её содержания в корнях на 1 и 9 сутки эксперимента. Наночастицы снижали дисбаланс необходимых микроэлементов в листьях растений при избытке меди. Так содержание Fe, Mn и Zn в листьях огурца увеличилось (1,2-1,6 раза) при добавлении наноматериала в питательный раствор.

Таблица 5. Влияние фуллеренола C₆₀ и избытка меди на концентрацию и содержание микроэлементов в листьях и корнях растений огурца. Приведены средние значения ± SD. Идентичные буквы обозначают отсутствие достоверных различий. (9 сут)

Вариант	Cu	Fe	Mn	Zn
Листья, мкг/г				
К	3,91±0,29a	98,33±6,86c	40,97±2,42a	22,11±0,35a
Cu15	26,85±1,53c	46,64±1,45a	40,92±3,36a	19,56±1,39b
Cu + F10	22,25±1,55b	55,77±4,1b	41,24±1,31a	19,37±0,38b
Листья, мкг/растение				
К	4,98±0,31a	125,06±7,82c	51,58±2,51c	27,95±0,69c
Cu15	22,91±1,36b	41,04±3,59a	35,53±1,87a	18,27±0,79a
Cu + F10	26,91±1,05c	67,98±2,07b	48,18±1,13b	22,08±0,59b
Корни, мкг/г				
К	13,07±1,38a	97,89±15,01a	29,33±4,05a	29,91±2,23a
Cu15	1873,04±114,39b	738,71±86,51c	28,63±1,93a	46,8±2,77c
Cu + F10	1514,34±398,78b	603,38±66,72b	30,11±2,96a	42,75±2,52b
Корни, мкг/растение				
К	7,37±0,36a	50,13±9,69a	15,87±0,47c	15,09±0,58a
Cu15	569,31±76,4c	227,49±39,73c	8,53±0,26a	14,6±1,50a
Cu + F10	399,21±122,38b	178,96±22,88b	11,08±1,06b	13,96±0,25a

Таблица 6. Влияние фуллеренола C₆₀ и избытка меди на концентрацию и содержание макроэлементов в листьях и корнях растений огурца. Приведены средние значения ± SD. Идентичные буквы обозначают отсутствие достоверных различий. (1 сут)

Вариант	Ca	K	Mg	P	S
Листья, мг/г					
K	61,03±1,74b	28,78±2,29a	3,92±0,37b	2,35±0,27a	3,71±0,21a
Cu15	55,37±6,54b	26,94±1,36a	3,67±0,47ab	2,75±0,44a	3,58±0,32a
Cu (F10)	40,62±4,84a	24,67±1,26a	3,24±0,34a	2,36±0,29a	3,10±0,29a
Cu + F10	36,51±2,31a	26,35±2,75a	3,04±0,35ab	2,62±0,12a	3,12±0,38a
Листья, мг/растение					
K	23,48±0,83c	13,13±0,82c	1,59±0,02b	1,10±0,16a	1,52±0,06b
Cu15	20,99±0,52b	11,48±0,24b	1,49±0,12b	1,39±0,23b	1,52±0,08b
Cu (F10)	15,92±1,32a	9,71±0,75a	1,27±0,10a	1,05±0,10a	1,22±0,09a
Cu + F10	15,05±0,36a	10,32±0,38a	1,25±0,12a	1,1±0,08a	1,28±0,10a
Корни, мг/г					
K	5,75±0,08a	77,8±1,98c	1,20±0,03a	5,30±0,16a	3,79±0,28b
Cu15	8,19±0,43b	46,15±1,61a	1,19±0,04a	5,28±0,18a	3,40±0,08a
Cu (F10)	8,31±0,31b	49,05±1,24ab	1,25±0,06ab	5,50±0,23ab	3,30±0,19a
Cu + F10	7,79±0,24b	52,52±3,97b	1,30±0,03b	5,80±0,33b	3,45±0,22a
Корни, мг/растение					
K	0,74±0,06a	10,33±0,93c	188,99±23,96b	0,66±0,02a	0,61±0,06b
Cu15	1,05±0,07c	5,83±0,28a	152,74±9,98a	0,71±0,06a	0,44±0,03a
Cu (F10)	0,96±0,03bc	5,62±0,14a	144,85±6,47a	0,67±0,03a	0,37±0,01a
Cu + F10	0,89±0,09b	7,04±1,04b	144,75±16,97a	0,74±0,04a	0,40±0,04a

Таблица 7. Влияние фуллеренола C₆₀ и избытка меди на концентрацию и содержание макроэлементов в листьях и корнях растений огурца. Приведены средние значения ± SD. Идентичные буквы обозначают отсутствие достоверных различий. (9 сут)

Вариант	Ca	K	Mg	P	S
Листья, мг/г					
K	39,57±3,09a	23,68±0,18a	3,44±0,08a	1,28±0,04a	3,39±0,08a
Cu15	38,52±1,94a	22,95±0,70a	3,34±0,33a	1,82±0,08c	3,46±0,11a
Cu + F10	38,39±3,71a	22,39±0,89a	3,11±0,16a	1,41±0,08b	3,41±0,48a
Листья, мг/растение					
K	48,62±3,53b	30,65±0,94c	4,17±0,15c	1,68±0,07b	4,17±0,26b
Cu15	37,21±1,87a	20,97±0,88a	2,84±0,11a	1,42±0,05a	3,05±0,31a
Cu + F10	50,43±3,79b	25,54±0,82b	3,63±0,19b	1,69±0,11b	4,01±0,59b
Корни, мг/г					
K	3,22±0,07c	55,38±1,36c	4,7±0,15b	2,49±0,15a	6,60±0,17b
Cu15	2,16±0,13a	36,26±0,67a	1,32±0,02a	4,15±0,24c	2,74±0,13a
Cu + F10	2,53±0,10b	40,36±0,84b	1,45±0,03a	3,29±0,18b	2,82±0,07a
Корни, мг/растение					
K	3,29±0,15c	28,68±0,23c	2,38±0,05c	1,27±0,04a	3,45±0,21b
Cu15	2,16±0,13a	10,44±0,7a	0,40±0,03a	1,27±0,14a	0,85±0,03a
Cu + F10	2,53±0,10b	13,57±0,47b	0,51±0,05b	1,13±0,07a	1,02±0,05a

В результате добавления фуллеренола и предобработки спустя сутки в листьях эффект избытка меди проявился сильнее в виде снижения концентрации кальция и магния на 33%. Содержание всех макроэлементов, кроме фосфора в пересчете на сухую массу также снизились на фоне контрольного варианта и варианта с добавлением меди. Эффект увеличения содержания фосфора от избытка меди был нивелирован добавлением фуллеренола.

В корнях внесение наночастиц не повлияло на концентрацию кальция и серы спустя сутки, однако, наблюдалось повышение концентрации калия, фосфора и магния. В случае калия, повышение концентрации говорит о положительном эффекте фуллеренола. Повышение концентрации фосфора и магния происходило на фоне отсутствия эффекта на них избытка меди из-за снижения биомассы. После внесения фуллеренола концентрации данных макроэлементов превысили значения контрольного варианта на 10%. Добавление наночастиц способствовала уменьшению влияния избытка меди на содержания кальция, снизив его содержание в корнях на 10%, в то время как эффект от предобработки был

выражен в меньшей степени. Также, в случае калия, внесение фуллеренола снизило негативный эффект меди и снижение концентрации произошло на 30%, что на 10% меньше, чем в варианте без добавления наночастиц. В случае магния, фосфора и серы, фуллеренол не оказал влияние на концентрацию данных макроэлементов в условиях избытка меди.

Спустя 9 суток в листьях внесение фуллеренола снизило эффект избытка меди на концентрацию фосфора. Если в случае без добавления наночастиц она увеличивалась на 50%, то, в случае с добавлением, только на 10%. На остальные макроэлементы при избытке меди влияния оказано не было. В случае содержания в сухой массе, фуллеренол полностью исключил влияние меди на содержание кальция, фосфора и серы. Также вдвое снизился эффект избытка меди на содержание калия и магния. В случае корней внесение фуллеренола снизило эффект на кальций, калий и фосфор. При пересчете на содержание в сухой массе корней добавление наночастиц снизило эффект от избытка меди на кальций, калий и магний.

Влияние меди на макроэлементы были выражено меньше, чем на микроэлементы по причине больших концентраций. Спустя сутки медь снижала транслокацию кальция из корней, где он начал накапливаться, в листья, где, по сравнению с контрольным вариантом, концентрация кальция была ниже. Тем не менее, фуллеренол снижал воздействие токсичных концентраций меди на растения на позднем сроке, что также может быть связано с его антиоксидантными свойствами (Gharbi et al., 2005; Yin et al., 2009).

Избыток меди в питательном растворе оказывал негативное влияние на скорость выделяемого ксилемного сока, снизив ее в 17 раз спустя сутки и в 3,5 раза спустя 9 суток по сравнению с контрольным вариантом. Добавление фуллеренола способствовало увеличению скорости пасоки в 4 раза относительно варианта с медью спустя сутки и в 2,5 раза спустя 9 суток, тем самым значительно снижая негативное влияние меди на этот показатель.

Таблица 8. Влияние фуллеренола C₆₀ и Cu на массу выделяемого за час ксилемного сока. Приведены средние значения ± SD. Идентичные буквы обозначают отсутствие достоверных различий

Вариант	Скорость поступления ксилемного сока, мг/ч	
	1 сут	9 сут
К	541±22c	516±33c
Cu15	32±7a	145±18a
Cu+F10	132±29b	342±39b
Cu(F10)	114±35b	-

Результаты показывают, что фуллеренол повышает скорость выделения пасоки, следовательно, с добавлением наночастиц меньше выражен эффект снижения корневого давления под воздействием избытка меди. Также более низкая скорость выделения ксилемного сока обусловлена меньшей степенью развитости корневой системы, что подтверждается снижением биомассы корней под воздействием токсической концентрации меди (табл. 3).

Также, при добавлении меди в питательный раствор, ее концентрация в ксилемном соке растения увеличилась в 12 раз. Через 1 сутки растения на питательном растворе с добавлением фуллеренола накапливали примерно на 5% меньше меди в варианте без предобработки, и на 10% с предобработкой фуллеренолом.

Таблица 9. Влияние фуллеренола C₆₀ и Cu на концентрацию Cu и Fe в ксилемном соке огурца. Приведены средние значения ± SD. Идентичные буквы обозначают отсутствие достоверных различий

Вариант	Cu, мкг/л		Fe, мкг/л	
	1 сут	9 сут	1 сут	9 сут
К	71±2a	38±4a	551±37c	120±15a
Cu15	838±21c	1219±121c	314±29b	583±60c
Cu + F10	792±101bc	958±30b	262±72ab	475±7b
Cu (F10)	743±37b	-	218±33a	-

Спустя 9 суток, в то время как концентрация меди в контрольном варианте снизилась почти вдвое, в варианте с добавлением меди она увеличилась в 1,5 раза, однако, в варианте с добавлением фуллеренола накопление меди выражено меньше. Также снизилась концентрация железа в контрольном варианте, а в вариантах с добавлением меди и фуллеренола, концентрация железа в ксилемном соке наоборот возросла, причем в меньшей степени при добавлении фуллеренола в раствор с избытком меди.

Снижение концентрации железа в первый срок связано с токсическим эффектом меди, который заключается в ингибировании поступления железа (Иванова, 2011). Спустя 9 дней последовало уменьшения содержания меди и железа, что может быть связано с их аккумуляцией в корнях. Повышение содержания железа на второй срок может быть связано с токсическим эффектом меди, заключающемся в перекисном окислении липидов мембран, что делает их более проницаемыми, в том числе для атомов железа. Снижение показателей концентрации железа с добавлением фуллеренола может происходить за счет его антиоксидантных свойств – нейтрализации свободных радикалов, которые и участвуют в перекисном окислении липидов (Halliwell, 1993).

4.3. Влияние наночастиц фуллеренола на концентрацию меди в питательных растворах

Добавление наночастиц фуллеренола C_{60} в дозировке 2 мг/л в растворы с избытком меди не вызвало изменение её концентрации. Однако, при внесении фуллеренола в концентрации 10 мг/л спустя сутки снизилось содержание меди примерно на 20%, а сам эффект сохранился спустя двое суток.

Таблица 10. Влияние фуллеренола C_{60} и Cu на концентрацию Cu в питательных растворах. Приведены средние значения \pm SD. Идентичные буквы обозначают отсутствие достоверных различий

Вариант	Cu, мкМ/л		
	3ч	24ч	48ч
К	0,409 \pm 0,052a	0,418 \pm 0,032a	0,413 \pm 0,033a
Cu15	12,668 \pm 0,629b	12,799 \pm 0,169c	11,509 \pm 0,143c
Cu15F2	13,276 \pm 0,348b	12,616 \pm 0,064c	11,393 \pm 0,057c
Cu15F10	13,245 \pm 0,321b	9,841 \pm 0,162b	9,122 \pm 0,118b

Учитывая снижение концентрации водорастворимых форм меди в питательном растворе при добавлении максимальной дозировки фуллеренола из двух вариантов, можно

сделать вывод, что наночастицы сорбируют медь, а дозировка, а свою очередь, воздействует на степень проявления иммобилизации (сорбции) меди в питательном растворе.

4.4. Влияние наночастиц фуллеренола на токсическое действие меди в почве

Добавление меди в почву привело к значительному увеличению концентрации ее водорастворимых форм. Внесение фуллеренола C₆₀ в вариант с избытком меди привело к еще большему увеличению содержания подвижных форм.

Таблица 11. Влияние фуллеренола C₆₀ и Cu на содержание подвижных форм Cu в почве. Приведены средние значения \pm SD. Идентичные буквы обозначают отсутствие достоверных различий

Вариант	Cu, мг/г
К	6,64 \pm 0,12a
F20	5,78 \pm 0,03a
F40	6,93 \pm 0,91a
Cu200	467,12 \pm 29,17b
Cu200 + F20	541,86 \pm 46,62c
Cu200 + F40	542,6 \pm 19,44c

В данной и последующих таблицах используются следующие обозначения для вариантов: К – контроль; F20 и F40 – варианты с добавлением фуллеренола в количестве 20 и 40 мг/кг; Cu200 – вариант с добавлением 200 мг/кг меди; Cu200 + F20/F40 – варианты с добавлением 200 мг/кг меди и внесением фуллеренола в количестве 20 и 40 мг/кг.

Исходя из полученных результатов, можно предположить, что фуллеренол мог адсорбировать медь, впоследствии делая ее более подвижной. Увеличение содержания подвижных форм меди в почве может увеличивать токсический эффект от ее избытка, что подтверждается изменениями в накоплении нитратных форм азота в почве (нитрифицирующей способности) под воздействием наночастиц (табл. 12).

Важность определения способности почвы трансформировать соединения азота состоит в том, что микроорганизмы, в том числе, участвующие в азотном обмене первыми ощущают на себе влияние загрязнения почвы, что может помочь сделать выводы о ее состоянии.

На фоне добавления меди в избыточном количестве в почву происходило снижение нитрификационную способности почвы. Добавление фуллеренола C₆₀ в контрольный

вариант не повлекло никаких изменений в концентрации нитрата в почве, в то время как его внесение в разных дозировках в вариант с добавлением избытка меди, не имея эффекта на первом сроке, усугубило ее отрицательное влияние через 45 дней.

Таблица 12. Влияние фуллеренола C₆₀ и Cu на накопление нитрата в почве. Приведены средние значения \pm SD. Идентичные буквы обозначают отсутствие достоверных различий

Вариант	NO ₃ ⁻ , мг/кг		
	0 сут	35 сут	45 сут
К	8,6 \pm 0,4	46,2 \pm 1,5c	300,1 \pm 11,7c
F20	–	43,5 \pm 0,2b	293,9 \pm 14,1c
F40		45,5 \pm 0,1c	307,7 \pm 3,6c
Cu200		10,5 \pm 1,2a	184,8 \pm 14,4b
Cu200 + F20		9,2 \pm 1,4a	140,4 \pm 22,3a
Cu200 + F40		10,3 \pm 0,3a	142,0 \pm 23,0a

В результате опыта положительного действия на нитрификационную способность в условиях избытка меди и в контрольных вариантах выявлено не было, в первом случае отрицательное влияние меди усиливалось. Это может быть связано с увеличением содержания подвижных форм меди в почве под воздействием фуллеренола (табл. 11). Таким образом, повышая содержание подвижных форм, внесение наночастиц фуллеренола способствовало усилению ингибирующего действия на нитрификационную способность почвы.

На фоне добавления меди в избыточном количестве в почву происходило снижение дегидрогеназной активности (табл. 13).

Таблица 13. Влияние фуллеренола C₆₀ и Cu на дегидрогеназную активность почвы. Приведены средние значения \pm SD. Идентичные буквы обозначают отсутствие достоверных различий

Вариант	ДГА, мг ТФФ/10г*сут	
	6 дней	34 дня
К	3,34 \pm 0,04b	2,09 \pm 0,08b
F20	3,80 \pm 0,28c	2,30 \pm 0,04c
F40	3,60 \pm 0,13bc	2,26 \pm 0,24c
Cu200	0,79 \pm 0,18a	0,78 \pm 0,09a
Cu200 + F20	0,83 \pm 0,06a	0,75 \pm 0,03a
Cu200 + F40	0,96 \pm 0,07a	0,81 \pm 0,01a

Добавление фуллеренола в почву с избытком меди не вызвало никаких изменений, однако внесение фуллеренола в контрольный вариант вызвало положительный эффект увеличив показатели дегидрогеназной активности почвы на 10%.

В результате опыта при добавлении фуллеренола C₆₀ в почву с избытком меди наночастицы вне зависимости от дозировки эффекта не возымели, в то время как в контрольном варианте происходило повышение дегидрогеназной активности в почве.

Заключение

В результате проделанных экспериментов были получены данные о воздействии фуллеренола на физиологические реакции растения огурца (*Cucumis sativus L.*) в условиях избытка меди. Избыточная концентрация меди оказывала сильное негативное воздействие на растения огурца – снижение концентрации хлорофилла в листьях, отставание в росте, нарушение минерального питания.

Углеродные наночастицы способствовали нейтрализации токсического эффекта на содержание хлорофилла в листьях, биомассу растения, и концентрацию микро- и макроэлементов. Однако, положительные эффекты от внесения фуллеренола проявлялись в опытах с выращиванием растений на питательном растворе. Результаты, полученные в ходе почвенных опытов, не выявили положительного влияния наночастиц при высоких концентрациях меди.

Проделанная работа продемонстрировала возможные положительные эффекты от использования углеродных наночастиц фуллеренола C₆₀, что указывает на перспективы его применения в будущем. С другой стороны, неоднозначные результаты по внесению фуллеренола в почву позволяют сделать вывод о необходимости дальнейших исследований в этой сфере и развития науки в этой области в целом.

Выводы

1. Избыток меди в питательном растворе (15 мкМ/л) вызывал существенное снижение хлорофилла в листьях, дисбаланс элементов минерального питания в листьях и корнях и угнетение роста растений огурца.

2. Внесение фуллеренола C₆₀ в питательный раствор с высоким содержанием меди подавляло транспорт меди в листья растений огурца и тем самым ослабляло фитотоксичность этого металла.

3. Фуллеренол в концентрации 20 и 40 мг/кг увеличивал дегидрогеназную активность и не изменял нитрификационную способность почвы, незагрязненной медью.

4. В почве, загрязненной медью, фуллеренол увеличивал концентрацию водорастворимых форм этого металла. В присутствии фуллеренола негативный эффект меди на дегидрогеназную активность почвы не ослаблялся, а на нитрификационную способность незначительно усиливался.

Список литературы

1. Andreev I., Petrukhina A., Garmanova A., Babakhin A., Andreev S., Romanova V., Troshin P., Troshina O., DuBuske L. Penetration of fullerene C₆₀ derivatives through biological membranes. Fullerenes, Nanotubes, and Carbon Nanostructures, 2008. P. 89-102
2. Avanası R., Jackson W.A., Sherwin B., Mudge J.F., Anderson T.A. C₆₀ fullerene soil sorption, biodegradation, and plant uptake. Environ. Sci. Technol., 2014. P. 2792-2797
3. Baker D.E. Copper // Heavy metals in soils / Eds. Alloway, B.J. Blackie. 1990. P. 151–176.
4. Balsberg-Pahlsson A.M. Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. A literature review // Water, Air Soil Pollut. 1989. V. 47. P. 287–319.
5. Bityutskii N.P., Yakkonen K.L., Lukina K.A., Semenov K.N. Fulleranol increases effectiveness of foliar iron fertilization in iron-deficient cucumber // PLoS ONE 15(5), 2020.
6. Bityutskii N.P., Yakkonen K.L., Lukina K.A., Semenov K.N. Fulleranol affects maize plants depending on their iron status // Biologia Plantarum, 2022. P. 76-82.
7. Bityutskii N.P., Yakkonen K.L., Lukina K.A., Semenov K.N., Panova G.G. Fulleranol can Ameliorate Iron Deficiency in Cucumber Grown Hydroponically // Journal of Plant Growth Regulation, 2021. P. 1017–1031.
8. Bityutskii N.P., Yakkonen K.L., Puzanskiy R., Lukina K.A., Shavarda A.L., Semenov K.N. Fulleranol changes metabolite responses differently depending on the iron status of cucumber plants // PLoS ONE 16(5), 2021.
9. Bityutskii N.P., Yakkonen K.L., Semenov K.N. Zinc deficiency in cucumber plants can be alleviated by fulleranol // Journal of Plant Nutrition, 2022.
10. Borišev M., Borišev I., Župunski M., Arsenov D., Pajević S., Živko C., Vasin J., Djordjevic A. Drought impact is alleviated in sugarbeets (*Beta vulgaris L.*) by foliar application of fulleranol nano-particles // PLoS ONE 10:1–20, 2016
11. Chen R., Ratnikova T.A., Stone M.B., Lin S., Lard M., Huang G., Hudson J.S., Ke P. C. Differential uptake of carbon nanoparticles by plant and Mammalian cells. Small, 2010. P. 612-617
12. Clemens S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis/ S. Clemens // Planta, 2001. P. 475-486.
13. CoHu C.M., Pilon M. (2010) Cell Biology of Copper. In: Cell Biology of Metals and Nutrients, Hell R, Mendel RR (eds.) The: Berlin, Heidelberg, pp. 55-74.
14. Demirevska-Kepova K., Simova-Stoilova L., Stoyanova Z., Hölzer R., Feller U. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese // Environmental and Experimental Botany, 2004. P. 253-266

15. Dugan L.L., Lovett E.G., Quick K.L., Lotharius J., Lin T.T., O'Malley K.L. Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders. *Parkinsonism Relat. Disord.*, 2001. P. 243-246
16. Gao J., Wang Y., Folta K.M., Krishna V., Bai W., Indeglia P., Georgieva A., Nakamura H., Koopman B., Moudgi B. Polyhydroxy fullerenes (fullerols or fullerlenols): beneficial effects on growth and lifespan in diverse biological models. *PLoS ONE*, 2011.
17. Gharbi N., Pressac M., Hadchouel M., Szwarc H., Wilson S.R., Moussa F. Fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity. *Nano Lett.*, 2005. P. 2578-2585
18. Hall J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance / J.L. Hall // *J. Exp. Bot.*, 2002. P. 1-11.
19. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance // *Am J Clin Nutr.* 1993. P. 57
20. Hopkin P.S. *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates.* Elsevier Applied Science Publishers Ltd., 1989. 366 p.
21. Hopkin S.P. Ecological implications of "95% protection levels" for metals in soil // *Oikos.* 1991. V. 66. P. 137-141.
22. Kanash E.V., Panova G.G., Blokhina S.Yu. Optical criteria for assessment of efficiency and adaptogenic characteristics of biologically active preparations. *Acta Horticulturae*, 2013. P. 37-44
23. Kole C., Kole P., Randunu K.M., Choudhary P., Podila R., Ke P.C., Rao A.M., Marcus R.K. Nanobiotechnology can boost crop production and quality: first evidence from increased plant biomass, fruit yield and phytomedicine content in bitter melon (*Momordica charantia*). *BMC Biotechnol.*, 2013. P. 37-58
24. Krotto H.W., Heath J.R., O'Brien S.C., Curl R.F., Smalley R.E. // *Nature*, 1985, v. 318, p. 162.
25. Lehnard G. Bestimmung der vertugbaren Pflanzennährstoffe durch Ermittlung der Dehydrogenoseaktivitat des Bodens // *Ztschr. Pflanz., Dung. Und Bodenk.*, 1962. S. 182-190
26. Maathuis FJ, Diatloff E. Roles and functions of plant mineral nutrients. *Methods Mol Biol.*, 2013. P. 953
27. Marschner H. Mineral nutrition of higher plants // *Academic Press, London*, 1997. 889 p.
28. McBride M.B. Reactions controlling heavy metal solubility in soils // *Adv. Soil Sci.* 1989. V. 10. P. 1- 56.
29. Nagajyoti P.C., Lee K.D., Sreekanth T.V.M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review // *Environ. Chem. Lett.*, 2010. P. 199-216

30. Panova G.G., Kanash E.V., Khomyakov Y.V., Shpanev A.M., Semenov K.N., Artemieva A.M., Rogozhin E.A., Barashkova A.S., Korniyukhin D.L. Influence of Nanocompositions Based on Derivatives of Light Fullerenes on Cultivated Plants under Favorable and Stressful Conditions of Their Habitat // J. tech. phys., 2022.
31. Panova G.G., Kanash E.V., Khomyakov Y.V., Shpanev A.M., Serebryakov E.B., Semenov K.N., Shemchuk O.S., Andrusenko E.V., Podolsky N.E., Sharoyko V.V., Charykov N.A., Dulneva L.L. J. Nanomater., 2019.
32. Panova G.G., Ktitorova I.N., Skobeleva O.V., Sinjavina N.G., Charykov N.A., Semenov K.N. Impact of polyhydroxy fullerene (fullerol or fulleranol) on growth and biophysical characteristics of barley seedlings in favourable and stressful conditions. Plant Growth Regul., 2016. P. 309-317
33. Ruoff R.S., Tse D.S., Malhotra R., Lorents D.C. Solubility of fullerene C₆₀ in a variety of solvents. J. Phys. Chem., 1993. P. 3379-3383
34. Sandman G., Böger P. The enzymatological function of heavy metals and their role in electron transfer processes of plants // Encyclopedia of plant physiology, 1983. P. 563-596
35. Scheinberg I.H. Copper // Metals and their compounds in the environment / Eds. Merian E. N.Y.: Weinheim, VCH, 1991. 1439 p.
36. Thakur, M.; Praveen, S.; Divte, P.R.; Mitra, R.; Kumar, M.; Gupta, C.K.; Kalidindi, U.; Bansal, R.; Roy, S.; Anand, A.; et al. Metal tolerance in plants: Molecular and physicochemical interface determines the “Not so Heavy Effect” of heavy metals // Chemosphere, 2022. P. 287
37. Wang C., Zhang H., Ruan L., Chen L., Li H., Chang X.-L., Zhang X., Yang S.-T. Bioaccumulation of ¹³C-fulleranol nanomaterials in wheat. Environ. Sci.: Nano, 2016. P. 1-7
38. Wang P., Lombi E., Zhao F., Kopittke P. Nanotechnology: a new opportunity in plant sciences // Trends. Plant. Sci., 2016. P. 699–712
39. Xin X., Zhao F., Judy J.D., He Z. Copper stress alleviation in corn (*Zea mays L.*): Comparative efficiency of carbon nanotubes and carbon nanoparticles // Nanoimpact, 2022. 25 p.
40. Yadav S.K. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants // South African Journal of Botany, 2010. P. 167-179
41. Yin J.J., Lao F., Fu P.P., Wamer W.G., Zhao Y., Wang P.C., Qiu Y., Sun B., Xing G., Dong J., 48 Liang X.-J., Chen C. The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials. Biomaterials, 2009. P. 611-621
42. Yruela I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions // Funct. Plant Biol., 2009. P. 409-430

43. Zaytseva O, Neumann G. Carbon nanomaterials: production, impact on plant development, agricultural and environmental applications // Chem. Biol. Technol. Agric., 2016. P. 17
44. Zhao Y.Y., Yang B., Tang M.L. Guo Q-Ch., Chen Ju-T., Wen L-P., Wang M. Concentrationdependent effects of fulleranol on cultured hippocampal neuron viability. Int. J. Nanomed., 2012. P. 3099-3109
45. Андриевская Л.П. Накопление тяжелых металлов в агроландшафтах Нижнего Поволжья // Основы достижения устойчивого развития сельского хозяйства. Волгоград: ВГСХА, 2004. С. 107-109.
46. Бахнов В.К. Содержание микроэлементов меди и марганца в торфяных почвах Барабинской низменности // Микроэлементы в почвах, растительности и водах южной части Западной Сибири. Новосибирск, 1971. С. 17-27
47. Битюцкий Н. П. Минеральное питание растений: учебник. 2-е изд. СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2020. 540 с.
48. Бойченко Е.А. Соединения металлов в эволюции растений в биосфере // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1976. № 3. С. 378-385.
49. Бутовский Р.О. Тяжелые металлы как техногенные химические загрязнители и их токсичность для почвенных беспозвоночных животных // М: Агрохимия, 2005. С. 73-91
50. Виноградов А.П. Геохимия редких и рассеянных элементов в почвах. М.: Издательство АН СССР, 1957. 238 с.
51. Виноградов А.П. Среднее содержание химических элементов в главных типах изверженных горных пород земной коры // Геохимия. 1962. № 7. С. 555-571.
52. Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания. СанПиН 1.2.3685-21, 2021
53. Гольдшмит В.М. Принципы распределения химических элементов в минералах и горных породах // Геохимия редких элементов. М.–Л.: ГОНТИ НКТП СССР, 1930. С. 215-242.
54. Добровольский В.В. Биосферные циклы тяжелых металлов и регуляторная роль почвы // Почвоведение. 1997. №4. С. 434-441.
55. Добровольский В.В. Основы биогеохимии // М: Академия, 2003. 400 с.
56. Зырин Н.Г. Нормирование содержания тяжелых металлов в системе почва-растения // Химия в сельском хозяйстве. 1985. №6. С.45-48.
57. Иванова Е.М. Токсическое действие меди и механизмы ее детоксикации растениями рапса: Автореф. дис. канд. биол. наук. — М., 2011. — 26 с.
58. Ильин Б. В. Тяжелые металлы в системе почва – растение. — Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1991. 151 с.

59. Кабата-Пендиас А. Микроэлементы в почвах и растениях. М.: Мир, 1989. 439 с.
60. Кононова М.М. Органическое вещество почв. М.: Наука, 1963. 314 с.
61. Корнев А.Б., Трошина О.А., Трошин П.А. Биологически активные производные фуллеренов, методы их получения и применение в медицине. В кн.: Органические и гибридные наноматериалы: тенденции и перспективы /Под ред. В.Ф. Разумова, М.В. Ключева. Иваново, 2013. С. 392-485
62. Лукашев К.И. Химические элементы в почвах. Минск: Наука и техника, 1970. 233 с.
63. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. М.: Химия, 1979. 480 с.
64. Майстренко В.Н., Хамитов Р.З., Будников Г.К. Эколого-аналитический мониторинг супертоксикантов. М.: Изд-во «Химия», 1996. 312 с.
65. Нечаева Е.Г. Воздействие нефтедобывающей отрасли на почвенный покров Среднего Приобья // Современные проблемы загрязнения почв. Сб. мат-лов II Межд. науч. конф. 2007. Т. 1. С.171- 174.
66. Орлов Д.С. Образование гуматов кобальта, никеля, меди и цинка // Научные доклады высш.шк. Биол. науки. 1960. № 3. С. 62-66.
67. Пампура Т.В., Пинский Д.Л., Остроумов В.Г., Гершевич В.Д., Башкин В.Н. Экспериментальное изучение буферности чернозема при загрязнении медью и цинком // Почвоведение. 1993. № 2. С. 104-110.
68. Панова Г.Г., Канаш Е.В., Семенов К.Н., Чарыков Н.А., Хомяков Ю.В., Аникина Л.М., Артемьева А.М., Корнюхин Д.Л., Вертебный В.Е., Синявина Н.Г., Удалова О.Р., Куленова Н.А., Блохина С.Ю. Производные фуллерена стимулируют продукционный процесс, рост и устойчивость к окислительному стрессу у растений пшеницы и ячменя. Сельскохозяйственная биология, 2018. С. 38-49
69. Пиотровский Л.Б. Фуллерены в дизайне лекарственных веществ. Российские нанотехнологии, 2007. Р. 6-18
70. Протасова Н.А. Микроэлементы (Cr, V, Ni, Mn, Zn, Cu, Co, Ti, Zr, Ga, Be, Sr, Ba, B, I, Mo) в черноземах и серых лесных почвах Центрального Черноземья. Воронеж, 2003. 368 с.
71. Ратников А.Н. Влияние Cd, Zn, Cu на продуктивность зерновых культур и биоактивность почвы // Плодородие. 2007. №3. С. 39-40.
72. Ратников А.Н. Урожай ячменя и биологическая активность почвы при загрязнении ТМ // Плодородие. 2005. № 4. С. 15-16.
73. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии // Наука, 2005. С. 51-59.
74. Школьник М.Я. Микроэлементы в жизни растений. — М.: Наука, 1974. 324 с.

75. Юрьева Г.М., Банкаина Т.А, Крейер К.Г. Практикум по агрохимическому анализу почв // СПбГУ, 2005. С. 53.
76. Якушев В.П., Канаш Е.В., Осипов Ю.А., Якушев В.В., Лекомцев П.В., Воропаев В.В. Оптические критерии при контактной и дистанционной диагностике состояния посевов. Сельскохозяйственная биология, 2010. Р. 94-101
77. Яровенко Е.В., Яхияев М.А. Загрязнение тяжелыми металлами растительных сообществ Северо-Дагестанской низменности при добыче нефти // Вестник Дагестанского Научного Центра. 2009. № 33. С. 31–36.