

Научная статья
УДК 581.4:581.829
EDN IHSRYE

Оптимизация методики извлечения фитолитов

Степан Александрович Казанцев¹, аспирант, младший научный сотрудник
Вадим Андреевич Мезенцев², аспирант, младший научный сотрудник
Научный руководитель – Игорь Эдуардович Памирский³,
кандидат биологических наук

^{1, 2} Сибирский федеральный научный центр агробιοтехнологий Российской академии наук, Новосибирская область, Краснообск, Россия

³ Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства и торфа (филиал Сибирского федерального научного центра агробιοтехнологий Российской академии наук), Томская область, Томск, Россия

¹ stivkaz@yandex.ru, ² mr.ya-1998@mail.ru

Аннотация. В статье приведены результаты оптимизации методики выделения фитолитов с использованием сортов пшеницы Памяти Азиева и Ренегат 48-3. Оптимизация заключается в том, что процессу сжигания образца в печи и последующей обработке кислотами предшествует механическое измельчение образца при помощи лабораторной мельницы. Сделан сравнительный анализ количественных данных извлечения фитолитов из растительного материала. Показано, что предварительное кратковременное механическое измельчение ножами на лабораторной мельнице (до 12 500 об/мин) не приводит к значительному разрушению фитолитов и может применяться в процессе подготовки проб препаратов фитолитов.

Ключевые слова: фитолиты, методика извлечения фитолитов, биокремнезем, диоксид кремния, зола, пшеница

Для цитирования: Казанцев С. А., Мезенцев В. А. Оптимизация методики извлечения фитолитов // Молодежный вестник дальневосточной аграрной науки : сб. студ. науч. тр. Благовещенск : Дальневосточный ГАУ, 2025. Вып. 10. С. 105–111.

Original article

Optimization of the phytolith extraction technique

Stepan A. Kazantsev¹, Postgraduate Student, Junior Researcher
Vadim A. Mezentsev², Postgraduate Student, Junior Researcher
Scientific advisor – Igor E. Pamirsky³, Candidate of Biological Sciences

^{1, 2} Siberian Federal Scientific Center of Agrobiotechnologies of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk region, Krasnoobsk, Russia

³ Siberian Research Institute of Agriculture and Peat (branch of the Siberian Federal Scientific Center of Agrobiotechnologies of the Russian Academy of Sciences) Tomsk region, Tomsk, Russia

¹ stivkaz@yandex.ru, ² mr.ya-1998@mail.ru

Abstract. The article presents the results of optimization of the phytolith extraction technique using the wheat varieties of Pamyati Aziev and Renegat 48-3. The optimization lies in the fact that the process of burning the sample in a furnace and subsequent acid treatment is preceded by mechanical grinding of the sample using a laboratory mill. A comparative analysis of quantitative data on the extraction of phytoliths from plant material has been performed. It has been shown that preliminary short-term mechanical grinding with knives in a laboratory mill (up to 12,500 rpm) does not lead to significant destruction of phytoliths and can be used in the preparation of samples of phytolith preparations.

Keywords: phytoliths, phytolith extraction technique, biosilica, silicon dioxide, ash, wheat

For citation: Kazantsev S. A., Mezentsev V. A. Optimization of the phytolith extraction technique. Proceedings from *Molodezhnyi vestnik dal'nevostochnoi agrarnoi nauki*. (PP. 105–111), Blagoveshchensk, Dal'nevostochnyi gosudarstvennyi agrarnyi universitet, 2025 (in Russ.).

Введение. Исследование фитоцитов носит фундаментальный и практический характер. Фитоциты изучены у многих диких и культурных растений. Однако знания об их биологической роли и механизмах формирования носят гипотетический характер.

Одним из важных вопросов при исследованиях растительного биокремнезема является пробоподготовка. Сегодня существуют несколько методик, включающих различные варианты температурного, кислотного, перекисного озоления. Несмотря на высокую прочность частиц аморфного диоксида кремния растений, они могут подвергаться риску разрушения в процессе пробоподготовки, что приводит к затруднению идентификации и описанию морфологии фитоцитов. С другой стороны, в процессе сжигания и обработки кислотами может сохраняться органическая компонента, также препятствующая

микроскопическому изучению и спектральному анализу. Таким образом, перед исследователем стоят две задачи: максимально избавиться от органики и сохранить целостность фитоцитов.

В этой связи **целью работы** явилась *оптимизация методики извлечения фитоцитов для одновременного решения обозначенных выше задач.*

Материалы и методы исследований. Растения выращивали в 2024 г. в специализированной климатической камере на базе Сибирского федерального научного центра агробιοтехнологий РАН (рис. 1). Климатическая камера представляла собой комнату с искусственным микроклиматом и освещением.



Рисунок 1 – Стеллажи климатической камеры с образцами пшеницы

Растения выращивали в горшках объемом на 7 литров (по 30 растений в горшке), размещенных на стеллажах, в грунте с капельным поливом. Фотопериод день/ночь составлял 16/8 часов. Свет прямой, неполяризованный. Использовали светодиодные светильники с интенсивностью на поверхности горшка 227,5 PPFD. Параметры микроклимата: температура воздуха 25 °С, относительная влажность воздуха 50 %.

Сорта пшеницы выращивали на универсальном грунте «Агрикола» (Техноэкспорт, Россия) следующего состава: фрезерный торф, мука известковая, азот ($\text{NH}_4 + \text{NO}_3$) не менее 200 мг/л, фосфор (P_2O_2) не менее 100 мг/л, калий (K_2O) не менее 300 мг/л, микроэлементы (магний, железо, бор, марганец, цинк, медь, молибден); водородный показатель солевой суспензии равен 5,5.

Все растения росли и развивались в пределах нормы.

Отбор и подготовку образцов фитолитов проводили по модифицированной методике [1]:

1. Для исследования частиц биокремнезема отбирались образцы сортов пшеницы Памяти Азиева и Ренегат 48-3. Всего было исследовано по 30 растений каждого сорта. Образцы стеблей и листьев отбирались в пулы в фазе полной спелости.

2. Образцы при наличии видимых внешних загрязнителей (грунт, пыль и др.) механически очищали щеточкой, затем обильно промывали дистиллированной водой и высушивали при комнатной температуре в открытом виде в проветриваемом помещении до 15–30 дней.

3. Высушенные образцы измельчали ножницами (контроль) либо при помощи лабораторной мельницы ЭКАН Вьюга-3М (опыт). Принцип работы основан на измельчении продукта вращающимся на высокой скорости ножом в сочетании с циклическим поворотом размольного узла. Режим измельчения: скорость вращения ножей – 12 500 об/мин, время помола – 1 мин. Затем образцы сжигали в керамическом эмалированном тигле с крышкой в муфельной

печи в течение 2,5 час при температуре 450 °С. Зола переносили в пластиковые конусные центрифужные пробирки с винтовой крышкой объемом 15 мл для последующей обработки кислотами или хранения.

4. Для обработки кислотами оставляли в пробирке 1–1,5 мл золы. В пробирку с золой добавляли 5 мл 10-процентного раствора соляной кислоты; закрывали крышку; перемешивали ритмичным встряхиванием рукой (не переворачивая пробирку вверх дном) и оставляли в штативе при комнатной температуре на 30 мин (перемешивали встряхиванием еще 2 раза через 10 и 20 мин после начала инкубации). Далее пробирки центрифугировали 5 мин при скорости вращения 1 500–2 000 об/мин. Затем медленно автоматической пипеткой забирали надосадочную жидкость (оставляли 1 мл).

5. В пробирку с 1 мл смеси добавляли 5 мл концентрированной азотной кислоты и повторяли действия, описанные в пункте 3.

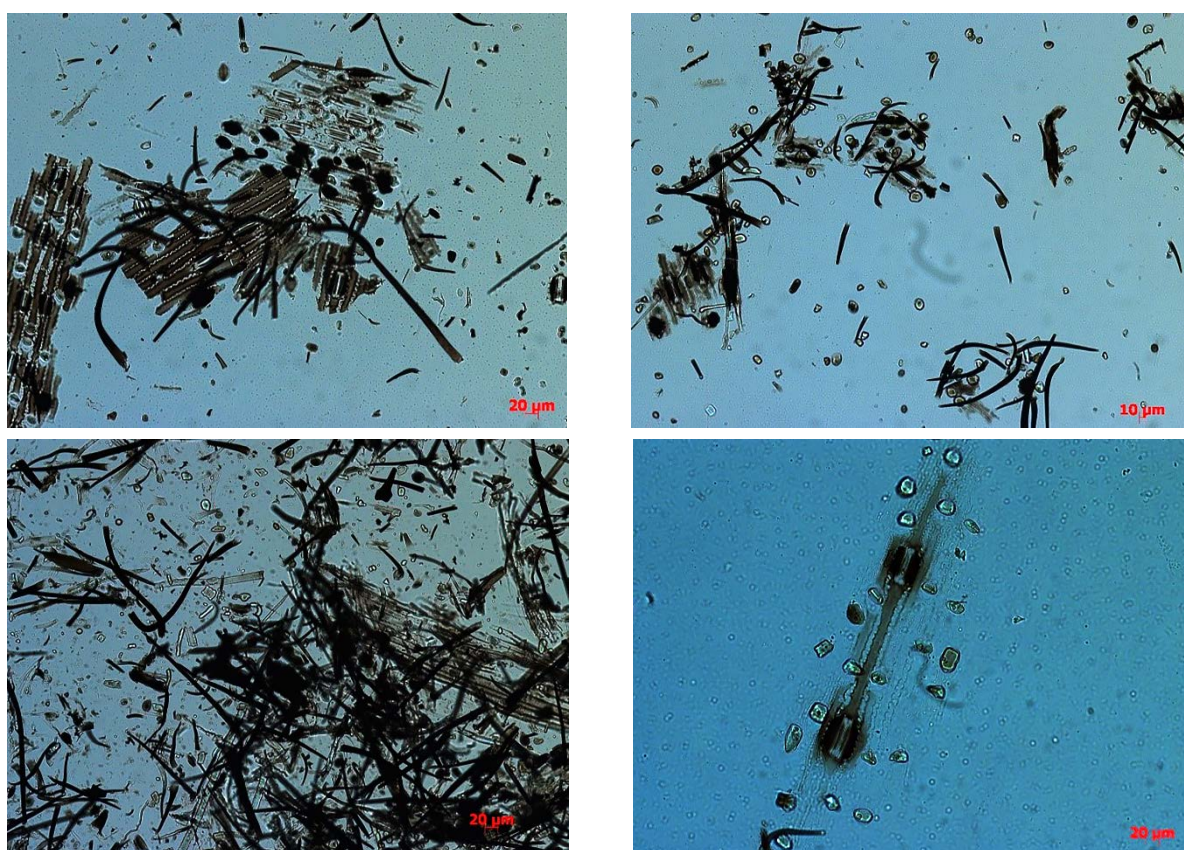
6. Затем в пробирку с 1 мл образца добавляли 10 мл дистиллированной воды, все перемешивали и оставляли в штативе при комнатной температуре на 30 мин. Далее центрифугировали в течение 5 мин при 1 500–2 000 об/мин. Аккуратно автоматической пипеткой забирали надосадочную жидкость (оставляли 1 мл). Промывку дистиллированной водой делали 3 раза.

Готовые препараты изучали на световом микроскопе Axio Imager 2 (Zeiss, Oberkochen, Германия) с программным обеспечением Axio Vision 4.2 при 10–60-тикратном увеличении, а также Raman-микроскопе для снятия спектра частиц. Спектры были получены на Raman-спектрометре RNX1 (Kaiser Optical Systems, USA), совмещенным с оптическим микроскопом Morphologi G3-ID (Malvern, Великобритания).

Образцы препаратов помещали на пластиковые предметные стекла. При 50-кратном увеличении использовали лазерное возбуждение при длине волны 785 нм; экспозиция лазера – 1 секунда; количество накоплений – 50.

Результаты исследований и их обсуждение. Визуально препараты фитолитов пшеницы, приготовленные разными методами, не отличались и представляли собой темно окрашенную смесь мелких частиц.

Микроскопическое исследование показало, что контрольные и опытные препараты содержали характерные для пшеницы фитолиты. Фитолиты были представлены отдельными частицами или комплексами, повторяющими формы клеток и тканей эпидермиса (рис. 2).



фотографии сверху – фитолиты пшеницы сорта Памяти Азиева;
фотографии снизу – фитолиты пшеницы сорта Ренегат 48-3
фото с оптического микроскопа, увеличение 10-кратное

Рисунок 2 – Препараты фитолитов пшеницы

Среди них были идентифицированы фитолиты в виде покровных продолговатых и округлых клеток, клеток устьичных аппаратов. Продолговатые фитолиты покровных клеток имели лопасти, выраженные в разной степени. Также присутствовало большое количество трихонных фитолитов (окремневшие трихомы) и бесформенных частиц. Последние могут быть фрагментами

разрушенных фитолитов, либо слепками клеток неправильной формы. Размеры фитолитов соответствовали размерам клеток эпидермиса листа и стебля пшеницы и составляли в основной массе около 10–150 мкм длиной.

Микроскопическое исследование на Раман-микроскопе показало, что исследуемые частицы состоят из диоксид кремния.

Заключение. Предварительное кратковременное механическое измельчение ножами на лабораторной мельнице (до 12 500 об/мин в течение одной минуты) не приводит к выраженному разрушению фитолитов стеблей и листьев пшеницы и соответственно может применяться в процессе подготовки проб препаратов.

Список источников

1. Pamirsky I. E., Klykov A. G., Zakharenko A. M., Golokhvast K. S. First data on the differences of phytolith composition in different wheat varieties *Triticum aestivum* L. // Key Engineering Materials. 2019. Vol. 806. P. 155–160.

References

1. Pamirsky I. E., Klykov A. G., Zakharenko A. M., Golokhvast K. S. First data on the differences of phytolith composition in different wheat varieties *Triticum aestivum* L. Key Engineering Materials, 2019;806:155–160.

© Казанцев С. А., Мезенцев В. А., 2025

Статья поступила в редакцию 07.02.2025; одобрена после рецензирования 21.02.2025; принята к публикации 17.04.2025.

The article was submitted 07.02.2025; approved after reviewing 21.02.2025; accepted for publication 17.04.2025.