



УДК 581.192.6 + 632.122.2

Оценка токсичности полициклических ароматических углеводов для растений

Т. А. Михайлова, В. Н. Шмаков, Е. Н. Тараненко

Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

E-mail: mikh@sifibr.irk.ru

Аннотация. Исследовали воздействие полициклических ароматических углеводов (нафталин, аценафтен, аценафтилен, фенантрен, пирен, флуорантен) в различных концентрациях на прирост биомассы клеток суспензионной культуры сахарного тростника (*Saccharum officinarum* L.). Испытуемые вещества проявляли как ингибирующий, так и стимулирующий эффект, что выражалось, соответственно, в снижении или увеличении относительного прироста биомассы клеток *in vitro*. Характер изменения прироста биомассы клеток зависел от конкретного вещества и его концентрации. Начальные концентрации, при которых проявлялся подавляющий эффект, различались, снижаясь с увеличением молекулярной массы испытуемых веществ. Для веществ с одинаковой молекулярной массой начальные ингибирующие концентрации также различались, снижаясь с увеличением реакционной способности соединения, определяемой особенностями химической структуры молекулы.

Ключевые слова: полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), суспензионная культура клеток *Saccharum officinarum* L., прирост биомассы *in vitro*, фитотоксичность.

Введение

К настоящему моменту накоплен большой объём информации о воздействии на растения неорганических поллютантов, в то же время гораздо меньше сведений имеется о влиянии на растения органических загрязняющих веществ, в частности стойких органических загрязнителей (СОЗ). По-видимому, это связано со спецификой физико-химических свойств органических соединений, а также трудностью их определения в биологических объектах (матрицах), которые отличаются сложным многокомпонентным составом. Определение СОЗ должно проводиться на нанограммовом уровне, для чего потребовались разработка и внедрение хроматомасс-спектрометров соответствующего разрешения [2; 19].

Интерес к влиянию органических загрязняющих веществ на растения в нашей стране возник еще в 1970–1980-е гг. Этой теме посвящены исследования А. В. Воеводина с соавторами, Э. И. Слепяна с соавторами, С. В. Дурмишидзе, Д. Ш. Угрехелидзе, а также более поздние работы других авторов [1; 6; 10; 15; 16]. Исследованы органические соединения разных классов: алканы с разомкнутой и замкнутой цепью, моноциклические и полициклические ароматические углеводороды, различные группы пестицидов; показана высокая фи-

тотоксичность отдельных представителей изученных классов соединений [1; 11]. Однако из большого класса полиароматических углеводов (ПАУ) относительно подробно рассматривался только бенз(а)пирен, поскольку в нашей стране он используется в качестве вещества-индикатора присутствия ПАУ в атмосфере [12]. К настоящему времени известно, что относительное содержание бенз(а)пирена в сумме всех присутствующих в природных средах ПАУ невелико, кроме того, некоторые соединения этого класса не менее токсичны, чем бензпирены: это дибенз(а, h)антрацен, а также различные нитро-, amino- и тиопроизводные ПАУ [10; 14]. Следует также принимать во внимание и тот факт, что соединения, уступающие бенз(а)пирену по токсичности, могут оказывать сильное негативное воздействие на биоту за счёт большего относительного их содержания в техногенных эмиссиях. Исходя из подобных соображений, в ряде стран список веществ для постоянного мониторинга загрязнения природных сред ПАУ расширен: в европейских странах в него включены 6 соединений, в США – 16 [9].

Присутствующие в биосфере ПАУ могут иметь как природное, так и антропогенное происхождение [5; 13; 14]. Однако вклад естественного поступления ПАУ незначителен, в

то время как антропогенные источники многочисленны – это практически все важнейшие отрасли промышленности. Поступающие в биосферу ПАУ могут распространяться во всех природных средах – атмосферном воздухе, водных объектах, почве [9]. При исследовании растений как матриц накопления техногенных ПАУ было показано, что они могут аккумулировать вещества этого класса в органах и тканях [4; 17]. Установлено, что выраженными аккумуляционными свойствами обладает хвоя сосны обыкновенной, поглощающая ПАУ как из аэрозольной, так и из газовой фазы атмосферы [10].

По химическому строению ПАУ – высокомолекулярные органические соединения ароматического ряда, отличающиеся количеством бензольных колец в структуре молекулы и способом их конденсации. ПАУ химически устойчивы, малорастворимы в воде [14]. Гидрофобность ПАУ обуславливает их способность проникать через биологические барьеры и аккумулироваться в клетках живых организмов. Это же свойство делает молекулы ПАУ труднодоступными для ферментных систем, участвующих в биодеградации токсикантов. Большинство соединений, относящихся к ПАУ, высокотоксичны [6; 16]. Результаты наших ранее проведённых исследований косвенно свидетельствуют о наличии фитотоксического эффекта ПАУ, поступающих с аэропромвыбросами [10]. В частности, показано пространственное распространение загрязнения лесов Байкальского региона техногенными ПАУ, при этом самое высокое их накопление регистрировалось в хвое деревьев на территориях, прилегающих к алюминиевому заводу и крупным автомагистралям [10]. Тесные прямые корреляции выявлены не только между уровнем загрязнения атмосферного воздуха ПАУ и накоплением этих веществ в хвое сосны, но также между содержанием ПАУ в хвое деревьев и степенью их угнетения.

Однако для достоверного доказательства негативного влияния ПАУ на растения требуются эксперименты по искусственной их обработке этими соединениями. Такие работы малочисленны [7; 20]. Сложность применения методов прямого воздействия ПАУ на растения обусловлена крайне низкой растворимостью в воде. Использование с этой целью органических растворителей создаёт ситуацию, при которой применяемый в качестве растворителя химический агент (например, гексан) даёт дополнительную токсическую нагрузку на опытное растение. Решить трудности методического

характера возможно с помощью использования культуры растительных клеток. Преимущество этого метода заключается в том, что изучение воздействия конкретного токсиканта на растительную клетку происходит в контролируемых условиях при максимальном устранении влияния прочих сопутствующих факторов. Следует отметить, что наиболее адекватным модельным объектом для физиолого-биохимических исследований *in vitro* служит суспензионная культура, поскольку её клетки характеризуются значительно меньшей степенью физиологической гетерогенности, в сравнении с клетками каллусной культуры. Этому способствуют и условия культивирования суспензионной культуры – в жидкой аэрируемой среде при постоянном перемешивании. Получение и поддержание суспензионной культуры клеток хвойных, в частности сосны, технически крайне сложно. К тому же специфический биохимический состав клеток и тканей хвойных, характеризующийся высоким содержанием флавоноидов и других полифенольных соединений, делает сосну не вполне подходящим объектом для изучения воздействия органических токсикантов на растительную клетку. Поэтому в качестве модельного объекта (матрицы) для изучения фитотоксического эффекта ПАУ нами была выбрана суспензионная культура клеток сахарного тростника (*Saccharum officinarum* L.), являющаяся наиболее удобным материалом для экспериментальных исследований [22].

Цель работы – оценить токсичность для растений ряда полициклических ароматических углеводородов, входящих в состав техногенных эмиссий.

Материалы и методы исследований

В качестве объекта исследования была выбрана суспензионная культура клеток сахарного тростника (*Saccharum officinarum* L.). В эксперименте использовали 6 соединений: нафталин, аценафтен, аценафтилен, фенантрен, пирен и флуорантен (табл. 1). Выбор ПАУ обусловлен тем, что эти соединения являются специфическими микрокомпонентами аэрозолей, распыляющихся над территорией Байкальского региона; в окружающую среду они поступают из техногенных источников и, следовательно, могут рассматриваться в качестве индикаторов загрязнения ПАУ атмосферного воздуха [9; 10; 23]. О влиянии этих веществ на растительные организмы известно крайне мало в отличие от бензпирена, токсический эффект которого, включая фитотоксичность, доказан и подробно исследован [7; 18; 20].

Таблица 1

Физико-химические характеристики испытываемых ПАУ

Углеводород	Молекулярная масса	Плотность, г/см ³ (при 20 °С _с)	Температура, °С		Растворимость в воде, г/л (при 25 °С)
			плавления	кипения	
Нафталин (C ₁₀ H ₈)	128	1,025	80	218	0,0317000
Аценафтен (C ₁₂ H ₁₀)	154	1,024	96	279	0,0039300
Аценафтилен (C ₁₂ H ₈)	152	0,899*	92	270	0,0161000
Фенантрен (C ₁₄ H ₁₀)	178	1,594	100	340	0,0012900
Пирен (C ₁₆ H ₁₀)	202	1,277	156	399	0,0000958
Флуорантен (C ₁₆ H ₁₀)	202	1,252**	110	382	0,0002600

Примечание: * – указано для 16 °С; ** – указано для 0 °С

В эксперименте испытывались следующие концентрации ПАУ: 0,1; 0,2; 1; 2; 10 и 20 мкг/мл. Непосредственно перед экспериментом исследуемые вещества, растворённые в диметилсульфоксиде в соответствующих концентрациях, добавляли в основную среду, в состав которой входили: основные неорганические соли по Мурашиге и Скугу [21], 100 мг/л мезоинозитола, 1 мг/л тиамин, 0,5 мг/л пиридоксина, 0,5 мг/л никотиновой кислоты, 30 г/л сахарозы, 3 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты. Культивирование клеток проводили в пробирках на вращающемся барабане со скоростью вращения 60 об./мин в течение 14 дней. В конце срока после отсасывания жидкой фазы через воронку со стеклянным фильтром определяли сырую массу клеток в каждой пробирке. Эксперименты проводили в 6–10-ти биологических повторностях (число пробирок с суспензионной культурой на каждый вариант обработки) и 2–4-х аналитических повторностях (количество аналогичных по постановке экспериментов, разделённых по времени). Для оценки действия ПАУ на суспензионную культуру сахарного тростника определяли её относительный прирост (процентное отношение прироста биомассы культуры, выращиваемой на экспериментальной среде, к приросту биомассы, инкубированной на основной (контрольной) питательной среде). Оценку статистической значимости различий по исследуемому параметру проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне доверительной вероятности 0,95 [8].

Результаты и обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о влиянии всех испытанных ПАУ на прирост биомассы культуры клеток сахарного тростника. При этом оказываемый эффект зависит от концентрации исследуемого вещества, его молекулярной массы и химической структуры.

В экспериментах с нафталином и его производными было показано наличие как инги-

бирующего, так и стимулирующего эффекта испытываемых веществ. Нафталин – самый низкомолекулярный представитель ряда ПАУ, характеризующийся наибольшей растворимостью среди представителей данного класса соединений. Молекулярная структура нафталина представляет собой два сконденсированных бензольных кольца. Известно, что полициклические углеводородные структуры, состоящие только из бензольных колец, наиболее стабильны, а следовательно, наименее реакционноспособны. В наименьшей из используемых концентраций (0,1 мкг/мл) нафталин не оказывал отрицательного влияния на прирост биомассы суспензионной культуры сахарного тростника, более того, наблюдался даже небольшой стимулирующий эффект. При повышении концентрации наблюдалась тенденция к подавлению прироста, наиболее выраженная в концентрации от 2 до 20 мкг/мл (рис. 1).

Аценафтен представляет собой трициклический углеводород, в структуру которого входят два бензольных и одно пятичленное насыщенное кольцо. Аценафтилен – ненасыщенное производное аценафтена, трициклический углеводород с двойной связью в пятичленном цикле. Производные нафталина аценафтен и аценафтилен в силу своей структуры являются менее химически стабильными соединениями, а следовательно – более реакционноспособными. В концентрации 0,1 мкг/мл не было отмечено статистически значимого воздействия на прирост биомассы клеток культуры. В концентрации 1,0 мкг/мл и аценафтен и аценафтилен оказывали стимулирующий эффект, проявляющийся в увеличении относительного прироста биомассы культуры клеток сахарного тростника. В концентрации 10 мкг/мл и выше оба вещества оказывали подавляющее воздействие, сравнимое по степени угнетения прироста биомассы клеток с эффектом, оказываемым нафталином в той же концентрации (см. рис. 1).

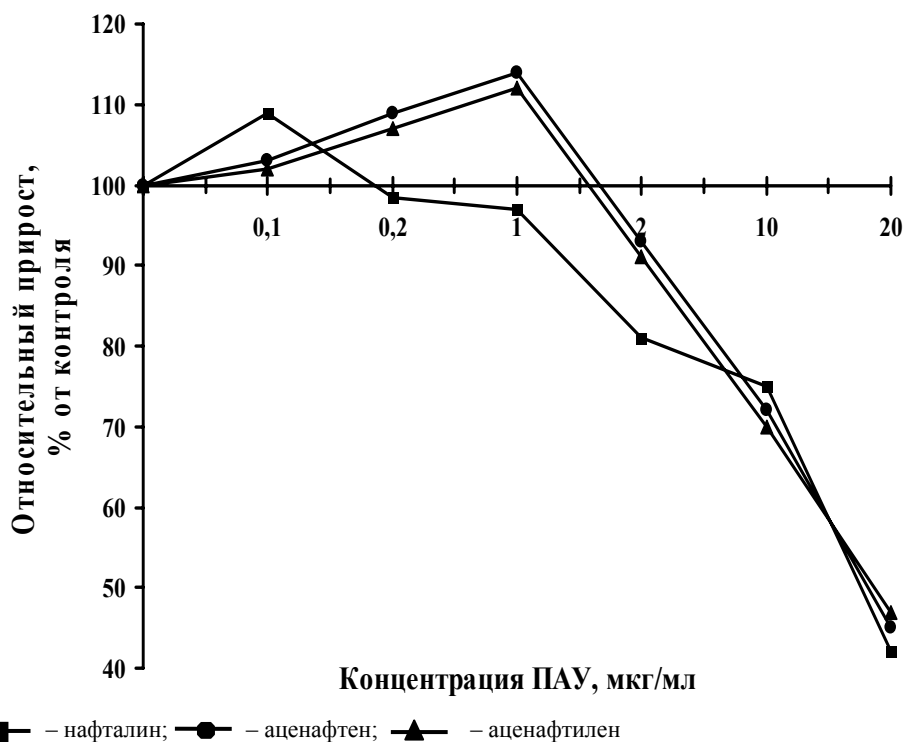


Рис. 1. Влияние нафталина, аценафтена и аценафтилена на прирост биомассы суспензионной культуры клеток сахарного тростника

Фенантрен — трициклический ароматический углеводород, представитель ряда ПАУ, образованных способом угловой конденсации бензольных ядер, вследствие чего его реакционная способность ниже, чем у других трициклических соединений [14]. В среде культивирования фенантрен в определённой мере стимулировал прирост клеточной биомассы в концентрации 0,1 мкг/мл. В концентрации 1,0 мкг/мл и больших фенантрен оказывал явно выраженное ингибирующее воздействие на прирост клеток культуры (рис. 2).

Флуорантен и пирен имеют в своём составе по 4 цикла и обладают одинаковой молекулярной массой. При одинаковых брутто-формулах ($C_{16}H_{10}$) пирен является продуктом конденсации четырёх бензольных колец, в то время как один из циклов флуорантена представлен пятиатомным углеродным скелетом, что снижает стабильность молекулы и повышает её реакционную способность.

Ингибирующее воздействие флуорантена на прирост биомассы клеток в культуре тростника сильнее воздействия пирена (рис. 3). Необходимо отметить, что начальное подавление относительного прироста культуры отмечается при добавлении в питательную среду флуорантена в наименьшей используемой концентрации (0,1 мкг/мл), тогда как пирен в той же концентрации не оказывает на прирост биомассы

клеток суспензионной культуры тростника какого-либо статистически достоверного воздействия. В концентрации 10,0 мкг/мл и пирен, и флуорантен подавляли относительный прирост биомассы более чем на 50 %, тогда как имеющие меньшую молекулярную массу нафталин и фенантрен вызывали подобный эффект лишь в максимальной из используемых концентраций (20,0 мкг/мл).

Заключение

В опытах с суспензионной культурой клеток сахарного тростника каждое из испытывавшихся веществ класса ПАУ вызывало фитотоксический эффект, степень выраженности которого, оцениваемая по снижению относительного прироста биомассы клеток, усиливалась с повышением концентрации вещества в среде культивирования. Фитотоксичность отдельных ПАУ существенно варьировала, нарастая с увеличением молекулярной массы испытываемого соединения. Нафталин оказывал подавляющее действие на прирост биомассы клеток культуры в концентрациях от 2,0 до 20,0 мкг/мл; минимальная ингибирующая концентрация аценафтена и аценафтилена составила 10,0 мкг/мл. Снижение относительного прироста биомассы более чем на 50 % нафталин вызывал только в максимальной испытывавшейся концентрации (20,0 мкг/мл).

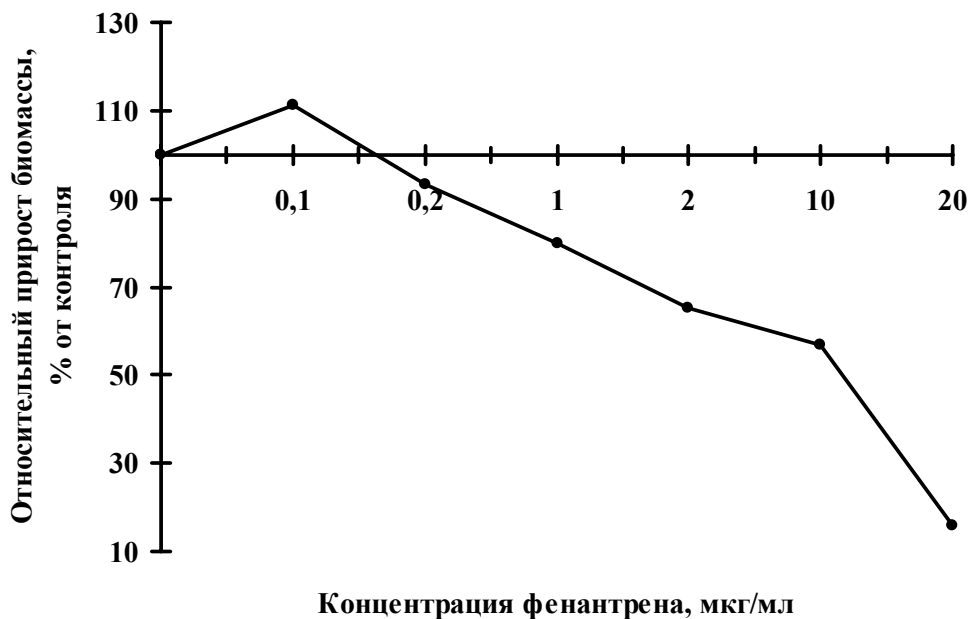


Рис. 2. Влияние фенантрена на прирост биомассы суспензионной культуры клеток сахарного тростника

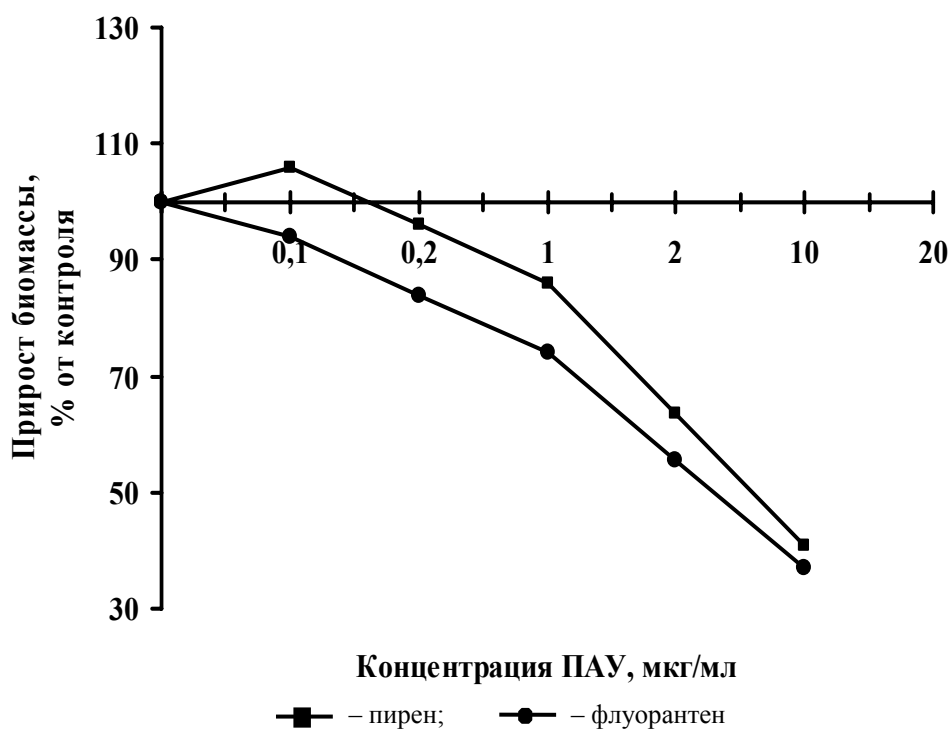


Рис. 3. Влияние пирена и флуорантена на прирост биомассы суспензионной культуры клеток сахарного тростника

Аценафтен и аценафтилен по степени токсичности соответствовали нафталину. Фитотоксическое действие фенантрена, пирена и флуорантена, проявившееся в снижении относительного прироста биомассы сахарного тростника, выявлено в концентрации 1,0 мкг/мл и выше. Пирен и флуорантен подавляли относительный прирост биомассы более чем на 50 % в

концентрации 10,0 мкг/мл: в ряду исследованных веществ эти ПАУ характеризовались наиболее выраженным негативным эффектом. Фенантрен по своей токсичности занял промежуточное положение между веществами, имеющими в своём составе 4 цикла (флуорантен и пирен) и низкомолекулярными представителями ПАУ (нафталин, аценафтен, аценафтилен),

имеющими в составе по 2–3 цикла. В то же время три из шести исследуемых веществ (нафталин, фенантрен и пирен) оказывали слабое стимулирующее воздействие на пророст биомассы клеток сахарного тростника в минимальной концентрации (0,1 мкг/мл); аценафтилен и аценафтен оказывали подобный эффект в концентрации 1,0 мкг/мл.

Авторы благодарны А. Г. Горшкову (ЛИИ СО РАН), предоставившему необходимые для экспериментальных исследований вещества (ПАУ).

Литература

1. Воеводин А. В. Влияние 2,4-Д на рост тканей и нуклеиновые кислоты пшеницы и ячменя / А. В. Воеводин, Л. И. Невзорова, Е. М. Казарина // Растения и химические канцерогены. – Л., 1979. – С. 28–31.
2. Горшков А. Г. Определение полициклических ароматических углеводородов в хвое сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) – биомониторинг загрязнения атмосферы / А. Г. Горшков // Журн. аналит. химии. – 2008. – Т. 63, № 8. – С. 880–886.
3. Дурмишидзе С. В. Метаболизм некоторых загрязнителей атмосферного воздуха в растениях / С. В. Дурмишидзе. – Тбилиси : Мецниереба, 1977. – 47 с.
4. Ильницкий А. П. Канцерогенные углеводороды в почве, воде и растительности / А. П. Ильницкий // Канцерогены в окружающей среде. – М. : Гидрометеиздат, 1975. – С. 53–71.
5. Ильницкий А. П. Природные источники канцерогенных углеводородов / А. П. Ильницкий, В. С. Мищенко, Л. М. Шабад // Канцерогенные вещества в окружающей среде : тр. расширен. пленума Ком. по канцероген. веществам. – М. : Гидрометеиздат, 1979. – С. 25–29.
6. Квеситадзе Г. И. Метаболизм антропогенных токсикантов в высших растениях / Г. И. Квеситадзе [и др.]. – М. : Наука, 2005. – 199 с.
7. Крестовская Т. В. Влияние бенз(а)пирена на *Allium cepa sylvestris* / Т. В. Крестовская, Э. И. Слепян, И. А. Калинина // Растения и химические канцерогены. – Л. : Наука, 1979. – С. 38–42.
8. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М. : Высш. шк., 1980. – 293 с.
9. Маринайте И. И. Полициклические ароматические углеводороды в окружающей среде Прибайкалья : автореф. дис. ... канд. хим. наук / И. И. Маринайте. – Иркутск : Изд-во СО РАН, 2003. – 20 с.
10. Накопление полициклических ароматических углеводородов в хвое сосны обыкновенной на территории Прибайкалья / А. Г. Горшков [и др.] // Лесоведение. – 2008. – № 2. – С. 21–26.
11. Норкина Е. Ю. Влияние химических канцерогенов на морфологию проростка и дифференциацию трахеид *Picea abies* / Е. Ю. Норкина, Э. И. Слепян // Растения и химические канцерогены. – Л. : Наука, 1979. – С. 33–35.
12. Полициклические ароматические углеводороды в окружающей среде: источники, профили и маршруты превращения / А. Р. Суздорф [и др.] // Химия в интересах устойчивого развития. – 1994. – Т. 2, № 2. – С. 511–540.
13. Пшенин В. Н. Транспорт как источник полициклических ароматических углеводородов в окружающей среде / В. Н. Пшенин // Транспорт: наука, техника, управление. – М. : ВИНТИ, 1995. – № 8. – С. 2–19.
14. Ровинский Ф. Я. Фоновый мониторинг полициклических ароматических углеводородов / Ф. Я. Ровинский, Т. А. Теплицкая, Т. А. Алексеева. – Л. : Гидрометеиздат, 1988. – 224 с.
15. Содержание бенз(а)пирена в опадающих листьях *Crataegus curonica*, *Viburnum opulus*, *Salix aurita*, *Betula verrucosa* и в хвое *Pinus sylvestris* / Э. И. Слепян [и др.] // Растения и химические канцерогены. – Л. : Наука, 1979. – С. 177–179.
16. Угрехелидзе Д. Ш. Поступление и детоксикация органических ксенобиотиков в растениях / Д. Ш. Угрехелидзе, С. В. Дурмишидзе. – Тбилиси : Мецниереба, 1984. – 230 с.
17. Хвоя сосны как тест-объект для оценки распространения органических поллютантов в региональном масштабе / А. Г. Горшков [и др.] // Докл. Акад. наук. – 2006. – Т. 408, № 2. – С. 247–249.
18. Benzo(a)pyrene induces nuclear-DNA adducts in plant cell suspension culture: Detection by [32P] postlabelling / B. Rether [et al.] // FEBS Letters. – 1990. – Vol. 263, N 9. – P. 172–174.
19. Conifer needles as passive biomonitors of the spatial and temporal distribution of DDT from a point source / A. Di Guardo [et al.] // Chemosphere. – 2003. – Vol. 52, N 5. – P. 789–797.
20. Influence of the carcinogenic pollutant benzo[a]pyrene on plant development: fern gametophytes / V. Forrest [et al.] // Chemico-biological Interactions. – 1989. – Vol. 72, N 3. – P. 295–307.
21. Murashige T. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. A. Skoog // Plant Physiology. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
22. Naik G. R. Sugarcane Biotechnology / G. R. Naik. – Oxford and IBN Publishing Co, New Delhi, 2001. – 153 p.
23. The composition of aerosol over the East Siberia / T. V. Khodzher [et al.] // Journal of Aerosol Science. – 1999. – Vol. 30, suppl. 1. – P. 271–272.

Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons toxicity for plants

T. A. Mikhailova, V. N. Shmakov, E. N. Taranenko

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Irkutsk

Abstract. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) to the sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) suspension culture growth has been studied. For the experiments naphthalene, acenaphthene, acenaphthylene, phenanthrene, pyrene, fluoranthene were used in different concentrations. The results showed inhibitory effects in most cases, stimulatory effects were found for low concentrations only.

Key words: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), suspension cell culture, *Saccharum officinarum* L., biomass growth *in vitro*, phytotoxicity.

*Михайлова Татьяна Алексеевна
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
доктор биологических наук, зав. лабораторией
природных и антропогенных экосистем
тел. (3952)42-45-95, факс (3952)51-07-54
E-mail: mikh@sifibr.irk.ru*

*Mikhailova Tatyana Alekseevna
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
D. Sc. in Biology, Head of laboratory
phone: (3952)42-45-95, fax: (3952)51-07-54
E-mail: mikh@sifibr.irk.ru*

*Шмаков Владимир Николаевич
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
тел. (3952)42-49-03, факс (3952)51-07-54
E-mail: shmakovv@sifibr.irk.ru*

*Shmakov Vladimir Nikolaevich
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
Ph. D. of Biology, senior research scientist
phone: (3952)42-49-03, fax: (3952)51-07-54
E-mail: shmakovv@sifibr.irk.ru*

*Тараненко Екатерина Николаевна
Сибирский институт физиологии
и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132
ведущий инженер
тел. (3952)42-45-95, факс (3952)51-07-54
E-mail: taranenko@sifibr.irk.ru*

*Taranenko Ekaterina Nikolaevna
Siberian Institute of Plant Physiology
and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
leading engineer
phone: (3952)42-45-95, fax: (3952)51-07-54
E-mail: taranenko@sifibr.irk.ru*