

На правах рукописи

Масленко Елена Александровна

**ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗОЛА
(П-КСИЛОЛ И АРОМАТИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ)
И 2-МЕТИЛ-1,3-ДИОКСОЛАНА
НА ВОДОРОСЛИ И ВЫСШИЕ РАСТЕНИЯ**

03.00.16 - экология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Борок, 2006

Масленко

Работа выполнена в Тюменской государственной сельскохозяйственной академии (ТГСХА)

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, доцент Людмила Владимировна Михайлова

Научный консультант:

кандидат биологических наук, доцент Галина Александровна Петухова

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Виктор Трофимович Комов;

доктор биологических наук, профессор Олег Федорович Филенко

Ведущая организация: Московская государственная технологическая академия

Защита диссертации состоится «29» марта 2006 г. в «10⁰⁰» часов на заседании диссертационного совета К 002.036.01 в Институте биологии внутренних вод им. И.Д.Папанина по адресу: 152742 п. Борок, Некоузского района, Ярославской области, тел/факс (08547)24042

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии внутренних вод им. И.Д.Папанина РАН

Автореферат разослан « » 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета



Л.Г. Корнева

2006А
3842

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

Антропогенное воздействие на гидросферу – одна из первостепенных глобальных экологических проблем.

Среди веществ, попадающих в поверхностные водные объекты со стоками предприятий нефтяных, нефтеперерабатывающих и химических отраслей промышленности, одно из первых мест по разнообразию биологической активности занимают ароматические и гетероциклические соединения с двумя гетероатомами в цикле, особенно азот-, и кислородсодержащие (Ровинский и др., 1988; Елин, 2001; Левина, 2002). В эту группу входят бензол и его производные, а также диоксоланы. Некоторые из этих веществ являются исходными (2-метил-1,3-диоксолан и параксилол) и побочными (бензойная и пара-толуиловая кислоты) продуктами синтеза полиэфирных волокон (Благовещенский химический комбинат «Полиэф»), которые со сточными водами будут поступать в р. Белую – водоем высшей рыбохозяйственной категории и источник питьевого водоснабжения городов и населенных мест Башкортостана.

Анализ литературных источников свидетельствует о весьма ограниченной информации, позволяющей составить представление об экологической опасности этих веществ (Benville, 1977; Кондратьева, 2000). Хотя известно, что родоначальник класса ароматических соединений – бензол обладает выраженным токсическим и мутагенным действием как на теплокровных животных и человека, так и на водные организмы (Фельд, 1985; Peilak-Walker et. al., 1985; Тульчинская, 1986; Luce et. al., 1988; Вредные химические вещества, 1998).

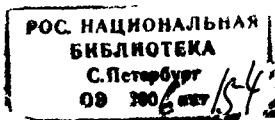
В этой связи, актуальным является выявление количественной зависимости между уровнями загрязнения среды некоторыми малоизученными производными бензола и диоксолана и биологическими эффектами на разных уровнях организации (молекулярном, клеточном, организменном, популяционном) продуцентов, являющихся ключевым звеном экосистемы.

Цель исследований

Оценить токсичность и генетическую опасность п-ксилола, бензойной и пара-толуиловой кислот, а также 2-метил-1,3-диоксолана для микроводорослей (*Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Vreb.), макрофитов (*Lemna minor* Linne) и высших наземных растений (*Tradescantia viridis* Linne, *Allium cepa* Linne).

Задачи исследований

1. Изучить влияние производных бензола и 2-метил-1,3-диоксолана на:
а) культуру микроводоросли *Scenedesmus quadricauda* по показателям выживаемости, соотношению живых и мертвых клеток, скорости размножения и темпу прироста, продукции и деструкции;



б) ряску *Lemna minor* по показателям выживаемости 7 поколений, приросту листецов, фотосинтезу, хромосомным aberrациям и гибели клеток корневой растения;

в) традесканцию *Tradescantia viridis* по показателям изменения роста листьев, стеблей и корней, частоте хромосомных aberrаций и гибели клеток в корнях, выживаемости всего растения:

г) лук *Allium cepa* по показателям роста листьев и корней, фотосинтетической активности, частоте хромосомных aberrаций и гибели клеток корней.

2. Сравнить водные и наземные растительные тест-объекты по чувствительности и устойчивости по отношению к исследуемым веществам.

3. Сравнить токсичность исследуемых веществ по отношению к растительным тест-объектам.

4. Определить токсикометрические параметры исследуемых веществ для водорослей, ряски, традесканции и лука как тест-объектов при установлении ПДК.

5. Определить возможные уровни воздействия исследуемых веществ, к которым растения могут адаптироваться.

6. Разработать метод определения стабильности веществ с помощью *Scenedesmus quadricauda*.

Научная новизна и теоретическое значение

1. Впервые установлено, что исследуемые вещества обладают мутагенным и токсическим действием на водоросли и высшие растения на всех уровнях организации: молекулярном, клеточном, тканевом, организменном, популяционном.

2. На 7-ми поколениях ряски показан характер кумулятивного токсикоза и определены пределы токсического воздействия исследуемых веществ, к которым могут адаптироваться растения.

3. Показана различная устойчивость и чувствительность водных и наземных растений к исследуемым веществам.

4. Разработан метод определения стабильности химических веществ с помощью *Scenedesmus quadricauda*, который оказался более чувствительным, чем традиционный дафниевый.

Практическое значение работы

1. Установлены токсикометрические параметры и дозоэффективные зависимости воздействия представителей двух классов химических веществ (ароматические и гетероциклические) на представителей водных и наземных растений.

2. Значительная часть полученных материалов вошла в научные отчеты по установлению ПДК параксилола, бензойной кислоты, пара-толуиловой кислоты и 2-метил-1,3-диоксолана для рыбохозяйственных водоемов.

3. Разработанные и утвержденные нормативы внедрены на предприятии «Полиэф» г. Благовещенск (Башкортостан), который впервые начинает выпускать полиэфирные волокна на основе терефталевой кислоты.

4. Установлена эколого-генетическая опасность стоков предприятия для поверхностных водоемов.

5. Материалы работы вошли в лекционный курс и спецпрактикум по водной токсикологии, прикладной экологии и прикладной гидробиологии для студентов Тюменской государственной сельскохозяйственной академии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Исследуемые вещества обладают токсическим действием на все уровни организации растений: молекулярный, клеточный, тканевый, организменный, популяционный.

2. Исследуемые вещества обладают мутагенным действием.

3. Растительные тест-объекты обладают различной устойчивостью и чувствительностью по отношению к данным веществам.

4. Особенностью действия исследуемых веществ является кумулятивный токсикоз, что показано на примере 7-ми поколений рыбки малой.

5. Растения обладают адаптивными возможностями по отношению к разным уровням воздействия исследуемых веществ.

Апробация работы

Материалы диссертации докладывались на Научно-практической конференции молодых ученых «Молодые ученые в решении проблем АПК» (Тюмень, 2003), на Международной конференции «Контроль и реабилитация окружающей среды» (Томск, 2004), на Всероссийской конференции «Актуальные проблемы экологии и охраны окружающей среды» (Уфа, 2004), на Международной конференции «Современные проблемы водной токсикологии» (Борок, 2005).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 работ, 2 находятся в печати.

Структура и объем работы

Материал изложен на 179 страницах машинописного текста, содержит 40 таблиц, 42 рисунка.

Работа состоит из введения, обзора литературы (глава 1), материала и методов исследования (глава 2), изложения полученных результатов (главы 3), обсуждения результатов (глава 4), выводов, списка используемых источников (230 отечественных и 45 иностранных источников) и 4 приложений.

Глава 1. В главе приведены данные влияния ароматических углеводородов, ароматических кислот и эфиров гетероциклического ряда на разных представителей первичного трофического звена.

Глава 2. Материал и методики

Исследованы вещества, участвующие в процессе получения терефталевой кислоты (парахиллол и 2-метил-1,3-диоксолан), которая является исход-

ным продуктом для синтеза нетканых материалов на химическом комбинате «Полиэф» (Башкортостан), и побочные продукты синтеза - бензойная и пара-толуиловая кислоты.

По физическим свойствам вещества являются летучими (п-ксилол, диоксолан), плохо растворимыми (толуиловая кислота, п-ксилол) и хорошо растворимыми (бензойная кислота, диоксолан) в воде. Ароматические кислоты представляют собой бесцветные кристаллы, параксилол и диоксолан - бесцветные прозрачные жидкости.

В качестве тест-объектов использовали культуру пресноводной хлорококковой микроводоросли (*Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb.) в фазе экспоненциального роста, высших водных (ряска *Lemna minor* Linne) и наземных (традесканция *Tradescantia viridis* Linne и лук репчатый *Allium cepa* Linne) растений.

В число исследуемых тест-функций вошли: хромосомные aberrации и гибель клеток в корнях растений, изменение содержания пигментов фотосинтеза высших растений и продукционных показателей водорослей, морфометрические параметры листьев, корней, стеблей, выживаемость и устойчивость испытуемых растений, исследование темпа размножения водорослей.

Генотоксичность веществ исследовали по числу ХА в делящейся зоне корней растений. В качестве красителя использовали 2 % раствор ацетоорсеина, в который корешки (0,8-1 см) помещались на 15 мин. После окрашивания препараты микроскопировали при увеличении 8 * 40. В ходе анализа учитывали количество клеток с нормальными и нарушенными анафазами (Немцова, 1970; Бочков и др., 1972; Временное методическое руководство ..., 2002).

Выживаемость клеток водорослей определяли согласно методике В.Г. Хоботьева (1971), используя в качестве красителя раствор метиленового синего в фосфатном буфере с рН 4.6.

Определение ассимилирующей способности проводили согласно методике Az-pH-теста по Т.К. Мосиенко (Методические указания ..., 1989). Кислород определяли по методу Винклера (Алекин и др., 1973).

Продукционно-деструкционный тест (*Scenedesmus quadricauda*) использовали также для определения стабильности пара-толуиловой кислоты и метил-диоксолана. Тестировали 1, 3, 5, 10, 20, 30 суточные растворы.


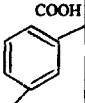
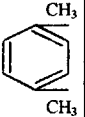
Для определения концентрации пигментов готовили спиртовой экстракт из листьев растений. После центрифугирования в надосадочной жидкости определяли концентрацию пигментов фотосинтеза на приборе «Сресол» при длинах волн 662, 644, 440 нм (Методические указания..., 1989).

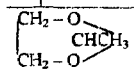
Все опыты проводились согласно стандартным методикам (Методические указания ..., 1989; Методическое руководство ..., 1991; Методические указания ..., 1998; Временное методическое руководство ..., 2002).

Статистическая обработка данных и корреляционный анализ выполнены по общепринятым методам (Лакин, 1980).

Объем токсикологических исследований и показателей токсичности приведен в таблице 1.

Таблица 1. Объекты исследования, методики и количество проб

Объекты исследования	Показатели, длительность опытов, концентрации	Вещества	Количество проб	Количество экземпляров	Методики
Водоросли (<i>Scenedesmus quadricauda</i> Turp.) Breb.)	Выживаемость, численность (N), коэффициент прироста численности (K _n), темп деления (G), продукция и деструкция, изменение pH среды 28 сут 0,001-5000 мг/л	Бензойная кислота (БК) Паратолуиловая кислота (п-ТК) Параксиллол (п-К) 2-метил-1,3-диоксолан (МД)	341 <u>БК</u> COOH 	-	Методические указания..., 1989; 1998; Временное методическое руководство..., 2002; Хоботьев и др., 1971
Макрофиты (<i>Lemna minor</i> Linne)	Выживаемость, длина листочков, пигментный состав, гибель клеток корневых, хромосомные aberrации в клетках корней 28 сут 0,01-1000 мг/л	БК п-ТК п-К МД	280 <u>п-ТК</u> COOH  CH ₃	2800	Методическое указание..., 1998; Временное методическое руководство..., 2002; Немцова, 1970; Бочков и др., 1972; Хоботьев и др., 1971
Высшие растения (<i>Tradescantia viridis</i> Linne)	Выживаемость, длина стебля, кол-во междоузлий, длина верхушечного листа, пигментный состав, число и длина корней, гибель клеток корней, хромосомные aberrации в клетках корней 28 сут 0,01-1000 мг/л	БК	42 <u>п-К</u> CH ₃  CH ₃	105	Временное методическое руководство..., 2002; Немцова, 1970; Бочков и др., 1972

<i>Allium cepa</i> Linne)	Выживаемость, масса лука, число и длина листьев лука, пигментный состав, число и длина корней, гибель клеток корней, хромосомные aberrации в клетках корней 20 сут 0,01-1000 мг/л	п-ТК	105	105	Willey, 1993, Немцова, 1970; Бочков и др., 1972; Хоботьев и др., 1971
			МД		

Автор выражает глубокую благодарность к б.н. Галине Александровне Петуховой за теоретическую и практическую подготовку при определении хромосомных aberrаций в клетках и помощь при постановке опытов с рыской, а также всем сотрудникам кафедры гидрoэкологии и реабилитации водоемов за помощь и поддержку.

Особую признательность и благодарность выражаю моему научному руководителю к.б.н Людмиле Владимировне Михайловой.

Глава 3. Результаты исследований

1. Исследование токсического и мутагенного действия п-ксилола, ароматических кислот и 2-метил-1,3-диоксолана на водоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb.

Снижение численности водорослей в растворах ароматических кислот (бензойная кислота, пара-толуиловая кислота) отмечалось как в остром, так и в хроническом эксперименте, усиливаясь с ростом концентрации и удлинением срока воздействия. Параксиллол является плохо растворимым и сильно летучим веществом, в относительно небольших концентрациях он вызывал полную (LC₁₀₀ - 86 мг/л) и частичную (LC₅₀ - 43 мг/л) гибель популяции водорослей.

Численность клеток снижалась против контроля в растворах бензойной и пара-толуиловой кислот – с 4 сут, параксиллола – с 7 сут и диоксолана – с 21 сут (рис. 1-4).

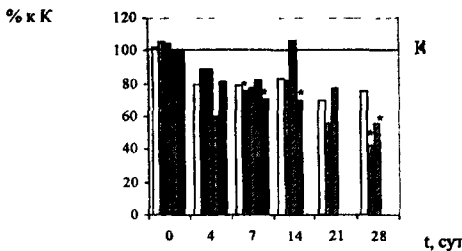


Рис 1 Изменение численности клеток водорослей в опытах с БК

□ 3,9 ■ 15,6 ■ 62,5 ■ 250 ■ 500 мг/л

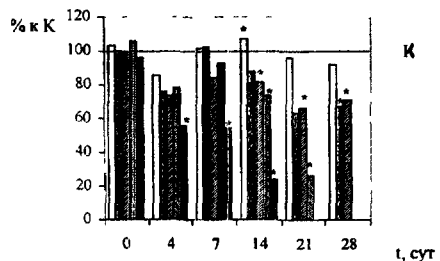


Рис 2 Изменение численности клеток водорослей в опытах с п-ТК

□ 50 ■ 100 ■ 250 ■ 500 ■ 1000 мг/л

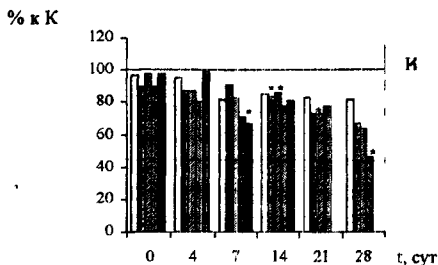


Рис 3 Изменение численности клеток водорослей в опытах с п-К
□ 0,9 ■ 4,3 ■ 8,6 ■ 43 ■ 86 мг/л

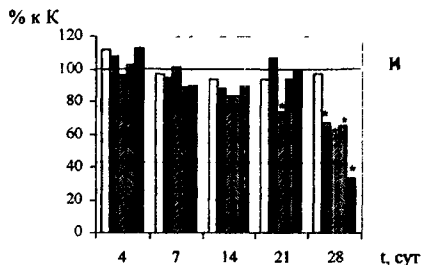


Рис 4 Изменение численности клеток водорослей в опытах с МД
□ 10 ■ 40 ■ 200 ■ 1000 ■ 5000 мг/л

Снижение численности культуры *Scenedesmus quadricauda* в растворах исследуемых веществ было обусловлено как высокой гибелью клеток, так и изменением темпа размножения. Рост числа мертвых клеток выше К в 2-3 и в 3-5 раз раз в опытах с п-К и БК сопровождался компенсаторным ускорением темпа размножения водорослей в течение первых 7 сут. К концу эксперимента, вероятно, в результате накопления исследуемых веществ культурой, темп размножения замедлялся (БК и МД – к 28 сут, п-К и п-ТК – с 21 сут), что отразилось на приросте численности и выживаемости культуры.

Причиной гибели клеток водорослей могло быть изменение физико-химических свойств растворов ароматических кислот. Резкое изначальное снижение рН до 4-5 в растворах БК и п-ТК (500-1000 мг/л) на фоне прямого токсического действия приводило к быстрой гибели низко резистентных клеток и снижению численности культуры клеток в относительно короткие сроки.

На продукционные показатели *Scenedesmus quadricauda* наибольшее влияние оказывает параксиллол, который снижал как валовую продукцию, так и деструкцию, начиная с концентрации 0,01 мг/л, причем деструкция угнеталась в большей степени, в связи с чем возрастали показатели чистой продукции (табл. 2).

Таблица 2. Влияние исследуемых веществ на продукционные показатели *Sc. quadricauda* (24 ч), % к К

Показатели	Концентрации, мг/л						
	БК						
	К (0,0)	0,04	0,2	1,0	5,0	50,0	500,0
Φ _{вал}	100,0	83,7	59,2*	91,8	10,2*	53,1*	0,0*
Д	100,0	133,3	333,3*	1000,0*	2900,0**	2933,3**	33,3*
Φ _{чист}	100,0	80,4	41,3*	32,6*	0,0***	0,0***	0,0**
	п-ТК						
	К (0,0)	25,0	50,0	100,0	250,0	500,0	1000,0
Φ _{вал}	100,0	98,2	95,3*	83,7***	52,3***	15,1***	10,5***
Д	100,0	114,3	340,0**	280,0**	220,0**	200,0*	200,0*
Φ _{чист}	100,0	93,0	80,2***	71,6***	42,0***	3,7***	0,0***

Продолжение табл. 2

Показатели	п-К								
	К (0,0)	0,005	0,01	0,1	0,9	4,3	8,6	43,0	86,0
Ф _{вал}	100,0	100,0	81,0*	79,0*	89,0*	112,8*	110,8*	120,0*	109,7*
Д	100,0	104,6	72,2*	72,0*	56,0*	56,0*	56,0*	36,0*	20,0*
Ф _{чист}	100,0	85,0	90,0	90,0	183,0*	150,0*	150,0*	150,0*	216,7*
	МД								
	К (0,0)	10,0	40,0	200,0	1000,0	5000,0			
Ф _{вал}	100,0	96,5	93,1	127,6*	3,4***	0,0***			
Д	100,0	85,7	114,3	585,7***	1357***	1357***			
Ф _{чист}	100,0	104,5	86,4*	0,0***	0,0***	0,0***			
Примечание: Ф _{вал} – валовая продукция фотосинтеза; Д – деструкция; Ф _{чист} – чистая продукция фотосинтеза									

Из всех исследуемых веществ п-К существенно и дозозависимо снижал показатель деструкции. В связи с этим, начиная с концентрации 0,9 мг/л и выше, на 50-117 % возрастал показатель чистой продукции, в то время как валовая продукция в концентрациях 4,3-86,0 мг/л возрастала незначительно (10-20 %), хотя и статистически достоверно. Другие исследуемые вещества значительно стимулировали деструкцию, начиная с 0,2 мг/л (БК), 50 мг/л (п-ТК) и 200 мг/л (МД), и снижали валовую продукцию прямо пропорционально концентрациям исследуемых веществ, при этом показатель чистой продукции снижался до нуля.

Использование показателя продукционных процессов в качестве критерия оценки стабильности веществ (п-ТК и МД) позволило установить высокую чувствительность метода. По показателям функциональной активности водорослей п-ТК является стабильным веществом, поскольку даже через 30 сут хранения значения величин продукции в опыте не приближаются к контрольному значению. К 10-20 сут хранения раствор п-ТК становится даже более токсичным для водорослей, чем изначально, что может свидетельствовать о накоплении продуктов распада, более токсичных, чем исходное вещество.

Деструкция МД происходит замедленными темпами и в относительно низкой (пороговой) концентрации стимулирует продукцию органического вещества водорослями. Причем, чем дольше хранится раствор вещества, тем сильнее стимуляция, т.е. сам МД и продукты его распада обладают эвтрофирующим действием. Валовая продукция сценедесмуса возрастала с удлинением срока хранения МД, который сохранял высокую биологическую активность на протяжении 10 сут. Биологическая активность МД и продуктов его распада проявлялась в ускорении продуцирования органического вещества, что со временем истощало энергетические ресурсы клеток и вызывало их гибель.

Таким образом, наиболее токсичным для *Scenedesmus quadricauda* является параксиллол, для которого минимальная полумлетальная хроническая концентрация равна 8,6 мг/л, полуэффетивная – 0,9 мг/л, пороговая – 0,01 и

максимально допустимая – 0,005 мг/л. Для остальных веществ полулетальная концентрация на порядок (п-ТК), два порядка (БК) и три порядка (МД) выше. По снижению токсичности для *Scenedesmus quadricauda* вещества можно ранжировать следующим образом: п-К – БК – п-ТК – МД.

2. Исследование токсического и мутагенного действия п-кислота, ароматических кислот и 2-метил-1,3-диоксолана на ряску *Lemna minor* Linne.

Исследование токсичности 4-х веществ для ряски малой показало, что данный тест-объект обладает высокой устойчивостью, но и высокой чувствительностью к действию токсикантов. Опасность исследуемых нами веществ усугубляется тем, что они вызывают в клетках корней растений хромосомные aberrации. В опытах с ряской в концентрациях 0,1 мг/л п-ТК и МД, 1,0 мг/л – п-К и 10,0 мг/л – БК число клеток с нарушениями хромосом в 2-6 раз превышало контроль. Наблюдалась высокая положительная корреляция между показателями числа хромосомных aberrаций и гибелью клеток (г - выше 0,7) (рис.5).



Рис 5 Хромосомные aberrации в клетках корней ряски малой к концу опыта

—●— БК —●— п-ТК —▲— п-К —×— МД

Известно, что ароматические углеводороды влияют на содержание нуклеиновых кислот, состав и содержание свободных нуклеотидов в клетке, в связи с чем происходят изменения в первичной структуре ДНК и процессе биосинтеза нуклеиновых кислот (Дивавин, 1985). Хромосомные перестройки могут быть одной из причин гибели клеток в тканях (Инге-Вечтомов, 1989; Ильинских и др., 1992), что подтвердили и наши исследования. В опытах с высоким процентом хромосомных aberrаций возрастала и доля мертвых клеток в корнях растений.

Исследуемые вещества в разной степени влияли на состояние клеток корней ряски малой. Так, БК, п-ТК и п-К увеличивали процент мертвых клеток примерно в одинаковой степени (200-227 % к К), начиная с концентрации 1,0-0,9 мг/л. Эффект действия МД начинался с меньшей концентрации 0,1 мг/л, что говорит о повышенной его токсичности по отношению к ряске. В концентрации 1,0 мг/л МД ряска погибла, а в 10 мг/л БК наблюдалась наи-

большая гибель клеток (в 4 раза против контроля) по сравнению с п-ТК и п-К (рис. 6).

% к К

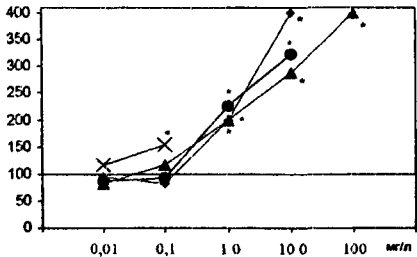


Рис 6 Гибель клеток в корнях ряски в растворах веществ к концу опыта

—●— БК —●— п-ТК —▲— п-К —×— МД

Таким образом, корневая система одной из первых реагировала на проявление токсического действия исследуемых веществ.

Опосредовано влияя на ход энергетических процессов, связывая активный кислород и препятствуя развитию перекисного окисления, тем самым предотвращая повреждение ДНК, белков и липидов, могут растительные пигменты, в частности каротиноиды (Лукьянова, 2001).

Все исследуемые нами вещества, начиная с концентрации 0,1-1,0 мг/л, вызывали снижение хлорофиллов (рис. 7) и каротиноидов в листьях ряски.

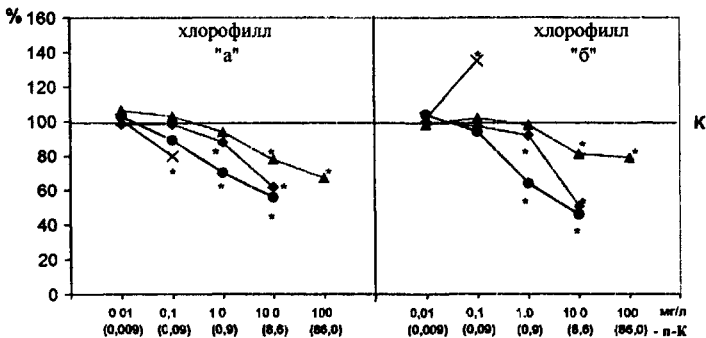


Рис 7 Содержание пигментов фотосинтеза ряски *L. tinog* в растворах исследуемых веществ к 28 сут опыта, % к К

—●— БК —●— п-ТК —▲— п-К —×— МД

Низкие концентрации МД увеличивали содержание хлорофилла «б» на фоне снижения хлорофилла «а». Наибольшее снижение по отношению к К хлорофиллов «а» и «б» было зафиксировано при действии п-ТК - 55,9 и 46 % соответственно. Менее других веществ влияние на функциональную активность ряски оказывал параксилл, поскольку снижение содержания пигментов начиналось в растворе с концентрацией 8,6 мг/л, в растворах других веществ - с концентрации 0,1 мг/л.

Концентрация каротиноидов в листецах ряски снижалась при действии трех веществ: ароматические кислоты в равной степени снижали количество каротиноидов, начиная с концентрации 1,0 мг/л – на 42-57 %, а п-К - на 25-30 %. МД увеличивал содержание каротиноидов в ряске в концентрации 0,1 мг/л на 22 %. Снижение концентрации пигментов свидетельствует о серьезных нарушениях в работе фотосинтетического аппарата, которые могут быть причиной гибели клеток или всего растения (Дмитриева, 1989).

Изменения на клеточном уровне привели к серьезным перестройкам в нормальном функционировании и к снижению жизнеспособности всего растения в целом. Угнетение зеленой части растений вызывали все исследуемые вещества. Наибольшее негативное влияние на пророст и состояние листецов ряски оказывал 2-метил-1,3-диоксолан (табл. 3), который снижал как среднюю длину, так и выживаемость листецов в концентрации 1 мг/л. Гибель всего растения наблюдалась в концентрациях на 3-4 порядка более высоких, чем функциональные нарушения и гибель отдельных клеток. Ряска погибала полностью в концентрациях: 100 мг/л - пара-толуиловой и бензойной кислот, 860 мг/л - параксилола и 1,0 мг/л - диоксолана. Это свидетельствует о высокой токсичности МД по отношению к *Lemna minor*.

Токсический эффект исследуемых веществ на разных уровнях организации (молекулярном, клеточном, тканевом, органном, организменном, популяционном) наглядно иллюстрируют результаты опыта на 7 поколениях ряски малой (табл. 3). К МД наименее резистентным оказалось поколение F₁. Листецы этого поколения погибали в растворах, содержащих 1000-10 мг/л к 4-8 сут. В концентрации 1 мг/л четко прослеживался кумулятивный токсикоз, вызванный МД, а также роль гетерогенности популяции в выживании поколений. Из двух ароматических кислот БК оказалась более токсичной. К экстремально высокой концентрации (1000 мг/л) БК наименее устойчивым является поколение F₁, которое погибло к 8 сут, не оставив потомства. В аналогичной концентрации п-ТК к концу периода наблюдений погибло 65 % листецов в F₁, выжившие растения дали потомство (F₂) со сниженной устойчивостью (табл. 3), которое полностью погибло.

Ряска малая может адаптироваться к концентрациям п-К до 86 мг/л, несмотря на наблюдаемые отклонения от нормы на молекулярном и клеточном (пигменты фотосинтеза, хромосомные аберрации, гибель наименее резистентных клеток в корнях), а также организменном (задержка роста) уровнях. При действии других исследуемых веществ этот порог ниже: МД – до 0,1 мг/л, БК и п-ТК – до 10 мг/л.

Таким образом, сравнивая между собой исследуемые вещества по их действию на ряску малую, видим, что наиболее токсичным является 2-метил-1,3-диоксолан. По уменьшению выраженности летального действия (LT₅₀ в концентрации 100 мг/л) их можно расположить в следующий ряд: МД – БК - п-ТК - п-К.

Таблица 3. Выраженность токсических эффектов исследуемых веществ в разных концентрациях в тестах на рыске малой

С, мг/л	Проявление токсического эффекта																на уровне функциони- рования клетки	на уровне жизнеспособности клетки	мутаген- ный эф- фект
	при учете выживаемости листцов							на морфологическом уровне											
	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇					
Бензойная кислота																			
К	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-	-
0,01	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-	-
0,1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-	-
1	--+	---	---	--+	---	-++	--	--+	--+	---	---	+++	---	--	+++	+	+	-	
10	--+	+++	--+	+++	--+	-++	-+	--+	-++	-++	-++	+++	+++	-+	+++	+	+	+	
100	-++	гиб.						-++											
1000	гиб.																		
Пара-толуиловая кислота																			
К	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-	-
0,01	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-	-
0,1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-	-
1	--+	---	---	---	---	---	---	---	-+	-+	-+	-+	---	---	+++	+	+	+	
10	--+	--+	--+	--+	--+	-++	-+	-++	-++	-++	-++	+++	-++	-+	+++	+	+	+	
100	--+	+++	+++	+++	+++	гиб		-++	-++	+++	+++	+++	гиб						
1000	-++	гиб						-++	-++										

С, мг/л	Проявление токсического эффекта																мутаген- ный эф- фект	
	при учете выживаемости листцов							на морфологическом уровне							на уровне функциони- рования клетки	на уровне жизнеспос- обности клетки		
	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆	F ₇				
Параксиллол																		
К	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-	-	
0,009	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-	-	
0,09	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-	-	
0,9	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-	-	
8,6	---	--+	-++	-++	-++	-++	-	-++	-++	-++	-++	-++	-++	-++	-++	+++	+	+
86,0	--+	+++	+++	-++	-++	-++	-	-++	-++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+++	+	+
860,0	-++	+++	гиб.															
2-метил-1,3-диоксолан																		
К	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-	-	
0,01	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-	-	
0,1	---	--+	---	---	---	---	---	--+	-++	-++	-++	-++	-++	---	---	+++	+	+
1	-++	-++	-++	-++	-++	гиб.		-++	-++	-++	-++	+++						
10	-+гиб.							-++										
100	гиб.																	
1000	гиб.																	

Примечание: «-» - отсутствие эффекта; «+» - присутствие токсического эффекта

3. Исследование токсического и мутагенного действия бензойной и пара-толуиловой кислот на наземные растения *Tradescantia viridis* Linne и *Allium cepa* Linne.

Наиболее устойчивыми тест-объектами к ароматическим кислотам оказались наземные растения (*T. viridis*, *A. cepa*), поскольку полной гибели традесканции и лука не вызывали даже максимальные концентрации (1000 мг/л). Известно, что представители высших растений могут регулировать степень накопления токсических веществ в тканях, проявляя значительную устойчивость к токсическому действию (Бреховских и др., 2001; Пасичная, Арсан, 2003). Однако отсутствие гибели растений к концу периода исследований не исключает морфофункциональных нарушений в органах, тканях и клетках. БК и п-ТК изменяли прирост зеленой массы растений: стебля и листьев традесканции и листьев лука (рис. 8, 9).

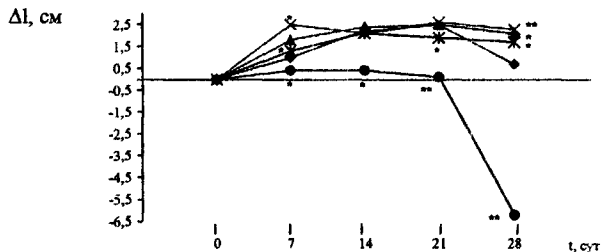


Рис 8 Прирост длины стебля традесканции в опытах с бензойной кислотой, см

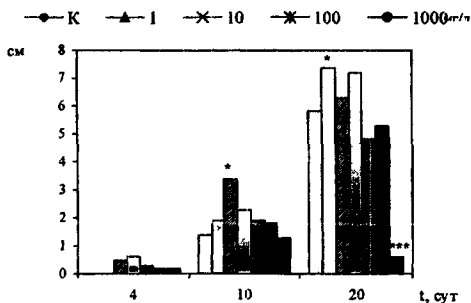


Рис 9 Изменение средней длины листьев

лука в опытах с п-ТК, см
 □ К □ 0,01 ■ 0,1 □ 1 ■ 10 ■ 100 ■ 1000 мг/л

Ароматические кислоты (1000 мг/л) вызывали резкое угнетение роста листьев лука (прирост практически отсутствовал) и отмирание нижней части стебля традесканции (наблюдалось сильное отставание в росте). Стимулирующий эффект малыми и средними концентрациями имел место в растворах пара-толуиловой кислоты до концентрации 1,0 мг/л и бензойной кислоты в концентрациях 1-100 мг/л.

Под влиянием разных концентраций исследуемых веществ обнаружались различные изменения в листьях – изменение цвета, появление обесцвеченных и бурых пятен, отставание в росте. Листья традесканции теряли пигмент и бурели в максимальной концентрации БК, в листьях лука максимальная концентрация п-ТК вызвала снижение содержания хлорофиллов и каротиноидов в 2 раза против К (табл. 4).

Таблица 4. Изменение пигментного состава листьев традесканции (БК) и лука (п-ТК) к 28 сут опыта, % к К

Концентрация, мг/л	Содержание хлорофилла «а»		Содержание хлорофилла «б»		Соотношение хлорофиллов «а»/«б»		Содержание каротиноидов	
	БК	ТК	БК	ТК	БК	ТК	БК	ТК
К	100	100	100	100	2,1	1,8	100	100
0,01	120	99	147#	133#	1,7	1,3	131#	115
0,1	119	91	103	132 #	2,4	1,2	123	107
1,0	156#	108	139#	195#	2,4	1,0	161#	135#
10,0	186#	105	152#	114	2,6	1,6	184#	101
100,0	156*	165#	163*	219#	2,0	1,3	156*	185#
1000,0	92	50*	113	59*	1,7	1,5	108	59*

Примечание: # - разница с К >25%, * - P<0,05

В средних концентрациях БК и п-ТК (1-100 мг/л) содержание пигментов возрастало против К в 1,4-2,2 раза, что свидетельствует о включении защитных механизмов растения.

Большие концентрации угнетали рост листьев, стеблей, снижали массу луковиц. По показателю роста растений в растворах исследуемых ароматических кислот установлена полуживотная концентрация - $EC_{50}=1000-1800$ мг/л. Малые и средние концентрации (с 0,1 мг/л) стимулировали прирост листьев и корней.

Следует отметить, что у высших наземных растений, так же как и у водных (ряска), более чувствительными органами по отношению к исследуемым веществам были корни (рис. 10, 11).

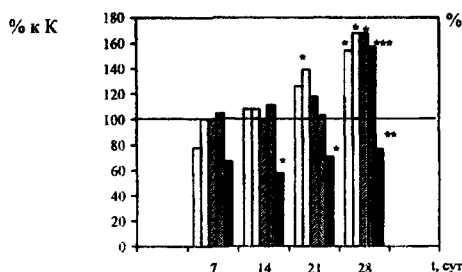


Рис 10 Изменение средней длины корней традесканции в опытах с БК
□ 0,01 □ 0,1 ■ 1 ■ 10 ■ 100 мг/л

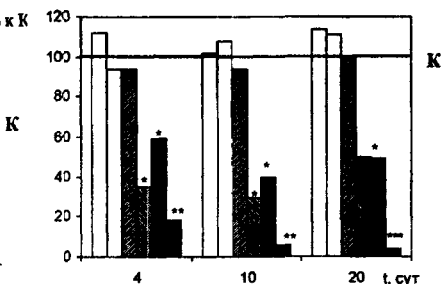


Рис 11 Изменение средней длины корней лука в опытах с п-ТК
□ 0,01 □ 0,1 ■ 1 ■ 10 ■ 100 ■ 1000 мг/л

Ароматические кислоты ощутимо подавляли прирост корней, начиная с концентрации 10 мг/л п-ТК и 100 мг/л БК. В то же время малые и средние концентрации БК стимулировали рост корней.

Вместе с тем, в малых концентрациях обеих кислот наблюдалось увеличение гибели клеток в корнях и рост хромосомных перестроек в клетках. Причем нарушения хромосом предшествовали гибели клеток. Это было хорошо прослежено в опытах с традесканцией (рис. 12).



Рис 12 Частота хромосомных нарушений (А) и гибель клеток (В) в корнях традесканции в опытах с БК

●—0,01 ■—0,1 ▲—1 ×—10 *—100 мг/л

В опытах с п-ТК наблюдалась прямая зависимость между числом хромосомных аберраций в клетках корней лука, концентрацией веществ и сроком воздействия.

Наибольшая гибель клеток корней в растворах ароматических кислот была зафиксирована на 21 сут у традесканции и на 20 сут у лука, то есть примерно в один срок. Недействующей концентрацией для обеих кислот установлена концентрация 0,01 мг/л.

Таким образом, функциональные показатели высших растений нарушались в значительно более низких концентрациях, чем морфометрические показатели и выживаемость растений. Наименее резистентные клетки в корнях начинали погибать в очень низких концентрациях (0,1-1,0 мг/л), чему предшествовало возникновение ХА в концентрациях 0,01-0,1 мг/л.

По результатам исследований были установлены токсикометрические параметры для наземных растений. Для традесканции $LC_{50}^{28 \text{ сут}}$ составила 1000 мг/л, для лука эта величина была выше (>1000 мг/л). На пигментную и корневую системы большее влияние оказывала бензойная кислота: пороговая концентрация для БК составила 0,01 и 0,004 мг/л соответственно, а для п-ТК - 0,1 мг/л для обеих систем.

Зона токсического действия ароматических кислот по отношению к наземным растениям шире, чем к водным: от 0,004 до 1000 мг/л (традесканция, лук), от 0,01 до 100 мг/л (ряска). Эффект проявления мутагенного действия ароматических кислот в корнях высших растений обнаруживался в концен-

трациях 0,01-0,1 мг/л, в корнях ряски – в 1-10 мг/л. То есть по данному показателю высшие растения оказались более чувствительными, чем макрофиты.

Выполненные исследования позволили установить, что наименее устойчивым тест-организмом к действию исследуемых веществ является ряска малая, а наиболее устойчивым – традесканция.

По чувствительности (продукция для *Sc. quadricauda* и пигменты – для остальных растений) более чувствительной к МД, БК и п-ТК является ряска, к п-К – сценедесмус.

Наиболее токсичным по отношению к водорослям является параксилол, к макрофитам – диоксолан, к высшим наземным растениям – бензойная кислота.

ВЫВОДЫ:

1. Токсический эффект исследуемых веществ проявляется на всех уровнях организации: молекулярном (пигменты фотосинтеза, хромосомные aberrации), клеточном (гибель клеток), тканевом (морфологические нарушения), организменном (выживаемость, продукционно-деструкционные показатели), популяционном (изменение темпа размножения, численности).

2. Выраженность токсического эффекта зависит от величины концентрации исследуемых веществ:

а) вызывают гибель:

-водных и наземных высших растений – параксилол, бензойная и пара-толуиловая кислоты в концентрациях от 860-1000 мг/л;

-водорослей и макрофитов (ряска) – бензойная и пара-толуиловая кислоты от 10-100 мг/л;

-макрофитов – 2-метил-1,3-диоксолан от 1,0 мг/л.

Хроническая летальная концентрация метил-диоксолана (LC_{50} за 28 сут) для ряски равна 1,0 мг/л, для водорослей – 5000 мг/л.

б) концентрация 0,1 мг/л бензойной кислоты и 2-метил-1,3-диоксолана и 1,0 мг/л пара-толуиловой кислоты и параксилола не вызывают гибели растений в течение 20-30 сут, но изменяют численность и темп размножения водорослей, угнетают продукционные процессы, увеличивают частоту хромосомных aberrаций, снижают выживаемость, репродуктивный потенциал, рост и функциональную активность (фотосинтез) водных и наземных высших растений;

в) концентрация 0,01 мг/л 2-метил-1,3-диоксолана, бензойной и пара-толуиловой кислот и 0,09 мг/л параксилола не изменяют ни один из изученных показателей, т.е. являются не действующими (МДК).

3. Бензойная и пара-толуиловая кислоты в концентрациях 500 мг/л и выше резко снижают pH среды, что усиливает их токсическое действие на жизнедеятельность продуцентов.

4. По степени возрастания токсичности для водорослей исследуемые вещества располагаются следующим образом: 2-метил-1,3-диоксолан – бензойная кислота – пара-толуиловая кислота – параксилол; для ряски: параксилол – пара-толуиловая кислота – бензойная кислота – метил-диоксолан. Сле-

довательно, водоросли более устойчивы к 2-метил-1,3-диоксолану и бензойной кислоте, ряска – к параксилолу и пара-толуиловой кислоте. По возрастанию чувствительности к ароматическим кислотам (по величинам пороговых концентраций) используемые в опытах растения расположились следующим образом: водоросли – высшие наземные растения – ряска. Наиболее чувствительными тест-функциями у водорослей являются показатели продукции и деструкции, для высших водных и наземных растений – содержание пигментов фотосинтеза, хромосомные aberrации и гибель клеток корней.

5. Все исследуемые вещества вызывают хромосомные aberrации, следовательно, обладают мутагенным действием.

6. На 7 поколений ряски *Lemna minor* определены возможные уровни, до которых растения могут адаптироваться: 2-метил-1,3-диоксолан – 0,1 мг/л, бензойная и пара-толуиловая кислоты – 10 мг/л, параксилол – 86 мг/л.

7. Предложенный метод определения стабильности химических веществ с помощью *Scenedesmus quadricauda* по показателям продукционно-деструкционных процессов чувствительнее традиционного дафниевое и позволяет зафиксировать момент появления более токсичных, чем исходное вещество, промежуточных продуктов распада.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Соколовская (Масленко) Е.А., Михайлова Л.В. Изменение функциональных показателей одноклеточной водоросли *Scenedesmus quadricauda* под воздействием п-ксилола // Молодые ученые в решении проблем АПК: Сборник статей. – Тюмень: ТГСХА, 2003. - Ч. 2. - С. 84-87.

2. Соколовская (Масленко) Е.А., Михайлова Л.В. Исследование токсичности бензойной кислоты на протококковой водоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Vreb. // Молодые ученые в решении проблем АПК: Сборник статей. - Тюмень: ТГСХА, 2003. - Ч. 2. - С. 88-91.

3. Соколовская (Масленко) Е.А., Михайлова Л.В. Влияние толуиловой кислоты на рост и размножение водоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Vreb. // Молодые ученые в решении проблем АПК: Сборник статей. – Тюмень: ТГСХА, 2003. - Ч. 2. - С. 92-95.

4. Соколовская (Масленко) Е.А., Михайлова Л.В. Выявление максимально-допустимой концентрации 2-метил-1,3-диоксолана для водоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Vreb. // Молодые ученые в решении проблем АПК: Сборник статей. – Тюмень: ТГСХА, 2003. - Ч. 2. - С. 96-100.

5. Михайлова Л.В., Соколовская (Масленко) Е.А. Влияние ароматических кислот на водоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Vreb. // Контроль и реабилитация окружающей среды: Материалы международной конференции 21-23 июля 2004 г. – Томск, 2004. - С. 173-174.

6. Михайлова Л.В., Соколовская (Масленко) Е.А. Влияние ароматических углеводородов на функциональные показатели водоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Vreb. // Биотехнология – охрана окружающей среды: Труды Международного биотехнологического центра МГУ. 25-27 мая 2004 г. - М.: Спорт и Культура, 2004. - Ч. 2. - С. 23-25.

7. Михайлова Л.В., Петухова Г.А., Соколовская (Масленко) Е.А. Влияние ароматических кислот на ряску малую *Letna minor Linne* // Аграрная наука на современном этапе: Сборник научных трудов, посвященный 45-летию академии и 60-летию Тюменской области. – Тюмень: ТГСХА, 2004. – С. 54-57.

8. Михайлова Л.В., Петухова Г.А., Соколовская (Масленко) Е.А. Исследование токсичности и мутагенности 2-метил-1,3-диоксолана на макрофитах // Актуальные проблемы экологии и охраны окружающей среды: Тез. докл. Всероссийской конференции молодых ученых и студентов. – Уфа: РИО БашГУ, 2004. – С. 68-69.

9. Масленко Е.А., Данилова Т.А. Использование Allium-теста в оценке токсичности пара-толуиловой кислоты // Современные проблемы водной токсикологии: Тезисы Международной конференции памяти доктора биологических наук, профессора Б.А. Флерова. 20-24 сентября 2005 г. – Борок, 2005. – С. 92-93.

10. Михайлова Л.В., Петухова Г.А., Соколовская (Масленко) Е.А. Ряска малая как важный тест-объект при установлении токсичности параксилы // Современные аспекты экологии и экологического образования: Сб. докл. Всерос. научной конфер. – Казань, 2005. – С. С 459-462.

11. Масленко Е.А. Устойчивость и чувствительность поколений ряски *Letna minor* к действию ароматических соединений // Экология пресноводных экосистем и состояние здоровья населения: Тез. научной конфер. - Оренбург, 2006. – С.44.

12. Масленко Е.А. Исследование токсичности и генетической опасности бензойной кислоты для водорослей и высших растений // Биология внутренних вод. – Борок, 2006 (в печати).

13. Масленко Е.А., Михайлова Л.В., Петухова Г.А., Данилова Т.А. Экологическая опасность одного из производных бензола – пара-толуиловой кислоты для низших и высших растений. - Известия ТИПРО. – 2006 (в печати).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И АББРЕВИАТУР

- БК - бензойная кислота
БП - 3,4-бенз(а)пирен
ЕС - эффективная концентрация
К - контроль
МД - метил-диоксолан
МДК - максимальная допустимая концентрация
ПАУ - полициклические ароматические углеводороды
ПДК_p - предельно допустимая концентрация вещества для рыбохозяйственных водоемов
ПК - пороговая концентрация
п-К - параксилол
п-ТК - пара-толуиловая кислота
УВ - углеводороды
ХА - хромосомные aberrации
ЕС₅₀ - эффективная концентрация
G - темп деления клеток
ΔL - прирост длины
F₁-F₇ - I-VII поколения листцов ряски
K_n - коэффициент прироста численности клеток
LC₅₀ - концентрация, вызывающая гибель 50 % особей
P - степень достоверности различия с контролем
P<0,05 - статистически достоверные различия с контролем:
* - (0,05) на первом уровне значимости,
** - (0,01) на втором уровне значимости,
*** - (0,001) на третьем уровне значимости
x̄ - средняя арифметическая
S_x - ошибка средней
* - статистически достоверные различия с К
- разница с К > 25 %

Подписано в печать 8 02 2006 г. Формат 60x84 1/16
Печать трафаретная. Тираж 100 экз. Заказ 010

Отпечатано в печатном цехе «Ризограф»
Тюменского Аграрного Академического Союза
625003, г. Тюмень, ул. Республики, 7

2006A
3842

■ - 3842