

УДК 536.6:612.51:582.43

А. В. Игнатенко, доцент (БГТУ)

**БИОКАЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ  
БИОЦИДНЫХ ВЕЩЕСТВ НА СЕМЕНА РАСТЕНИЙ**

Статья посвящена проблеме безопасности биоцидных веществ и методам ее анализа. Цель исследования связана с разработкой экспресс-метода тестирования фитотоксичности веществ. Предложен биокалориметрический метод оценки токсичного действия биоцидов на семена растений. Показано, что биокалориметрия является простым, удобным и информативным методом тестирования фитотоксичности химических веществ.

The article is devoted to the problem of biocides safety and methods of its analysis. The aim of work is connected with development of express method of phyto-toxicity testing. It was proposed a bio-calorymetrical method for estimation of biocides toxicity action to the seeds of plants. It was shown that bio-calorymetry is a simple, comfortable and informative method for phyto-toxicity testing of chemicals.

**Введение.** Проблема безопасности использования биоцидных веществ является одной из актуальных задач снижения риска их воздействия на биообъекты окружающей среды и обеспечения безопасности для настоящего и будущего поколений живых организмов.

Биоцидные вещества получили широкое использование в растениеводстве для защиты растений от болезнетворных микроорганизмов, для получения новых сортов растений путем химического мутагенеза, для стимуляции прорастания и роста семян и оценки их устойчивости к стрессовым факторам, а также используются для биоиндикации и биотестирования токсичного и генотоксичного действия веществ на растениях [1, 2].

Оценку безопасности химических веществ проводят при их прямом воздействии на биообъекты разных уровней сложности. Для предварительной оценки опасности веществ используют скрининговые методы, включающие в качестве тест-объектов микроорганизмы, растения, животные, а также клеточные культуры, ткани и органы.

Тестирование веществ на фитотоксичность является одним из обязательных этапов их проверки на безопасность. Как правило, фитотоксичность веществ оценивается на семенах растений по влиянию на их всхожесть, скорость роста, а также на морфологические свойства проростков [3]. Данные методы просты, наглядны, но трудоемки и требуют от 3 до 15 дней наблюдений.

Более перспективны инструментальные методы анализа влияния химических веществ на биообъекты, позволяющие значительно снизить длительность и трудоемкость анализов [4].

Биокалориметрия является одним из универсальных подходов для оценки действия различных факторов на живые организмы. Уровень тепловыделения биообъектов является мерой их жизнеспособности и эффективности функционирования [5].

Для разработки экспресс-метода оценки токсичного действия биоцидных веществ на растительные организмы нами было изучено влияние антимикробных веществ на прорастание семян растений.

Оценку безвредности различных веществ для с/х культур растений лучше всего проводить в ключевой период их онтогенеза в фазе семя-проросток [1]. В этой стадии воздействие различных веществ оказывает наибольшее стрессовое влияние на растение и может изменять всхожесть семян, ингибировать их рост, развитие и вызывать гибель растений.

**Основная часть.** Цель исследования – разработка биокалориметрического метода оценки фитотоксичности веществ на семенах растений.

В работе использовали биоцидные препараты производства ИП «Инкраслав» (РФ/РБ): «Диактин», «Триасан», «Септанес», «Инкрасепт-10В» [6].

Ультрафиолетовую обработку препаратов проводили в открытых чашках Петри УФ лампой мощностью 100 Вт на расстоянии 20 см в течение 0–10 мин.

В качестве объектов исследования служили семена ржи, кресс-салата, для которых характерна быстрая всхожесть и достаточно высокая чувствительность к экзогенным воздействиям.

Обработку семян биоцидами проводили в течение 10–30 мин,  $C = 0,01–1,0\%$  непосредственно в рабочей ячейке микрокалориметра.

Регистрацию теплопродукции семян в процессе их прорастания осуществляли с помощью микрокалориметра МКМ-Ц [5]. Измерение мощности теплопродукции и общего количества выделенного семенами тепла проводили в течение 0,5–6,0 ч, записывая показания в память прибора каждые 2 мин. Полученные результаты выражали в относительных величинах ( $Q / Q_0$ ) по отношению к стационарному уровню тепловыделения семян на 20 мин измерения ( $Q_0$ ).

После регистрации тепловыделения семян их высаживали в чашки Петри с полноценной питательной средой на глубину 0,5 см, ежедневно поливали питьевой водой и проращивали при температуре  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  при одинаковой освещенности контрольных и рабочих проб. Наблюдение морфологических свойств проростков осуществляли в течение 10 дней. На четвертые сутки производили подсчет всхожести семян, которую определяли как отношение числа проросших семян к числу посеянных. Поскольку всхожесть является случайной функцией, зависящей от многих внешних и внутренних факторов, результаты выражались по отношению к количеству проросших семян в контрольной пробе. Измерение высоты проростков проводили линейкой ежедневно с момента прорастания.

Полученные экспериментальные данные обрабатывали статистически, используя программное обеспечение Microsoft Excel.

В работе было изучено влияние антимикробных веществ и продуктов их ультрафиолетовой обработки на тепловыделение и прорастание семян ржи и кресс-салата.

На рис. 1 приведены результаты биокалориметрического анализа относительного тепловыделения семян ржи в процессе их прорастания.

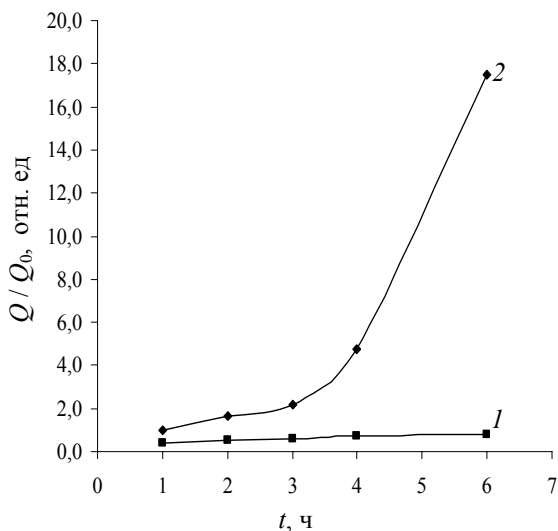


Рис. 1. Изменение мощности тепловыделения семян ржи в ячейке микрокалориметра в процессе их прорастания ( $T = 30^\circ\text{C}$ ):  
1 – тепловыделение сухих семян;  
2 – тепловыделение влажных семян

Как видно из рис. 1, в отсутствии влаги тепловыделение семян было минимально и не изменялось во времени.

В присутствии воды теплопродукция семян ржи постепенно увеличивалась. На начальном

этапе наблюдался относительно медленный рост тепловыделения семян, сопровождающийся их набуханием. После 4 ч на термограмме отмечалось быстрое увеличение теплопродукции семян, указывающее на активацию в них метаболических процессов. При этом относительное тепловыделение набухших зерен ржи увеличивалось на порядок. Можно полагать, что на стадии активации тепловыделения проращиваемые семена будут наиболее чувствительны к воздействию различных веществ.

В присутствии биоцидных веществ в концентрации 0,5% (рис. 2) относительная величина теплопродукции семян ржи уменьшалась по сравнению с контрольными образцами и зависела от природы антимикробных препаратов. Наибольшее влияние на кинетику тепловыделения семян оказали препараты «Диактин» и «Инкрасепт». Воздействие биоцидов зависело от времени обработки семян. На стадии набухания зерен препараты оказывали на них меньшее влияние, чем на стадии активации метаболизма. Поэтому для дальнейших исследований токсичного действия биоцидных веществ использовали предварительно активированные семена.

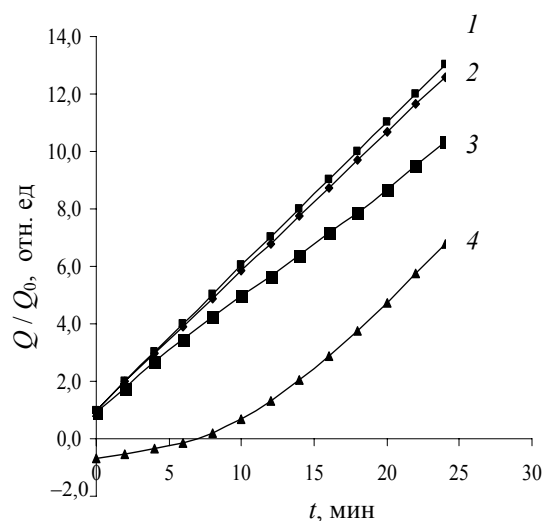


Рис. 2. Кинетика изменения относительной величины тепловыделения семян ржи при проращивании в среде с биоцидами ( $C = 0,5\%$ ):  
1 – контроль; 2 – «Септанес»;  
3 – «Диактин»; 4 – «Инкрасепт-10В»

Изучение влияния ультрафиолетового облучения биоцидных веществ на тепловыделение семян ржи показало (рис. 3), что продукты фотопревращений препарата «Септанес» (рис. 3, а) угнетали тепловыделение семян, тогда как фотопродукты препарата «Инкрасепт» – стимулировали рост физиологической активности семян ржи (рис. 3, б).

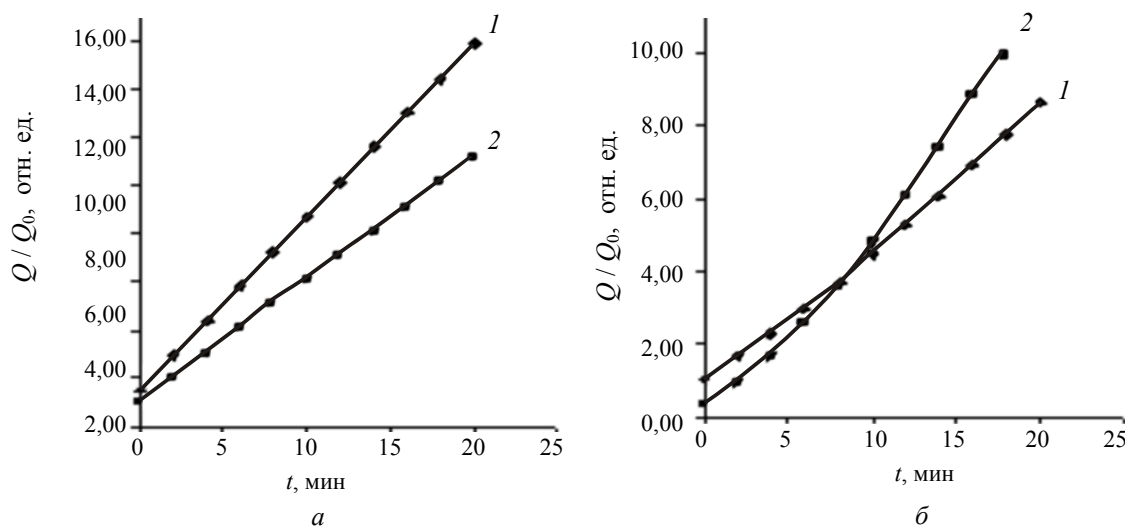


Рис. 3. Кинетика тепловыделения семян ржи при проращивании в среде с продуктами ультрафиолетовой обработки биоцидов ( $C = 0,5\%$ ),  $T = 30^\circ\text{C}$ .  
1 – контроль; 2 – продукты: а – «Септанес»; б – «Инкрасепт-10В»

Метаболическая активность клеток отличается лабильностью. Не все ее изменения могут служить показателем токсичности, поскольку они могут носить физиологический, адаптационный характер. Только если наблюдаемые изменения выходят за пределы колебаний физиологической нормы, они могут указывать на токсичность веществ.

Биоповреждение клеток начинается с нарушений, происходящих в цитоплазматической биомембране. Одной из ключевых систем жизнедеятельности для всех живых организмов является биоэнергетическая система [7]. Ее нарушение затрагивает первичные процессы биоэнергетики, связанные с катаболизмом веществ и транспортом зарядов в дыхательной цепи переноса электронов.

На более поздних этапах происходит нарушение вторичных энергетических процессов, связанных с биосинтезом веществ в клетках. Эти изменения протекают при прямом участии генетической системы клеток.

Для оценки биологических последствий действия биоцидных веществ на семена растений помимо анализа тепловыделения было изучено также их влияние на всхожесть семян и морфологические характеристики проростков.

Качество семян может определяться их физическими показателями: массой, размером, плотностью, но они не отражают физиологические состояния семян.

Для характеристики физиологических состояний семян используют такие показатели их качества, как жизнеспособность, влажность, зараженность болезнями, всхожесть, энергия прорастания и сила роста [8–10].

Жизнеспособность определяется общей долей живых семян в партии, при этом они не

обязательно будут прорасти и, соответственно, будут отличаться всхожестью.

Согласно ГОСТ 12038-84, всхожесть семян – это способность давать нормально развитые проростки за определенный срок в оптимальных условиях. Она определяется процентом всхожести ( $V$ ):

$$V = (N_v / N_o) \cdot 100 (\%),$$

где  $N_o$ ,  $N_v$  – общее количество посеянных и взошедших семян соответственно.

Физиологическое состояние семян характеризуется также силой и энергией роста, которые отражают отношение семян к стрессовым факторам.

Семена могут содержать стрессочувствительные и стрессоустойчивые формы, которые отличаются силой и энергией роста. Когда условия прорастания семян оптимальны, то лабораторная и полевая всхожесть совпадают, и сила роста не отличается от энергии роста. Однако поскольку на практике условия прорастания отличаются от оптимальных, то на семена оказывают дополнительное влияние стрессовые факторы среды. В этих условиях сила и энергия роста не совпадают.

Согласно Международному агентству по стандартизации семян (ISTA), энергия прорастания характеризует дружность всхода семян и определяется средней скоростью или временем их прорастания [11].

Обработка семян кресс-салата биоцидом «Инкрасепт» при  $C = 0,1\%$  приводила к стимуляции их тепловыделения в 1,5 раза, сокращала длительность прорастания семян на сутки по сравнению с необработанными образцами и увеличивала скорость роста побе-

гов. В случае препаратов «Диактин», «Септанес» наблюдалось противоположное действие (таблица).

**Биометрические показатели системы  
семена-проростки для кресс-салата  
при обработке биоцидами  
(С = 0,1%) через 7 сут**

Параметры	Контроль	Биоциды		
		«Септанес»	«Инкрасепт»	«Диактин»
Всхожесть семян, %	83,1 ± 2,4	65,4 ± 2,7	84,0 ± 2,9	76,5 ± 2,3
Длина ростков, см	7,1 ± 2,5	5,7 ± 2,2	7,3 ± 2,0	6,8 ± 2,1
Средняя скорость роста ростков, см/сут	2,0 ± 0,3	1,2 ± 0,3	2,4 ± 0,2	1,8 ± 0,3

О наличии фитотоксичного эффекта при действии химических веществ можно судить по снижению всхожести семян на 20% и более по отношению к контролю. Как следует из таблицы, таким эффектом для кресс-салата обладал препарат «Септанес».

**Заключение.** Таким образом, проведенное исследование показало, что метод биокалориметрии является чувствительным, быстрым, информативным и удобным методом анализа воздействия биоцидных веществ на семена и оценки степени их безвредности для растений. Уровень тепловыделения семян коррелировал с биометрическими показателями растений при их прорастании и росте. Метод биокалориметрии может быть использован как для оценки качества семенного материала и защиты его биоцидными веществами от патогенных микроорганизмов, так и для оценки токсичного действия веществ на развитие растительных организмов.

Изученные биоцидные вещества при концентрациях ниже 0,05% не опасны для семян ржи и кресс-салата и оказывают на них стимулирующее действие. Увеличение концентрации биоцидов подавляет всхожесть семян и тормозит их развитие.

## Литература

1. Таранухо, Г. И. Селекция и семеноводство сельскохозяйственных культур: учеб. для студентов высших сельскохозяйственных учебных заведений по агропромышленным специальностям / Г. И. Таранухо. – Минск: ИВЦ Минфина, 2009. – 430 с.
2. Зинченко, В. А. Химическая защита растений: средства, технологии и экологическая безопасность / В. А. Зинченко. – М.: Колос, 2008. – 232 с.
3. Фирсова, М. К. Семенной контроль / М. К. Фирсова. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Колос, 1969. – 298 с.
4. Юрин, В. М. Основы ксенобиологии: учеб. пособие / В. М. Юрин. – Минск: Новое знание, 2002. – 267 с.
5. Игнатенко, А. В. Микробиологические, органолептические, визуальные методы контроля качества пищевых товаров. Микрокалориметрия: лаб. практикум / А. В. Игнатенко, Н. В. Гриц. – Минск: БГТУ, 2003. – 114 с.
6. Инструкции по применению дезинфицирующе-моющих средств «Септанес», «Инкрасепт», «Триасан», «Диактин» для целей дезинфекции и предстерилизационной очистки изделий медицинского назначения и дезинфекции поверхностей. – Минск: Стандарты, 2000. – 24 с.
7. Журавлев, А. И. Основы физики и биофизики / А. И. Журавлев. – М.: Мир, 2005. – 383 с.
8. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями: ГОСТ 12044-93. – Введ. 01.01.1995. – Минск: Межгос. совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2004. – 57 с.
9. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести: ГОСТ 12038-84. – Введ. 01.07.1986. – М.: Минсельхоз СССР, 1986.
10. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения силы роста: ГОСТ 12040-66. – М.: Минсельхоз СССР, 1966.
11. Handbook of Seed Vigour Test Methods / Ed. J. G. Hampton, D. M. TeKrony. – ISTA. Vigor Test Committee. – Zurich, 1995. – 120 p.

*Поступила 26.03.2010*