



ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ И ГЕНЕТИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ФАКТОРЫ СРЕДЫ

© П.М. Джамбетова,
Н.В. Реутова, М.Н. Ситников

Кабардино-Балкарский
государственный университет
им. Х.М. Бербекова,
кафедра генетики, селекции
и семеноводства; г. Нальчик

✿ У растений, произрастающих в районах сильного загрязнения продуктами горения и кустарной переработки нефти, наблюдается стимуляция роста, угнетение процессов цветения и плодоношения и снижение всхожести семян. Кроме того, у потомков этих растений значительно возрастает уровень хромосомных aberrаций в корневой меристеме проростков.

✿ **Ключевые слова:** бенз(а)пирен; морфологические признаки; продукты переработки нефти; растения; хромосомные aberrации

ВЛИЯНИЕ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕНИЙ НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАСТЕНИЙ

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время вопросы последствий загрязнения окружающей среды нефтью, продуктами ее горения и переработки остро стоят в Чеченской республике (ЧР). Несмотря на то, что крупные промышленные предприятия не работают, количество выбрасываемых вредных веществ за последние 10 лет не уменьшилось, а, скорее всего, увеличилось за счет множества горевших нефтяных скважин и сотен кустарных установок по переработке нефти. Известно, что на территории Чеченской Республики в промышленном освоении находилось более 40 месторождений полезных ископаемых, в том числе 22 месторождения нефти и газа. Существенный вклад в загрязнение окружающей среды продуктами горения нефти внесли десятки горевших в течение нескольких лет нефтяных скважин. С конца 1999 г. по 2002 г. число горящих нефтяных скважин колебалось от 28 до 50 [7].

В последние годы на территории республики распространена переработка нефти на кустарных мини-заводах. По приблизительным подсчетам общее число частных нефтеперегонных установок в республике в отдельные годы доходило до 15 тыс. Подобные установки представляют собой емкости от 1,5 до 100 т, в которые заливается нефть. Под емкости заливается та же нефть и поджигают. При перегонке из нефти выделяется 25–30 % ее легких фракций — это бензин и дизельное топливо. Оставшиеся тяжелые фракции, как правило, сливаются прямо в грунт. Такие установки могут быть локализованы практически в любых местах. Чаще всего их устанавливают на окраинах населенных пунктов или в лесополосах. Количество их может насчитывать от нескольких десятков до нескольких сотен около одного селения [7]. При горении нефти усиливается опасность загрязнения окружающей среды веществами, которые по своей токсичности могут во много раз превосходить продукты самих химических производств. Так, образующийся при низкотемпературном горении нефтепродуктов бенз(а)пирен является канцерогеном и мутагеном [9, 12].

Данная работа посвящена изучению влияния вышеуказанного типа загрязнений на дикорастущую флору.

МЕТОДИКА

Для исследования были выбраны несколько населенных пунктов, где более 13 лет производится первичная переработка нефти. К таким насе-

ленным пунктам относятся села: Долинск (Грозненский район), Алхан-Юрт (Урус-Мартановский район), Мескер-Юрт (Шалинский район), Цоцан-Юрт (Шалинский район), Гельдеген (Курчалоевский район). Все эти населенные пункты располагаются в одном природно-климатическом районе, обладают одинаковыми ландшафтными характеристиками, имеют одинаковый растительный покров.

В качестве условно чистой зоны мы выбрали село Гойты (Урус-Мартановский район), в котором, как известно, подобного производства не было, и которое так же относится к данному природно-климатическому району. Пробы почв брали на расстоянии 100 ± 20 м от нефтеперегонных установок на участках, где отбирались растения дикорастущей флоры для морфологических исследований в летний период в сухую погоду. Пробы отбирали из верхнего горизонта 0–20 см с пяти участков возле каждого населенного пункта по 1 кг с каждого. Полученные 5 кг почвы тщательно перемешивали и из этой смеси брали 1 кг для проведения анализов. Анализы проб почвы на содержание нефтепродуктов проводили совместно с лабораторией химии гумуса почвенного стационара факультета почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова.

Для определения нефтепродуктов использовали методику ускоренного определения содержания нефтепродуктов в различных природных средах (водах, почвах) методом инфракрасной спектроскопии [6]. Определение содержания бенз(а)пирена проводили совместно с испытательной лабораторией почв, кормов, сельскохозяйственной и пищевой продукции, природных вод АНО НПЦ «Эконорма» при МГУ им. М.В. Ломоносова и использовали метод спектрофлуориметрического анализа при низких температурах.

Результаты исследования загрязнения почв нефтепродуктами и бенз(а)пиреном приведены в таблицах 1 и 2 (химический анализ каждого образца проводился однократно, поэтому ошибки в таблицах не приведены).

В табл. 1 приведены данные по некоторым характеристикам почв, а так же по содержанию органических веществ и нефтепродуктов в почвах изучаемых населенных пунктов. Нефтезагрязнения не оказывают существенного влияния на содержание гумуса и рН среды (табл. 1).

Несмотря на то, что населенный пункт Гойты выделен в качестве условно чистой зоны, в почвах, отобранных в его окрестностях, в небольших количествах содержатся нефтепродукты (0,02 %) (см. табл. 1) и бенз(а)пирен (0,03 мг/кг), концентрация которого превышает ПДК в 1,5 раза (табл. 2). Учитывая, что в условно чистой зоне не производилась кустарная переработка нефти, подобное загрязнение почвы можно объяснить переносом веществ воздушными потоками.

По данным таблиц 1 и 2 видно, что практически все отобранные почвы содержат повышенное количество нефтепродуктов и бенз(а)пирена, причем наиболее загрязненным районом является Долинск. Поскольку самым опасным загрязнителем из всех исследованных, является бенз(а)пирен, то все населенные пункты мы расположили в порядке возрастания содержания именно этого вещества. Такого же порядка расположения населенных пунктов мы придерживались и в последующих таблицах, в последних графах всегда находится Долинск, а в начале условно чистая зона — Гойты.

Несмотря на устойчивость дикорастущей флоры к различным загрязнителям [4], растения, произрастающие на нефтезагрязненных землях, накапливают сильно-действующие мутагены и канцерогены (в частности, бенз(а)пирен) в больших количествах.

Для проведения морфологических и цитогенетических исследований в окрестностях выбранных населенных пунктов были отобраны те виды растений, которые встречались повсеместно: ромашка непахучая (*Matricaria recutita* L.), конский щавель (*Rumex confertus* Willd.), одуванчик лекарственный (*Taraxacum officinale* Wigg. s.l.) подорожник большой (*Plantago*

Таблица 1

Содержание нефтепродуктов в исследуемых почвах

№	Место отбора почвы	рН водн.	С орг (%)	Гумус (%)	Углеводороды (%)	Нефтепродукты (%)
1	Гойты (условно чистая зона)	8,30	2,12	3,65 **	0,03	0,02
2	Цоцан-Юрт	8,42	1,08	1,86 *	0,86	0,73
3	Гельдеген	7,79	3,77	6,50 **	0,63	0,52
4	Мескер-Юрт	8,63	1,64	2,87 *	1,17	1,10
5	Алхан-Юрт	8,42	3,97	6,84 **	1,48	1,48
6	Долинск	7,86	4,19	7,22 **	1,72	1,56

Примечание: * — почва лугово-черноземная малогумусированная; ** — почва лугово-черноземная среднегумусированная.

Таблица 2

Содержание бенз(а)пирена в исследуемых почвах (в мг/кг)

№	Место отбора почвы	Концентрация бенз(а)пирена	ПДК в почве
1	Гойты (условно чистая зона)	0,03	0,02
2	Цоцан-Юрт	0,06	0,02
3	Гельдеген	0,14	0,02
4	Мескер-Юрт	0,15	0,02
5	Алхан-Юрт	0,26	0,02
6	Долинск	1,83	0,02

major L.). Для отбора растений визуально отмечали на одинаковом расстоянии от мини-заводов площадь (примерно $10\,000 \pm 200\text{ м}^2$). Всю площадь разбивали по диагонали на участки в 50 м^2 в каждом из которых отбирали растения вышеуказанных видов примерно одинакового габитуса в фазу цветения и созревания семян. В фазу цветения отмечали общую высоту и количество соцветий. В фазу созревания семян подсчитывали общее число семян на растении с последующим вычислением числа семян в среднем приходящихся на одно соцветие. В целом в каждом населенном пункте было собрано не менее 30 растений каждого вида. С них были собраны семена для проведения цитогенетических исследований. Все семена каждого вида собранные в одном населенном пункте были перемешаны. Из этой смеси для проращивания брали по 50 семян в четырехкратной повторности (всего по 200 семян каждого вида для каждого населенного пункта).

Уровень хромосомных aberrаций у отобранных видов растений определяли с использованием анафазно-телофазного метода в корневой меристеме проростков поскольку эта методика наиболее хорошо разработана и удобна в применении [3]. Семена, собранные в 2001 году, проращивали в стеклянных чашках Петри на фильтровальной бумаге с добавлением водопроводной воды в термостате при температуре $+26\text{ }^\circ\text{C}$.

Проросшие корешки длиной 3–4 мм фиксировали в смеси этилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3 : 1). Материал окрашивали ацетокармином (2 %-й раствор кармина в 45 %-й уксусной кислоте) на водяной бане в течение 10–12 мин. Готовили временные давленные препараты по общепринятой методике [3]. Количество встретившихся ана/телофаз на проросток в среднем составляло от 0 до 25–30 шт. В единичных проростках, число ана/телофаз достигало 90–112. Количество клеток с aberrациями на проросток колебалось от 0 до 15–16 (последние цифры характерны для тех единичных проростков с максимальным количеством ана/телофаз).

Для статистической обработки использовали преобразование Фишера [5] и двухфакторный дисперсионный

анализ [8], а также провели корреляционный анализ с помощью программы «Биостатистика».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Известно, что растения природной флоры более устойчивы к антропогенным воздействиям и, что влияние фитотоксичной почвы находится в прямой зависимости от интенсивности и длительности ее загрязнения [4]. Работу по исследованию влияния продуктов горения и кустарной переработки нефти мы начали с изучения морфологических особенностей широко распространенных растений, произрастающих в окрестностях исследуемых населенных пунктов. Это *Matricaria recutita* L., *Rumex confertus* Willd., *Taraxacum officinale* Wigg.s.l. и *Plantago major* L. Исследования проводили в 2001 г. и в 2002 г., в таблицах 3–5 приведены средние данные за два года.

Наиболее информативным показателем роста растений является их высота. В литературе приводятся противоречивые данные. Так, отмечается негативное влияние нефти на рост и развитие растений [1, 4]. Наши данные говорят об увеличении высоты растений всех исследованных видов при повышении концентрации нефтепродуктов в почве (табл. 3).

Ингибирующее влияние нефтезагрязнений на все исследуемые виды растений выразилось в уменьшении числа соцветий и количества семян в среднем на одно соцветие и в снижении всхожести семян. Так, в загрязненных зонах количество цветков на одно растение уменьшилось в среднем в 1,2–2,3 раза, а семян — в 1,3–2,1 раза. Минимальные значения этих признаков отмечены у растений окрестностей села Долинск (табл. 4). В то же время, растения, собранные на этой территории, имели наибольшую высоту.

Самые значительные изменения наблюдались во всхожести семян. Всхожесть в загрязненных зонах снизилась в 2,9–5,5 раза. Значительное снижение всхожести наблюдается у растений *Taraxacum officinale* Wigg.s.l. из наиболее загрязненных населенных пунктов Долинск и Цоцан-Юрт (табл. 5). Эти результаты

Таблица 3

Высота растений в загрязненных и чистой зонах (см)

№	Вид	Гойты (условно чистая зона)	Цоцан-Юрт	Гельдеген	Мескер-Юрт	Алхан-Юрт	Долинск
1	Одуванчик лекарственный	20,8 ± 1,9	29,9 ± 2,4	35,9 ± 2,6	33,2 ± 2,6	29,2 ± 2,3	36,1 ± 2,6
2	Ромашка непахучая	52,2 ± 2,8	68,2 ± 3,4	72,4 ± 2,1	62,5 ± 2,9	69,3 ± 1,9	78,5 ± 2,0
3	Щавель конский	90,8 ± 11,7	136,7 ± 12,6	123,3 ± 11,5	131,8 ± 11,1	118,7 ± 11,1	140,1 ± 11,8
4	Подорожник большой	34,7 ± 1,8	39,5 ± 2,2	41,8 ± 2,1	42,1 ± 2,8	43,2 ± 2,1	42,3 ± 2,0

Таблица 4

Количество соцветий и семян в загрязненных и чистой зонах

№	Вид	Гойты (условно чистая зона)	Цоцан-Юрт	Гельдеген	Мескер-Юрт	Алхан-Юрт	Алхан-Юрт
1	Одуванчик лекарственный						
	Количество соцветий (шт)	11,4 ± 2,6	7,3 ± 1,9	8,1 ± 1,4	6,7 ± 1,5	6,4 ± 1,5	6,3 ± 2,2
2	Ромашка непахучая						
	Количество соцветий (шт)	107,3 ± 7,6	72,3 ± 4,2	69,6 ± 3,8	65,8 ± 5,3	77,3 ± 2,9	83,5 ± 3,4
3	Щавель конский						
	Количество соцветий (шт)	8,6 ± 0,3	4,4 ± 0,4	3,8 ± 0,3	4,8 ± 2,3	5,7 ± 0,2	3,7 ± 0,3
4	Подорожник большой						
	Количество соцветий (шт)	9,4 ± 0,5	4,7 ± 0,7	6,3 ± 0,6	5,8 ± 0,4	4,8 ± 0,6	4,6 ± 0,6

Таблица 5

Всхожесть семян у растений загрязненной и чистой зон (%)

№	Вид	Гойты (условно чистая зона)	Цоцан-Юрт	Гельдеген	Мескер-Юрт	Алхан-Юрт	Алхан-Юрт
1	Одуванчик лекарственный	78,4 ± 6,1	14,3 ± 1,2	26,7 ± 2,0	21,8 ± 1,9	20,6 ± 1,5	18,5 ± 1,4
2	Ромашка непахучая	88,5 ± 3,8	56,6 ± 2,8	62,5 ± 3,2	54,4 ± 4,1	51,1 ± 3,6	43,8 ± 4,4
3	Щавель конский	82,5 ± 2,2	59,8 ± 3,6	64,4 ± 3,2	60,3 ± 4,0	56,6 ± 3,0	54,5 ± 2,7
4	Подорожник большой	96,0 ± 2,7	67,5 ± 2,6	54,3 ± 2,5	66,2 ± 2,3	46,42,3	47,12,8

совпадают с максимальным уровнем загрязнения почвы нефтепродуктами и бенз(а)пиреном (см. табл. 1, 2).

Для определения генотоксического влияния мы использовали цитогенетические методы. Наиболее простым из них является анафазно-телофазный. Были использованы растения тех же видов, что и для морфологических исследований. Результаты представлены в табл. 6 [2].

Как видно из таблицы уровень хромосомных aberrаций у растений из загрязненных зон в 4,2–10,2 раза превышает таковой у растений условно чистой зоны. Дисперсионный анализ показал, что уровень частоты хро-

мосомных aberrаций зависит в большей степени от количества в почве нефтепродуктов и в меньшей степени от вида растений. Влияние загрязнения почв составило 67,10 %, влияние видов 22,50 %, а их взаимодействие составило всего 8,56 %. У изученных видов наблюдается прямая зависимость между уровнем хромосомных aberrаций и высотой растений, у подорожника она на среднем уровне, а у остальных видов имеется высокая корреляция.

Высокая отрицательная корреляция, существующая между уровнем хромосомных aberrаций и количеством соцветий, количеством семян и их всхожестью говорит

Таблица 6

Частота хромосомных aberrаций у видов дикорастущей флоры в условиях загрязнения почв продуктами переработки нефти

Виды растений	Место сбора	Всего анафаз	Всего мутаций	%	P
Taraxacum officinale Wigg.s.l.	Гойты	1056	24	2,27	
	Цоцан-Юрт	1007	96	9,53	< 0,001
	Гельдеген	1050	114	10,85	< 0,001
	Мескер-Юрт	1012	104	10,28	< 0,001
	Алхан-Юрт	1026	121	11,7	< 0,001
	Долинск	1044	126	12,07	< 0,001
Matricaria recutita L.	Гойты	1164	18	1,55	
	Цоцан-Юрт	1062	106	9,98	< 0,001
	Гельдеген	1018	98	9,63	< 0,001
	Мескер-Юрт	1013	118	11,65	< 0,001
	Алхан-Юрт	1071	89	8,31	< 0,001
	Долинск	1070	121	11,31	< 0,001
Rumex confertus Willd.	Гойты	1002	17	1,69	
	Цоцан-Юрт	1027	89	8,67	< 0,001
	Гельдеген	1020	106	10,39	< 0,001
	Мескер-Юрт	1006	96	9,54	< 0,001
	Алхан-Юрт	1082	87	8,04	< 0,001
	Долинск	1051	113	10,75	< 0,001
Plantago major L.	Гойты	1018	9	0,89	
	Цоцан-Юрт	1101	53	4,81	< 0,001
	Гельдеген	1059	61	5,76	< 0,001
	Мескер-Юрт	1006	47	4,67	< 0,001
	Алхан-Юрт	1023	36	3,52	< 0,001
	Долинск	1004	91	9,06	< 0,001

о том, что чем выше частота хромосомных нарушений, тем более угнетаются указанные признаки (табл. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы попытались оценить токсическое и генетическое влияние продуктов горения и кустарной переработки нефти. Это исследование мы провели с использованием растительных объектов. Растения пригодны не только для обнаружения мутагенов, но также их использование весьма многообещающе и для обнаружения канцерогенов [10, 11].

После того, как мы обнаружили значительное загрязнение почвенного покрова, естественно встал вопрос, как такое загрязнение влияет на растительность в исследуемых районах. Мы изучали морфологические параметры растений одних и тех же видов во всех ис-

следуемых населенных пунктах. Оказалось, что во всех случаях высота растений в загрязненных зонах превышает высоту тех же видов в условно чистой зоне. Следовательно, в данном случае мы наблюдаем стимулирующее влияние нефтезагрязнений на процессы роста растений. Причем, это влияние усиливается с увеличением уровня загрязнений.

Однако подобный тип загрязнений оказывает негативное влияние на репродуктивную функцию растений (количество цветков и семян). По всей видимости, в данном случае нарушаются процессы развития, связанные с закладкой бутонов, формированием цветков, гаметогенезом (поскольку уменьшается количество семян на одно соцветие).

Таким образом, продукты кустарной переработки и горения нефти оказывают весьма противоречивое влияние на растения, стимулируют рост, но снижают фер-

Таблица 7

Коэффициент корреляции частоты хромосомных aberrаций с морфологическими признаками растений

№	Вид	Коэффициент корреляции r уровня мутаций			
		С высотой растений	С количеством соцветий	С количеством семян	Со всхожестью семян
1	Одуванчик лекарственный	0,88	-0,95	-0,98	-0,94
2	Ромашка непахучая	0,76	-0,88	-0,95	-0,91
3	Щавель конский	0,913	-0,98	-0,88	-0,89
4	Подорожник большой	0,66	-0,71	-0,80	-0,74

тельность и увеличивают частоту хромосомных нарушений в соматических клетках потомства этих растений.

Токсическое влияние хорошо прослеживается при изучении всхожести семян. Всхожесть семян растений из всех загрязненных районов в 1,5–2,0 раза ниже, чем в условно чистой зоне, причем, чем выше уровень загрязнения, тем ниже всхожесть семян. Следовательно, выявленное нами загрязнение почвы нефтепродуктами обладает токсическим действием.

Тератогенного влияния мы не наблюдали. Форма листьев, внешний вид растений и проростков из загрязненной зоны не отличались от таковых у растений и проростков из условно чистой зоны.

Определение токсического влияния загрязнителей не представляет сложности. Значительно труднее выявить возможное генетическое влияние этих же загрязнителей. Поскольку мы обнаружили снижение количества семян на одно соцветие у растений из загрязненных районов, что связано с нарушением гаметогенеза, а, следовательно, мейоза, то мы предположили наличие не только слабого токсического, но и генетического влияния данного вида загрязнений.

Для выявления возможного генетического влияния мы использовали анафазно-телофазный метод при исследовании тех же четырех видов растений, на которых проводились морфологические исследования. Анафазно-телофазный метод позволяет выявить только хромосомные aberrации. Цитогенетические исследования показали, что уровень хромосомных aberrаций у всех исследованных видов растений в 4–7 раз превышает таковой у растений условно чистой зоны. Возможно, этим и объясняется снижение фертильности растений, а именно снижение количества семян на соцветие. Причем и в данном случае наблюдается хорошее совпадение уровня частоты хромосомных aberrаций с уровнем загрязнения. В менее загрязненных населенных пунктах у растений ниже уровень хромосомных нарушений.

Дикорастущие растения являются очень удобным объектом для определения генетического влияния загрязнителей окружающей среды. Мы использовали в наших исследованиях широко распространенные виды ра-

стений, и они оказались весьма чувствительными и удобными для изучения генетической безопасности загрязнителей окружающей среды.

Литература

1. Гайнутдинов М.З., Гайсин И.А., Храмов И.Т. и др. Загрязнение почв нефтепромышленными сточными водами // Всесоюз. науч.-техн. конф. «Проблемы разработки автоматизированных систем наблюдения, контроля и оценки состояния окружающей среды». — Казань, 1979. — С. 128–129.
2. Дзамбетова П.М. Влияние уровня загрязненности почв нефтепродуктами на мутабельность дикорастущей флоры // Тр. межд. биотехнологического центра МГУ: Биотехнология — охрана окружающей среды. — М.: Спорт и культура. — С. 41–44.
3. Дубинина Л.Г. Структурные мутации в опытах с *Crepis capillaries* L. — М.: Наука, 1978. — С. 188.
4. Киреева Н.А., Мифтахова А.М., Кузьяметов Г.Г. // Вестн. Башкирского университета. — 2001. — № 1. — С. 32–34.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — 351 с.
6. Орлов Д.С., Гришина Л.А. Практикум по химии гумуса. — М.: Изд-во МГУ, 1981. — 272 с.
7. Оценка природного потенциала и экологического состояния территории Чеченской Республики / под ред. акад. РАН М.Ч. Залиханова. — СПб.: Гидрометеоздат, 2001. — 158 с.
8. Рокцкий П.В. Биологическая статистика. — Минск, 1964. — 327 с.
9. Шабад Л.М., Хесина А.Я. О возможности эндогенного синтеза бенз(а)пирена в семенах растений при их прорастании // Растения и химические канцерогены. — М.: Наука, 1979. — С. 86.
10. Constantin M. J., Owens E.T. Introduction and perspectives of plant genetic and cytogenetic assays // Mutat. Res. — 1982. — Vol. 99, N 1. — P. 1–12.
11. Grant W.G. Chromosome aberrations in plant as a monitoring system // Environ. Health Persp. — 1978. — Vol. 27. — P. 37–43.
12. Malallah G., Afzal M., Murin G., Murin A., Abraham D. Genotoxicity of oil pollution on some species of Kuwaiti flora // Biologia (Bratislava). — 1997. — Vol. 52 (1). — P. 61–70.

Influence of oil pollution on morphology and cytogenetic characteristics of plants

Dzhambetova P.M., Reutova N.V.

☼ **SUMMARY:** Height stimulation and inhibition the flowering, formation of seeds and germination capacity is observed in the regions highly polluted with products of combustion and domestic cottage processing of oil. At the same time the level of chromosome aberration increase significantly in root meristems of seedlings of these plants.

☼ **KEY WORDS:** benz(a)pyrene; morphological characteristics; products of oil combustion and processing of oil; plants; chromosome aberrations