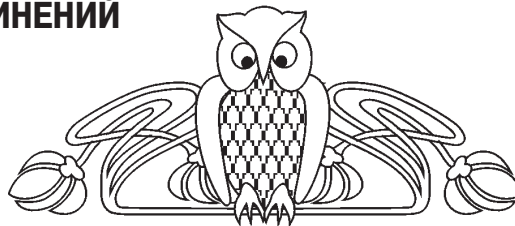




УДК 544.723.212

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХАРАКТЕРА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НОВЫХ ПОЛИГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ НА РАСТЕНИЯ И ОЦЕНКА ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Т. И. Губина, А. А. Ухова, С. В. Исаева,  
Р. С. Тумский, А. А. Аниськов, И. Н. Клочкова



Губина Тамара Ивановна, профессор кафедры «Экология», Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю. А., доктор химических наук. E-mail: gubinati@mail.ru

Ухова Альбина Александровна, магистрант кафедры «Природная и техносферная безопасность», Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского. E-mail: uxovaaa@rambler.ru

Исаева Светлана Владимировна, аспирант кафедры «Природная и техносферная безопасность», Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю. А. E-mail: isaevav@yandex.ru

Тумский Роман Сергеевич, аспирант кафедры органической и биоорганической химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского. E-mail: roma\_ronaldinho@rambler.ru

Аниськов Александр Андреевич, доцент кафедры органической и биоорганической химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, кандидат химических наук. E-mail: aniskovalvis@gmail.com

Клочкова Ираида Николаевна, профессор кафедры органической и биоорганической химии, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, доктор химических наук. E-mail: v-klochkov1@yandex.ru

Проведена экотоксикологическая оценка двух новых полигетероциклических соединений. Определена острая токсичность исследуемых веществ, их летальная и безопасная концентрации (ЛК и БК). Исследован характер биологического действия этих соединений на растения. Вещества являются стимуляторами при прорастании семян пшеницы и гороха и ингибиторами роста корней и стеблей проростков. Определено действие различных концентраций изучаемых соединений на ростовые характеристики растений. Их концентрационные зависимости имеют немонотонный характер, для пшеницы исследуемые вещества практически во всех концентрациях обладают ингибирующим действием, для гороха они проявляют стимулирующую и ингибирующую активность.

**Ключевые слова:** полигетероциклические соединения, токсичность, рострегулирующая активность.

DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-3-267-273

В последние годы выявлена высокая биологическая активность многих гетероциклических соединений, в результате чего созданы эффективные антибактериальные, противогрибковые,

противоопухолевые и другие препараты [1]. Научный и практический интерес представляет изучение возможности применения новых веществ в качестве пестицидов [2]. Известно, что мишенью действия пестицидов в большей степени являются растения (гербицидное или рострегулирующее действие) и микроорганизмы.

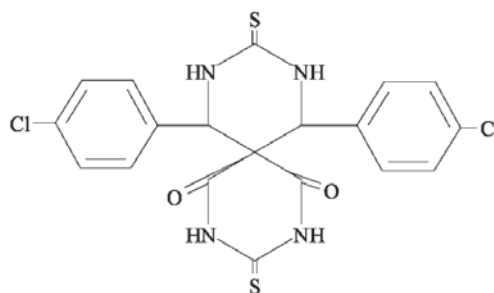
Для обеспечения экологической безопасности вновь синтезированных химических соединений, предполагаемых для использования в качестве биологически активных веществ, обязательным является экотоксикологическая оценка, включающая в себя изучение эффектов их воздействия на тест-объекты, в качестве которых используются дафнии, светящиеся бактерии, простейшие, водоросли.

Целью данной работы является изучение характера биологического действия двух новых полигетероциклических соединений на всхожесть семян и ростовые характеристики пшеницы и гороха и определение их токсичности в действующих концентрациях на тест-объекты: цериодафнии *C. affinis* и лиофилизированные люминесцентные генно-инженерные бактерии *E. coli M-17*.

### Экспериментальная часть

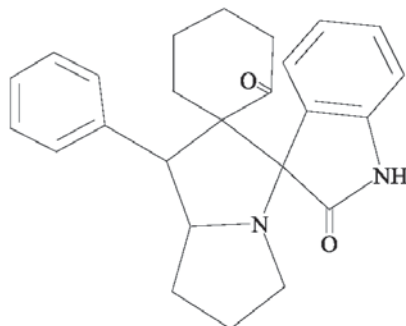
В качестве объектов исследования взяты следующие полигетероциклические соединения гидроазинового (1) и гидроазолового (2) рядов, синтезированные на кафедре органической и биоорганической химии Саратовского государственного университета [3, 4]:

Соединение (1)





Соединение (2)



В работе использовались семена пшеницы сорта «Яровая» и гороха сорта «Сенатор».

**Приготовление модельных растворов.** Рабочие растворы исследуемых соединений 1 и 2 готовили следующим образом: навески веществ (0,1 г) растворяли в 1 мл диметилсульфоксида и добавляли до 100 мл дистиллированной воды (в случае опытов с дафниями – отстойной) при интенсивном перемешивании в течение 0,5–1 ч. Следующие концентрации готовили последовательным разбавлением исходных растворов.

В качестве тест-объекта использовали культуру рачков цериодафний, выращенных в климатостате P2, в котором обеспечивалось искусственное освещение интенсивностью 500–1000 лк в течение 16 ч дневного периода с температурой  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ . Кормление рачков проводили суспензией водорослей *S.quadricauda* ежедневно [5].

Вторым тест-объектом служили биосенсоры серии «Эколюм», представляющие собой лиофилизированные культуры люминесцентных генно-инженерных бактерий *E.coli M-17*, содержащиеся в среде инертных газов в специальных стеклянных флаконах.

Для получения суспензии бактерий вскрывали флакон с лиофилизированным биореагентом, добавляли 10 мл дистиллированной воды и выдерживали суспензию в течение 30 мин, периодически перемешивая [6].

Определение токсичности исследуемых растворов проводили по смертности *C.affinis* в течение 48 ч согласно аттестованной методике [5].

Эксперимент проводили в 10 химических стаканах вместимостью 30 мл, которые заполняли 15 мл водных растворов исследуемых соединений определённой концентрации (1,0; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 г/л), в каждый стакан помещали по одной *C.affinis* не более 24-часового возраста. Эксперимент для каждого значения концентраций проводили в 10 повторностях. Кормили цериодафний ежедневно, один раз в сутки.

В конце эксперимента визуально определяли количество погибших цериодафний в растворах каждой концентрации и рассчитывали процент погибших особей в тестируемой пробе ( $A$ , %) по сравнению с контролем:

$$A = X_k - X_r / X_k \cdot 100\%$$

где  $X_k$  – количество выживших цериодафний в контроле;  $X_r$  – количество выживших цериодафний в тестируемой пробе.

Острое токсическое действие исследуемых растворов определяли по гашению биолюминесценции на тест-системе «Эколюм» за 30-минутный период экспозиции. Для этого отбирали из флакона по 0,1 мл рабочей суспензии бактерий и помещали в кюветы, затем в них добавляли по 0,9 мл исследуемых растворов, а в контрольный образец – аналогичное количество дистиллированной воды. Исследование проводили в 3 повторностях. Через 30 мин попарно измеряли интенсивность свечения бактерий в контроле и кюветах с исследуемыми растворами, записывали показания прибора по индексу токсичности. Измерение проводили на приборе «Биотокс-10».

Индекс токсичности в тестируемой пробе по отношению к контролю рассчитывали по формуле

$$T = 100 (I_o - I) / I_o,$$

где  $I_o$  – соответственно интенсивность биолюминесценции контроля,  $I$  – биолюминесценция опытной пробы при фиксированном времени экспозиции.

Влияние растворов соединений 1 и 2 на всхожесть семян пшеницы и гороха и их ростовые характеристики проводили следующим образом: семена в количестве 10 штук помещали на фильтровальную бумагу в несколько стерильных чашек Петри и заливали исследуемыми растворами соединений 1 и 2 в объеме 10 мл с концентрацией 1,0; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 г/л. В качестве контроля использовали дистиллированную воду. Чашки с семенами выдерживали при естественном освещении и температуре  $26\text{--}30^\circ\text{C}$  двое суток. Результаты экспериментов определяли на вторые сутки.

Измерение длины корня и стеблей проростков с помощью линейки с ценой деления, равной 1 мм, проводили на пятые и седьмые сутки. Эксперименты осуществляли в трёхкратной повторности. Статистическую обработку результатов проводили по методике [7] с использованием  $t$ -критерия Стьюдента, расчеты выполняли с применением пакета Microsoft Office Excel.



### Результаты и их обсуждение

Изучено действие растворов соединений 1 и 2 в концентрациях 1,0; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 г/л на численность *C. affinis*. По полученным данным построена диаграмма зависимости выживаемости цериодафний от концентрации соединений 1 и 2 в течение 48 ч эксперимента (рис. 1).

Известно, что острой считается токсичность, при которой погибает 50% рачков в течение 48 ч. Из рисунков видно, что соединение 1

(см. рис. 1, а) проявляет острую токсичность при концентрациях 0,1 и 1 г/л, а соединение 2 (рис. 1, б) – 1,0 г/л на первые сутки опыта.

По графической зависимости пробитов от  $\lg C$  [5] определены значения летальной ( $LK_{50}$ ) и безвредной ( $BK_{10}$ ) концентраций исследуемых растворов соединений 1 и 2, вызывающих 50%-ную и 10%-ную гибель тест-организмов, которые равны соответственно для соединения 1 – 0,006 г/л и 0,0005 г/л, для соединения 2 – 0,04 г/л и 0,005 г/л.

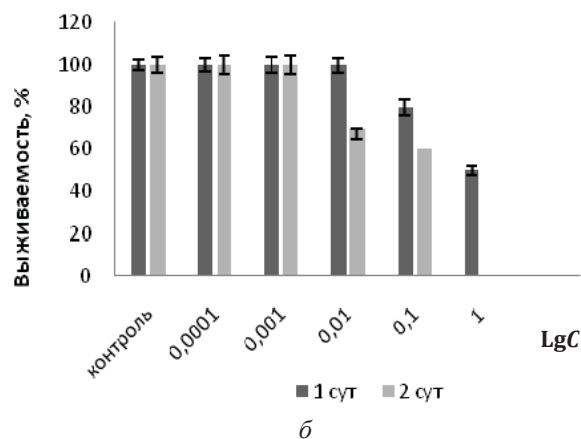
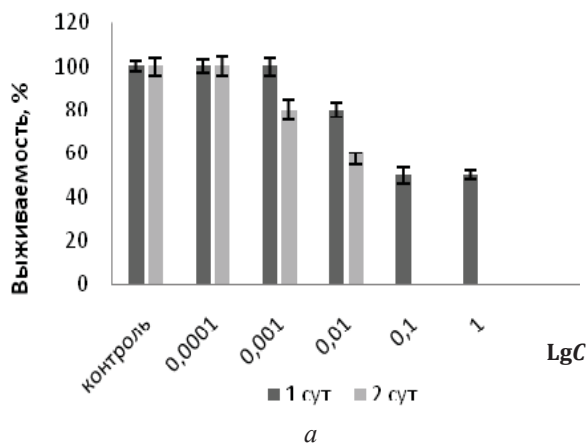


Рис. 1. Диаграмма зависимости выживаемости *C. affinis* от концентрации соединения 1 (а) и 2 (б) в растворе

Изучены действия соединений 1 и 2 в растворах вышеуказанных концентраций на интенсивность бактериальной биолюминесценции тест-системы «Эколюм» на приборе люцинометр «Биотокс-10». Результаты экспериментов представлены в табл. 1, 2. Оценку токсичности пробы

(индекс токсичности  $T$ ) устанавливали исходя из значений интенсивности биолюминесценции контрольной и исследуемой проб согласно методике [6]. По значению индекса  $T$  проведено отнесение каждой пробы к определённому классу токсичности.

Таблица 1

Влияние различных концентраций соединения 1 на интенсивность биолюминесценции бактерий, индекс токсичности, токсичность пробы

С, г/л	$I$ конт.	$I$ опыт.	Значение индекса токсичности ( $T$ )	Токсичность пробы
1	38485	10241	73,96±0,56	Сильно токсична
		9814		
		10015		
0,1	37285	27515	27,98±1,90	Токсична
		26937		
		26105		
0,01	36161	32568	11,45±1,90	Не токсична
		31251		
		32247		
0,001	33973	32141	5,46±0,15	Не токсична
		32057		
		32154		
0,0001	34919	35121	0±0	Не токсична
		36017		
		36914		



Таблица 2

**Влияние различных концентраций соединения 2 на интенсивность биолюминесценции бактерий, индекс токсичности, токсичность пробы**

C, г/л	I конт.	I опыт.	Значение индекса токсичности (T)	Токсичность пробы
1,0	33557	21420	40,70±4,40	Токсична
		19811		
		18468		
0,1	32587	26065	17,96±1,79	Не токсична
		27121		
		27019		
0,01	33213	29902	9,13±0,93	Не токсична
		30121		
		30514		
10 <sup>-3</sup>	31983	30121	5,98±0,52	Не токсична
		29884		
		30202		
10 <sup>-4</sup>	31416	36374	0±0	Не токсична
		33995		
		32914		

Изучено действие соединений 1 и 2 в концентрациях 1,0; 0,1; 0,001; 0,001; 0,0001 г/л на

всхожесть пшеницы и гороха. Результаты экспериментов представлены на диаграммах (рис. 2).

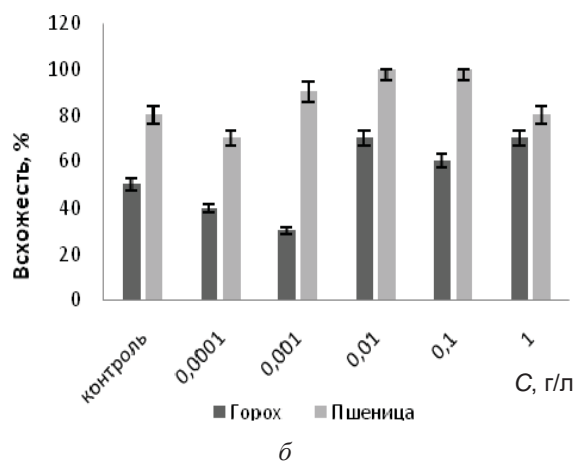
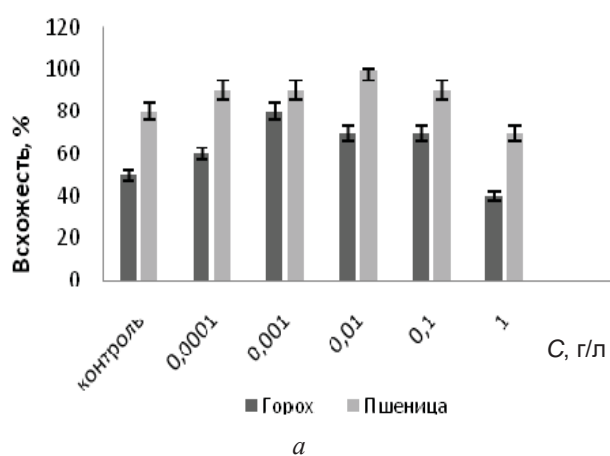


Рис. 2. Диаграмма зависимости всхожести семян пшеницы и гороха от концентрации соединения 1 (а) и 2 (б) в растворе через 1 сутки

На основании построенных диаграмм (см. рис. 2, а) можно заключить, что всхожесть семян пшеницы и гороха в присутствии соединения 1 увеличивается. Для гороха при концентрации вещества 0,001 г/л она возрастает по сравнению с контролем почти в два раза, а для пшеницы наибольшее увеличение всхожести семян наблюдается при концентрации вещества 0,01 г/л, вещество в концентрации 1 г/л ингибирует всхожесть семян гороха. Соединение 2 в низких концентрациях ингибирует

всхожесть семян гороха (0,0001 и 0,001 г/л) и пшеницы (0,0001 г/л), незначительно стимулирует всхожесть семян гороха (0,01 и 0,1 г/л) и пшеницы (0,001, 0,01 и 0,1 г/л), а в концентрации 1 г/л всхожесть семян пшеницы – на уровне контроля.

Определено действие соединений 1 и 2 в концентрациях 1,0; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 г/л на длину корня и стебля проростков пшеницы на 5-е и 7-е сутки. Результаты эксперимента представлены на графиках (рис. 3).

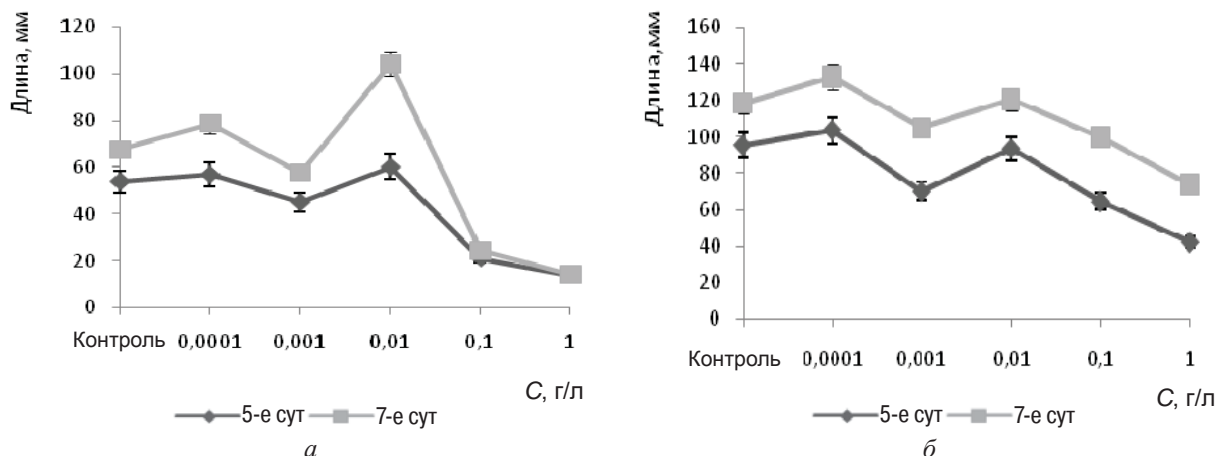


Рис. 3. Графическая зависимость длины корня (а) и стебля (б) проростков пшеницы от концентрации соединения 1 на 5-е и 7-е сутки эксперимента

Из рис. 3, а видно, что длины корней проростков пшеницы, выращенных в присутствии соединения 1 в концентрациях 0,0001, и 0,01 г/л, на 5-е и 7-е сутки превосходят контрольные показатели, а в концентрациях 0,001; 0,1 и 1 г/л исследуемое вещество ингибирует рост корней проростков.

Что касается действия соединения 1 на рост стеблей проростков пшеницы, то только самая низкая концентрация 0,0001 г/л стимулирует

рост длины стебля проростков пшеницы на 5-е и 7-е сутки. Начиная с концентрации 0,001 г/л соединение 1 ингибирует рост стеблей проростков, оказывая наибольшее действие в концентрациях 0,1; 1 г/л.

На рис. 4 представлена графическая зависимость длины корня и стебля проростков пшеницы, выращенных в присутствии соединения 2 в изучаемых концентрациях на 5-е и 7-е сутки эксперимента.

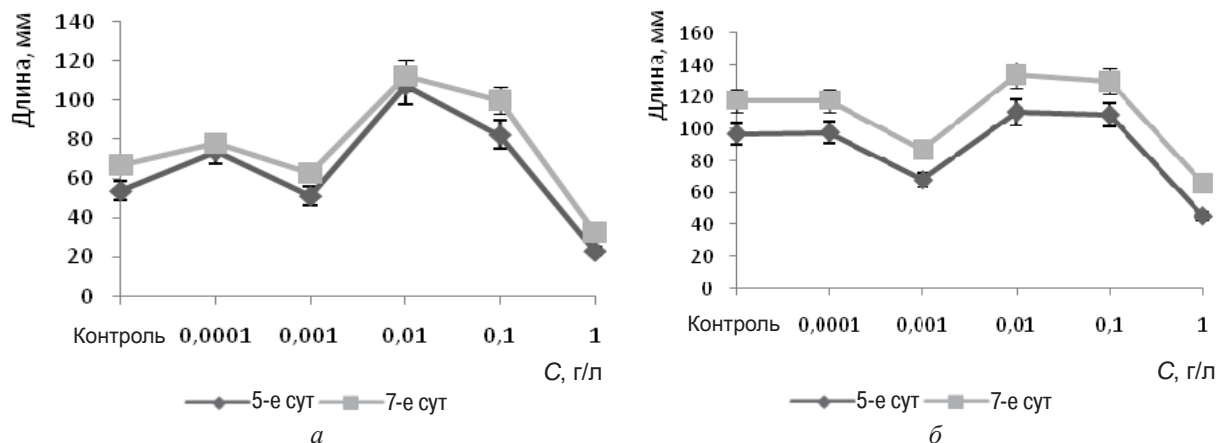


Рис. 4. Графическая зависимость длины корня (а) и стебля (б) проростков пшеницы от концентрации соединения 2 на 5-е и 7-е сутки эксперимента

Из рис. 4, а видно, что соединение 2 в концентрациях 0,0001; 0,01; 0,1 г/л является стимулятором роста корней пшеницы, а в концентрациях 0,001 и 1г/л оно ингибирует их рост.

Похожая зависимость получена при действии соединения 2 на длину стеблей проростков пшеницы: концентрации 0,0001; 0,01; 0,1 г/л стимулируют рост стебля, а концентрации 0,001 и 1 г/л ингибируют его рост.

На рис. 5 представлена графическая зависимость длины корня (см. рис. 5, а) и стебля (см. рис. 5, б) проростков гороха от концентрации соединения 1 на 5-е и 7-е сутки эксперимента.

Из рис. 5, а видно, что соединение 1 на 5-е сутки в основном стимулирует рост корня гороха и только в концентрации 1 г/л ингибирует его. Зависимость не имеет выраженного колебательного характера: с понижением концентрации

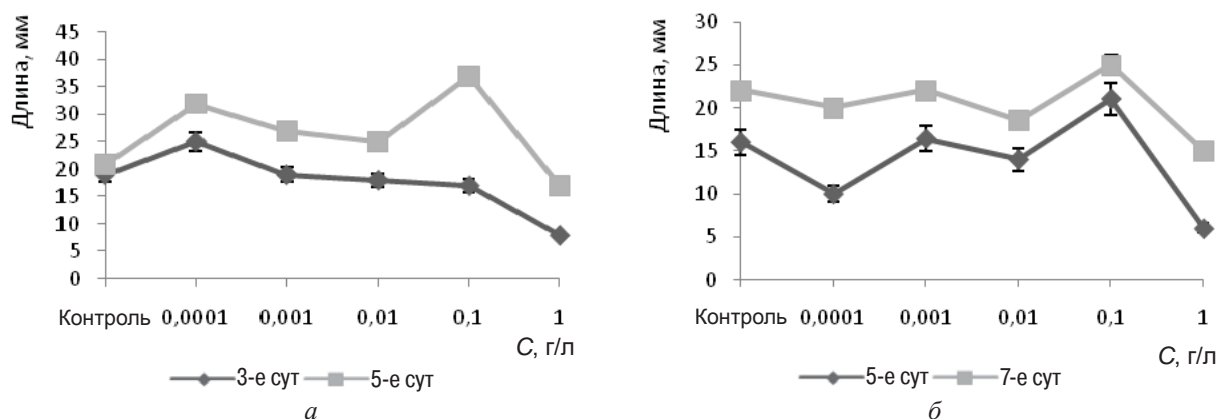


Рис. 5. Графическая зависимость длины корня (а) и стебля (б) проростков гороха от концентрации соединения 1 на 5-е и 7-е сутки эксперимента

вещества увеличивается его стимулирующая активность. На 7-е сутки полученная зависимость имеет выраженный немонотонный характер. Соединение 1 в концентрациях 1; 0,001 г/л ингибирует рост корней гороха, а в концентрациях 0,1; 0,01; 0,0001 г/л является стимулятором роста корня проростков гороха.

Из рис. 5, б следует, что полученные зависимости на различных днях эксперимента имеют аналогичный немонотонный характер, при этом

соединение 1 только в концентрации 0,1 г/л стимулирует рост длины стебля проростков гороха, в большинстве концентраций (0,0001; 0,01; 1 г/л) проявляет в той или иной степени ингибирующую активность. В концентрации 0,001 г/л оказывает действие, аналогичное контролю.

Результаты опытов по действию соединения 2 в концентрациях 1,0; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 г/л на длину корня (а) и стебля гороха (б) на 5-е и 7-е сутки эксперимента представлены на рис. 6.

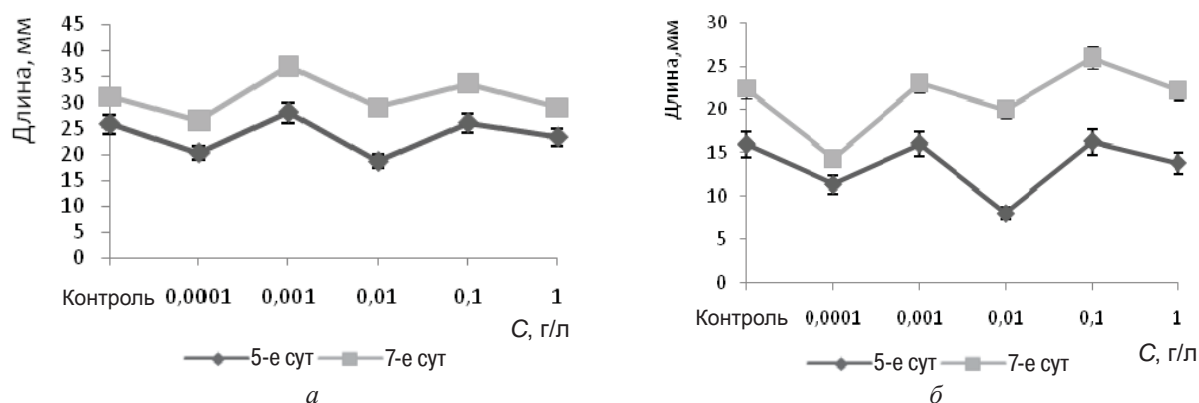


Рис. 6. Графическая зависимость длины корней (а) и стебля (б) проростков гороха от концентрации соединения 2 на 5-е и 7-е сутки эксперимента

Из рис. 6 видно, что зависимости длины корня и стебля проростков гороха от концентрации соединения 2 имеют выраженный немонотонный характер. Соединение 2 (см. рис. 5, а) в концентрациях 0,0001; 0,01; 1 г/л ингибирует рост корня проростков гороха, а в концентрациях 0,001 и 0,1 г/л является стимулятором его роста. Аналогичная зависимость построена для длины стебля гороха от концентрации соединения 2: наибольшее ингибирующее действие соединения 2 оказывает в концентрациях 0,0001; 0,01 (на 7-е сутки); 1 г/л. В концентрациях 0,001; 0,1 г/л вещество незначительно стимулирует рост стебля гороха.

### Выводы

На двух тест-объектах *C. affinis* и бактериях *E. coli* определено токсическое действие двух новых полигетероциклических соединений; определены их летальные (ЛК) и безвредные концентрации (БК): установлено, что соединение 1 является более токсичным, чем соединение 2. Острое токсическое действие соединения 1 проявляется на бактериях в концентрации 1,0 г/л, а на цериодафниях в концентрации 0,1–1 г/л, а соединения 2 токсично в отношении всех тест-объектов в концентрации 1,0 г/л.





Установлено, что оба изучаемых соединения различаются рострегулирующим действием на всхожесть семян пшеницы и гороха: соединение 1 стимулирует всхожесть во всех изучаемых концентрациях, а соединение 2 в низких концентрациях ингибирует всхожесть семян гороха (0,0001–0,001 г/л) и пшеницы (0,0001 г/л), а в более высоких стимулирует их всхожесть (0,01–1,0 г/л для гороха и 0,001; 0,01; 0,1 г/л для пшеницы).

При изучении действия различных концентраций соединений 1 и 2 на ростовые характеристики проростков пшеницы и гороха установлено, что рострегулирующая активность изученных соединений имеет немонотонный характер, при определенных концентрациях стимулируя или ингибируя рост корня и стебля растений, что позволяет воздействовать на ростовые характеристики растений путем изменения концентраций биостимуляторов.

Таким образом, можно заключить, что при концентрациях ниже 1 г/л изученные вещества экологически не опасны и могут использоваться в качестве регуляторов роста и развития некоторых зерновых и овощных сельскохозяйственных культур.

#### Список литературы

1. Мельников Н. Н. Пестициды : химия, технология и применение. М. : Химия, 1987. 312 с.
2. Клочкова И. Н., Аниськов А. А., Щекина М. П., Тумский Р. С. Синтез спиросочлененных гидропиримидинтионов с использованием тиобарбитуровой кислоты // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2016. Т. 16, вып. 1. С. 43–47.
3. Клочкова И. Н., Аниськов А. А., Щекина М. П., Чувайкина С. В., Андреев К. А. Взаимодействие несимметричных  $\alpha,\beta$ -непредельных кетонов с тиобарбитуровой кислотой // Журн. орг. химии. 2013. Т. 49, № 9. С. 1359–1362.
4. Клочкова И. Н., Аниськов А. А., Щекина М. П. Синтез спиropирролидинов и спиropирролизидинов на основе азометинилидов // ХГС. 2014. Т. 50. С. 527–536.
5. Федеральный реестр (ФР) ФР.1.39.2007.03222. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодovitости периодафний. М. : АКВА-РОС, 2007. С. 8–25.
6. Михайлова Р. И., Ревазова Ю. А., Севостьянова Е. М. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению интенсивности бактериальной биоломнессценции тест-системой «Эколюм» (ПНД ФТ 14. 1:2:3:4, 11-04 16. 1:2:3:3. 8-04). М., 2004. С. 5–11.
7. Губина Т. И. Свойства ксенобиотиков и их определение в объектах окружающей среды и пищевых продуктах : лабораторный практикум. Саратов : Изд-во СГТУ, 2015. 44 с.

#### The Determination of Biological Effects of New Heterocyclic Compounds on Plants and the Evaluation of Environmental Safety of Their Application

T. I. Gubina, A. A. Ykhova, S. V. Isaeva,  
R. S. Tumskiy, A. A. Aniskov, I. N. Klochkova

Tamara I. Gubina, Yuri Gagarin State Technical University of Saratov,  
77, Politechnicheskaya Str., Saratov, 410054, Russia, gubinati@mail.ru

Al'bina A. Ykhova, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str.,  
Saratov, 410012, Russia, yxovaaa@rambler.ru

Svetlana V. Isaeva, Yuri Gagarin State Technical University of Saratov,  
77, Politechnicheskaya Str., Saratov, 410054, Russia, isaevav@yandex.ru

Roman S. Tumskiy, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str.,  
Saratov, 410012, Russia, roma\_ronaldinho@rambler.ru

Alexander A. Aniskov, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya  
Str., Saratov, 410012, Russia, aniskovalvis@gmail.com

Iraida N. Klochkova, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str.,  
Saratov, 410012, Russia, v-klochkov1@yandex.ru

Ecotoxicological evaluation of two new polyheterocyclic compounds was spending. Acute toxicity of test substances, their lethal and safe concentration (LC and BC) were determined.

The nature of the biological effect of these compounds on the plants was investigated. The substances were stimulants during the germination of seeds of wheat and peas and inhibitors of the growth of the roots and stems of seedlings. It was determined the effect of various concentrations of tested compounds on the growth characteristics of plants. Their concentration dependences were nonmonotonic, wheat test substances in nearly all concentrations, had an inhibitory effect, for the pea, they exhibited a stimulating and inhibitory activity.

**Key words:** polyheterocyclic compounds, toxicity, growth-regulating activity.

#### Образец для цитирования:

Губина Т. И., Ухова А. А., Исаева С. В., Тумский Р. С., Аниськов А. А., Клочкова И. Н. Определение характера биологического действия новых полигетероциклических соединений на растения и оценка экологической безопасности их применения // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2017. Т. 17, вып. 3. С. 267–273. DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-3-267-273.

#### Cite this article as:

Gubina T. I., Ukhova A. A., Isaeva S. V., Tumskiy R. S., Aniskov A. A., Klochkova I. N. The Determination of Biological Effects of New Heterocyclic Compounds on Plants and the Evaluation of Environmental Safety of Their Application. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2017, vol. 17, iss. 3, pp. 267–273 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-3-267-273.