

Uticaj benz[a]antracena, benzo[a]pirena i tečnog dima na klijavost semena i dužinu klijanaca crvene deteline (*Trifolium pratense*) i lucerke (*Medicago sativa*)

Ispitivan je efekat različitih koncentracija dva odabrana policiklična aromatična ugljovodnika (PAH) – benz[a]antracena (BaA) i benzo[a]pirena (BaP), kao i tečnog dima, na klijanje i parametre rasta crvene deteline (*Trifolium pratense*) i lucerke (*Medicago sativa*). Kontaminacija zemljišta ovim supstancama često je posledica požara koji mogu izbiti u okolini poljoprivrednih površina. Crvena detelina i lucerka su ekonomski značajne ratarske kulture, a proizvode znatan broj semena koja se odlikuju velikom brzinom klijanja. U ovom istraživanju nije utvrđena statistički značajna razlika u procentu klijavosti semena crvene deteline i lucerke u odnosu na kontrolnu grupu, izuzev pri tretmanima BaA i BaP koncentracije 1000 µg/L koje su u potpunosti inhibirale klijanje. Tretman semena BaA nije imao efekta na rast korenaka crvene deteline, dok kod lucerke oni ne pokazuju jednoznačan obrazac rasta. Sa povećanjem koncentracije BaA dužina stabaoceta crvene deteline se smanjuje, dok tretman BaA u koncentracijama od 1 i 10 µg/L stimuliše rast stabaoceta lucerke. Tretman BaP u koncentracijama od 1 i 10 µg/L ima statistički značajan pozitivan efekat na rast nadzemnih delova klijanaca lucerke. Tretman BaP koncentracije 100 µg/L dovodi do inhibicije rasta stabaoceta kod crvene deteline i lucerke. Tečni dim je u svim testiranim koncentracijama ispoljio statistički značajan pozitivan efekat na rast nadzemnih delova lucerke, ali ne i na rast crvene deteline.

Uvod

Policiklični aromatični ugljovodnici (PAH) su organska jedinjenja koja nastaju nepotpunim sagorevanjem organskih materija na visokom pritisku. Sastoje se od tri ili više fuzionisanih benzenovih prstenova. U životnu sredinu dospevaju najvećim delom kroz sagorevanje fosilnih goriva i kao nusprodukti različitih industrijskih procesa, ali i iz prirodnih izvora kao što su šumski požari i vulkanske erupcije (Cerniglia 1992). PAH su polutanti visoke perzistentnosti usled hidrofobnosti, koja raste sa povećanjem broja fuzionisanih benzenovih prstenova (Cerniglia, 1992). Prisustvo različitih PAH i njihova koncentracija u kontaminiranim zemljištima zavise od izvora kontaminacije (Juhász i Naidu 2000).

Pokazano je da su brojni PAH i njihovi heterociklični analozi kancerogeni za ljude i eksperimentalne životinje (Xue i Warshawsky 2005).

Tečni dim je koncentrovani vodeni rastvor prirodne arome dima, dobijen kontrolisanim pirolizom tvrdog drveta. Koristi se u proizvodnji različitih prehrambenih proizvoda, za postizanje tradicionalne arome dima i za konzerviranje hrane. To je složena smeša različitih supstanci, koja sadrži i neke od PAH u različitim koncentracijama, u zavisnosti od tehnologije proizvodnje (Guillen *et al.* 2000). U ovom istraživanju, tečni dim je korišćen za simulaciju uslova šumskog požara.

Jedna od brojnih posledica šumskih požara je i to što semena bivaju izložena dimu. Dim povoljno utiče na klijavost semena različitih vrsta biljaka, onih sa staništa za koja su požari česti i uobičajeni, ali i sa onih za koja nisu. Mehanizmi stimulacije klijanja dimom su slabo istraženi i razlikuju se u zavisnosti od biljne vrste (Abella 2009). Moguće je da dim i neke njegove komponente povećavaju permeabilnost semenjače za kiseonik i vodu, utičući tako povoljno na klijanje. Različite komponente dima *in situ* stupaju u interakciju sa drugim abiotičkim faktorima, po-

Lazar Mitrović, Zelena Gora 41/30, Kraljevo, učenik 3. razreda Medicinske škole

MENTORI: Bojana Mičić i Tomica Mišljenović, Istraživačka stanica Petnica

put temperature i osvetljenosti, i sa njima ostvaruju združeni efekat na klijanje (Abu *et al.* 2016)

Crvena detelina i lucerka su među ekonomski najznačajnijim višegodišnjim leguminozama na našim prostorima. Pored toga, često se javljaju kao pionirske vrste na požarištima.

Ovim istraživanjem simulirani su efekti prirodnih ili antropogeno izazvanih požara, kakvi se mogu desiti na njivama i u njihovoj okolini. Cilj je da se ispituju efekti tečnog dima, kao složene smeše supstanci, kao i BaA i BaP, policikličnih aromatičnih ugljovodonika koji su zastupljeni u dimu, na klijavost i parametre rasta crvene deteline i lucerke.

Materijal i metode

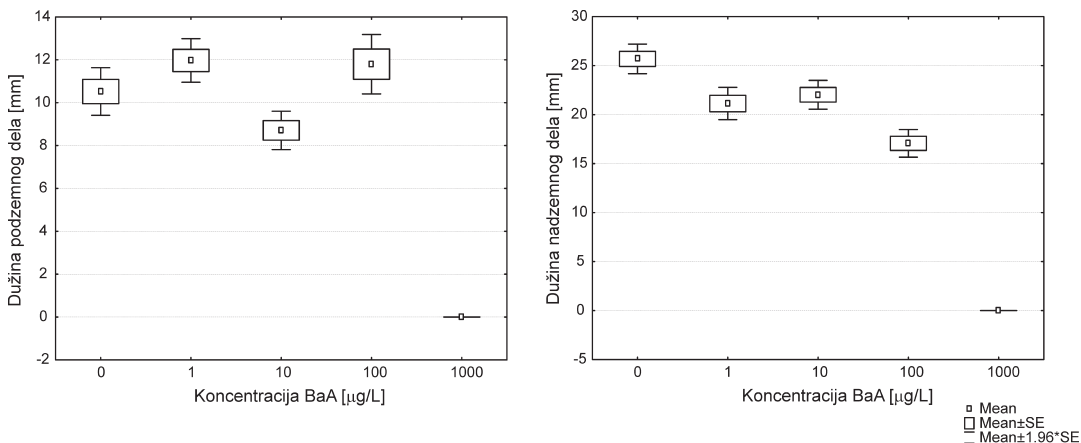
Testirane su koncentracije od 1 µg/L, 10 µg/L, 100 µg/L i 1000 µg/L BaA i BaP i koncentracije od 0.03%, 0.06%, 0.09% i 0.1% tečnog dima. Kao kontrola, korišćena je destilovana voda. Svaka eksperimentalna grupa uključuje po 50 semena, a eksperiment je postavljen u triplicatu. Semena su sterilisana potapanjem u 4% varikinu u trajanju od 10 minuta, nakon čega su tri puta isprana u destilovanoj vodi. Postavljena su na isključivanje na sterilan dvoslojan filter papir u Petrijevim šoljama. Nakon inkubacije od 96 h u mraku na sobnoj temperaturi, određen je procenat klijavosti i izmerene su dužine podzemnih i nadzemnih delova klijanaca.

Rezultati i diskusija

Jednofaktorskom analizom varijanse, praćenom Dunnett-ovim post-hoc testom, nije utvrđena statistički značajna razlika u procentu klijavosti semena crvene deteline i lucerke, između kontrolnih grupa i grupa tretiranih tečnim dimom, BaA i BaP u svim testiranim koncentracijama, sa izuzetkom najviših testiranih koncentracija policikličnih aromatičnih ugljovodonika. Tretman semena BaA i BaP u koncentraciji od 1000 µg/L, doveo je do potpune inhibicije klijanja (rezultati nisu prikazani).

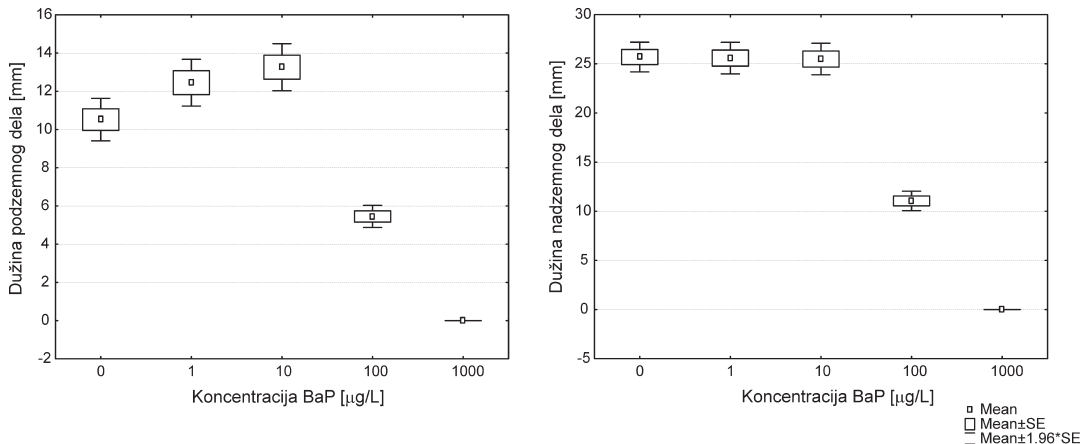
Tretman BaA nije doveo do statistički značajnog efekta na rast korenaka crvene deteline, sa izuzetkom najviše testirane koncentracije, dok je zapaženo da se sa povećanjem koncentracije BaA dužina nadzemnih delova klice smanjuje (slika 1).

Tretman BaP pri koncentraciji od 1 i 10 µg/L dovodi do statistički značajnog pozitivnog efekta na rast podzemnog dela klijanaca crvene deteline, dok su pri koncentraciji od 100 µg/L podzemni delovi klijanaca značajno manje dužine u odnosu na kontrolnu grupu (slika 2a). Pri tretmanima BaP koncentracije od 1 i 10 µg/L nema statistički značajne razlike u dužini nadzemnih delova klijanaca crvene deteline u odnosu na kontrolu, dok su pri tretmanu BaP koncentracije 100 µg/L nadzemni delovi klijanaca značajno kraći u odnosu na kontrolu (slika 2b).



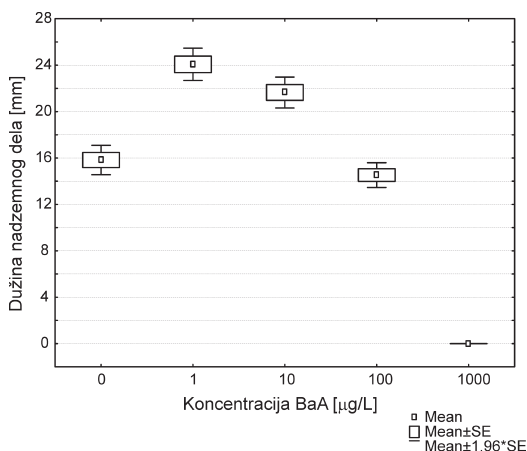
Slika 1. Dužina podzemnih (a) i nadzemnih (b) delova klijanaca crvene deteline nakon tretmana BaA

Figure 1. Red clover roots (a) and shoots (b) length after BaA treatment



Slika 2. Dužina podzemnih (a) i nadzemnih (b) delova klijanaca crvene deteline nakon tretmana BaP

Figure 2. Red clover root (a) and shoot (b) length after BaP treatment

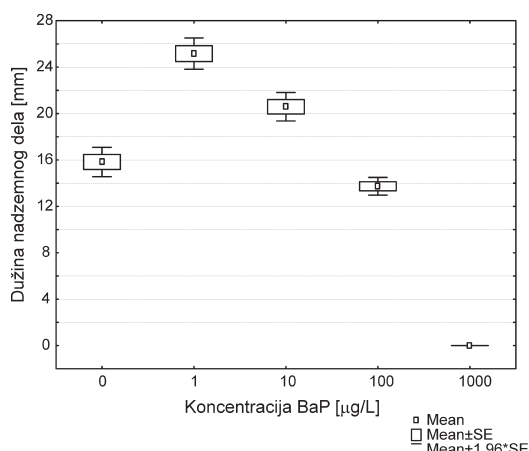


Slika 3. Dužine nadzemnih delova klijanaca lucerke nakon tretmana BaA

Figure 3. Alfalfa shoots length after BaA tretmant

Tretman tečnim dimom nije uticao na dužinu nadzemnih delova crvene deteline (rezultati nisu prikazani). Podzemni delovi klijanaca crvene deteline nisu jednoznačno odgovorili na tretman različitim koncentracijama tečnog dima, pa je potrebno ponoviti eksperiment, kako bi se odstranila mogućnost da je u pitanju eksperimentalna greška (rezultati nisu prikazani).

Pri tretmanu semena lucerke BaA u koncentracijama od 1 i 10 µg/L dužine nadzemnih delova

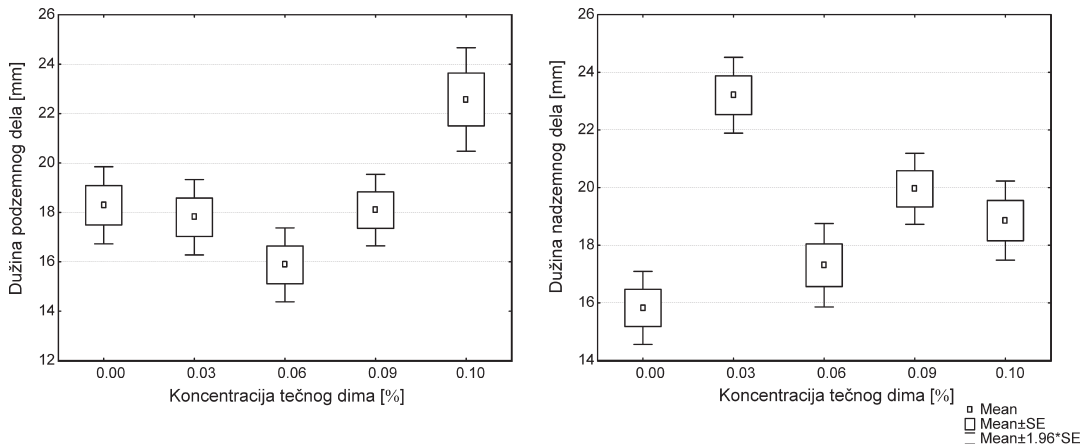


Slika 4. Dužine nadzemnih delova klijanaca lucerke nakon tretmana BaP

Figure 4. Alfalfa shoot length after BaP tretmant

va klijanaca su značajno veće u odnosu na kontrolnu grupu, dok su pri tretmanu BaA u koncentraciji od 100 µg/L dužine nadzemnih delova klice približne onima u kontrolnoj grupi (slika 3). Podzemni delovi klijanaca lucerke ne pokazuju jednoznačan obrazac rasta pri tretmanu različitim koncentracijama BaA (rezultati nisu prikazani).

Pri tretmanu semena lucerke BaP u koncentracijama od 1 i 10 µg/L rast nadzemnih delova



Slika 5. Dužine podzemnih (a) i nadzemnih delova klijanaca lucerke nakon tretmana tečnim dimom

Figure 5. Alfalfa root and shoot length after aqueous smoke treatment

klijanaca je stimulisan u odnosu na kontrolu, dok pri tretmanu BaP u koncentraciji od 100 $\mu\text{g/L}$ stabaoca su manje dužine nego u kontrolnoj grupi (slika 5b). Odgovor podzemnih delova klijanaca lucerke na tretman različitim koncentracijama BaP nije jednoznačan, slično odgovoru na tretman BaA, zbog čega bi eksperiment trebalo ponoviti (rezultati nisu prikazani).

Pri tretmanu semena lucerke različitim koncentracijama tečnog dima rast nadzemnih delova klijanaca je značajno stimulisan koncentracijama 0.03% (slika 5). Efekat tečnog dima na rast podzemnih delova klijanaca nije statistički značajan, izuzev pri koncentraciji od 0.1%, koja je delovala stimulatивно (slika 5).

Različiti autori su beležili kako stimulatívne, tako i inhibitorne efekte BaA, BaP i drugih PAH na parametre rasta, koristeći biljne vrste različite osetljivosti kao model organizme. Možemo pretpostaviti da, slično teškim metalima, različiti PAH u subletalnim koncentracijama deluju kao aktivatori sinteze proteina (Kummerova *et al.* 1995). Time bi se mogla objasniti stimulacija rasta nadzemnih delova kod lucerke pri nižim testiranim koncentracijama BaA i BaP, dok za crvenu detelinu pretpostavljamo da je osetljivija, pa se toksični efekti testiranih PAH ispoljavaju pri nižim koncentracijama nego kod lucerke.

Tečni dim je složena smeša, pa je moguće da je više komponenti odgovorno za stimulaciju rasta klijanaca. Kao vrlo potentan stimulator rasta u literaturi se pominje butenolid, koji nastaje sa-

gorevanjem celuloze. Pokazani su citokinu i auksinu slični efekti butenolida u regulaciji fizioloških procesa nakon isključivanja (Jain *et al.* 2008).

Zaključak

Nije utvrđena statistički značajna razlika u procentu klijavosti semena crvene deteline i lucerke u odnosu na kontrolnu grupu, izuzev pri tretmanima BaA i BaP koncentracije od 1000 $\mu\text{g/L}$, koji su u potpunosti inhibirale klijanje.

Tretman semena crvene deteline BaA nije imao efekta na rast korenaka, dok je na rast stabaoceta pokazao dozno zavisni inhibitorni efekat. Pri tretmanu BaP podzemni delovi klijanaca crvene deteline su bili stimulisani koncentracijama od 1 i 10 $\mu\text{g/L}$, dok je koncentracija od 100 $\mu\text{g/L}$ BaP inhibirala rast kako podzemnih, tako i nadzemnih delova klijanaca crvene deteline.

Rast stabaoceta lucerke bio je stimulisan BaA i BaP u koncentracijama od 1 i 10 $\mu\text{g/L}$, dok su oba testirana PAH u koncentraciji od 100 $\mu\text{g/L}$ inhibirala rast nadzemnog dela klijanaca lucerke. Podzemni delovi lucerke nisu jednoznačno odgovorili na tretman nijednim od dva odabrana PAH, zbog čega bi eksperiment trebalo ponoviti.

Tečni dim je u svim testiranim koncentracijama ispoljio statistički značajan pozitivan efekat na rast nadzemnih delova lucerke, ali ne i na rast crvene deteline.

U daljim istraživanjima potrebno je ispitati mehanizme koji dovode do efekata zabeleženih u ovoj studiji.

Lazar Mitrović

Literatura

Abella S. R. 2009. Smoke-cued emergence in plant species of ponderosa pine forests: contrasting greenhouse and field results. *Fire Ecology*, **5** (1): 22.

Abu Y., Romo J. T., Bai Y., Coulman B. 2016. Priming seeds in aqueous smoke solutions to improve seed germination and biomass production of perennial forage species. *Canadian Journal of Plant Science*, **96**: 551.

Cerniglia C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, **3**: 351.

Guillén M. D., Sopelana P., Partearroyo M. A. 2000. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Liquid Smoke Flavorings Obtained from Different Types of Wood. Effect of Storage in Polyethylene Flasks on Their Concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48** (10): 5083.

Jain N., Stirk W.A., Staden J. 2008. Cytokinin and auxin-like activity of a butenolide isolated from plant derived smoke. *South African Journal of Botany*, **74**: 327.

Juhasz A. L., Naidu R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **45**: 57.

Kummerova M., Slovák L., Holoubek I. 1995. Phytotoxicity studies of benzo[a]pyrene with *Lactuca sativa*. *Toxicological & Environmental Chemistry*, **511** (4): 197.

Xue W., Warshawsky D. 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **206**: 73.

Effect of Benz[a]anthracene, Benzo[a]pyrene and Liquid Smoke on Seed Germination and Seedlings Length of Red Clover (*Trifolium pretense*) and Alfalfa (*Medicago sativa*)

The effect of different concentrations of two selected polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) – benz[a]anthracene and benzo[a]pyrene, and liquid smoke on germination and growth parameters was investigated on red clover (*Trifolium pretense*) and alfalfa (*Medicago sativa*). PAH is generally released into the environment in the process of incomplete burning of organic materials. Liquid smoke is a concentrated aqueous solution of a natural smoke aroma that may contain PAHs at different concentrations. Soil pollution by these substances is often a consequence of fires that can erupt around agricultural areas. Red clover and alfalfa are among the most abundant and economically important field crops, and produce a substantial number of seeds that are characterized by high speed germination. In this study there were no significant differences in the percentage of seed germination of red clover and alfalfa compared to the control group, except with treatments of BaA and BaP at concentrations of 1000 µg/L, which completely inhibited germination. BaA seed treatment did not lead to statistically significant effects on the growth of the radicle of red clover, while the seed of alfalfa did not show an unambiguous pattern of growth. With an increase of concentrations of BaA, the length of the stem of the red clover decreases, while concentrations of BaA of 1 and 10 µg/L stimulate the growth of the stem of alfalfa. BaP at concentrations of 1 and 10 µg/L showed a statistically significant positive effect on the growth of the aerial parts of alfalfa seedlings. Treatment of BaP in concentration of 100 µg/L leads to growth inhibition of the stem of red clover and alfalfa. Liquid smoke at all concentrations showed a statistically significant effect on the growth of the aerial parts of alfalfa, but not in red clover. ☐