

УДК 502/504(470.345)(045)

ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОД МАЛЫХ РЕК РЕСПУБЛИКИ МОРДОВИЯ

©2013 Т.А. Маскаева, М.В. Лабутина, Н.Д. Чегодаева

Мордовский государственный педагогический институт им. М.Е. Евсевьева, г. Саранск

Поступила 07.06.2013

В данной статье представлены данные тестирования воды реки Исса в участке Инсарского района Республики Мордовия на генотоксичность.

Ключевые слова: генотоксичность, мутагены, всхожесть семян, митотический индекс, хромосомные aberrации, мутации.

Малые реки имеют исключительно большое значение в природе и жизни человека, т. к. они являются начальным звеном формирования водных ресурсов страны и определяют состояние средних и крупных рек, водоемов, ресурсов подземных вод. Вместе с тем практика использования малых рек и их водосборов нерациональна, в результате чего их природное состояние нарушается из-за загрязнения сточными водами сельскохозяйственных и промышленных предприятий, непродуманной организации территорий и методов ведения мелиорации, лесного и сельского хозяйства, зарегулирования и изъятия стока. В настоящее время мониторинг малых рек является важнейшим звеном в системе мероприятий по охране и рациональному использованию природной среды. Малые реки особенно чувствительны к антропогенным воздействиям, осуществляемым посредством прямого и косвенного влияния [3]. Из-за небольшой водности таких водоемов негативные последствия антропогенного воздействия здесь проявляются раньше и резче, чем в других экосистемах. В результате тесной связи с окружающим ландшафтом процессы, происходящие на малом водосборе, быстро отражаются на состоянии реки. Экологическое состояние малых рек нередко является угрожающим. Антропогенное воздействие изменяет природные циклы и закономерности существования водных биоценозов. Необходимо знать особенности этих изменений, чтобы прогнозировать их и предотвращать негативные последствия.

При изучении водоемов важной составляющей является оценка генотоксической ситуации. Генотоксиканты – факторы, способные нарушать генетические структуры и процессы. Воздействие их на организмы может приводить к серьезным негативным последствиям, вплоть до вырождения и вымирания видов [13]. В связи с этим общепризнанна необходимость оценки генотоксической активности водоемов для научной разработки природоохранных мероприятий [4]. Однако в настоящее время особенности динамики генотоксической ситуации в малых реках, подвергающихся прессу воздействия генотоксикантов, не изучены, и методология оценки генотоксической ситуации таких водоемов не разработана [3].

В Республике Мордовия проблема загрязнения водных экосистем осязана в ряде работ, проведенных с использованием гидрохимических показателей [5; 6; 15]. Однако, отдаленные последствия действия экотоксикантов, связанные с повреждением генетического аппарата, остаются неизученными. Указанный комплекс нерешенных вопросов определяет актуальность проведенных исследований.

Цель данной работы состояла в изучении генотоксического воздействия загрязнения воды реки Исса в участке Инсарского района Республики Мордовия с использованием тест-объекта *Allium cepa* L.

Исса – правый приток Мокши, протекает по северу Пензенской области и югу Республики Мордовия. Вода реки относится к разряду «Б» 3-го класса очень загрязненных вод (УКИЗВ – 3,81). Кислородный режим оценивается как благоприятный (среднегодовое содержание растворимого кислорода – 12,7 мг/дм³). Основными веществами, определяющими загрязненность воды как характерную, являются нефтепродукты, легкоокисляемые органические вещества по величине БПК, органические вещества по величине ХПК, повторяемость превышений ПДК которых составляла 77–100%. Устойчивая загрязненность воды отмечается азотом аммонийным и железом общим. Увеличилось содержание легкоокисляемых органических веществ по величине БПК в 1,6 раза, фосфатов – в 1,5 раза, железа общего – в 1,1 раза [6].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Забор воды проводился с 3-х разных участков реки Исса: 1) в районе проезжей части – мост за г. Инсар; 2) за селом Нижняя Вязера (больше 1 км от сельскохозяйственных объектов); 3) перед селом Кашаево (вблизи сельскохозяйственных объектов); в течение 2011-2012 гг. летом каждый месяц, осенью (ноябрь), зимой (февраль), весной (май). В качестве контроля опыта использовали дистиллированную воду.

В качестве тест-объекта взят был лук репчатый (*Allium cepa* L). Тест по *Allium cepa* можно использовать для тестирования чистых химических веществ, питьевой воды, природной воды, промышленных отходов, а также является особенно полезным для быстрого скрининга химических веществ, составляющих риск для окружающей среды [7-10, 16-18]. Семена *A. cepa* проращивали в чашках Петри в исследуемых пробах воды в течение 48 ч. Число семян в одной чашке составляло 100 шт. Опыты проводили в 3-х повторностях. Для анализа отбирали проростки с ко-

Маскаева Татьяна Александровна, к.б.н., доцент, e-mail: masckaeva.tania@yandex.ru; Лабутина Марина Викторовна, к.б.н., доцент, зав. кафедрой, e-mail: labutina-m@mail.ru; Чегодаева Нина Дмитриевна, к.с.-х.н., доцент, e-mail: chegodaevand@mail.ru

решками длиной 5-6 мм. В корневой меристеме проростков лука репчатого определяли митотический индекс как процент делящихся от общего количества наблюдаемых клеток. Проростки в утренние часы фиксировались в уксусном спирте (96% этиловый спирт и ледяная уксусная кислота в отношении 3:1) не менее 30 мин. Временные, давленные в хлоралгидрате, препараты готовили из апикальной меристемы и окрасивали ацетокармином по общепринятой методике [12]. Препараты исследовались под микроскопами МТ4300L при увеличении 400х. Митотический индекс рассчитывали по формуле:

$$MI = \frac{\Sigma(P + M + A + T)}{\Sigma(P + M + A + T + I)} \times 100,$$

где в числителе – сумма профаз, метафаз, анафаз и телофаз (число делящихся клеток), в знаменателе – сумма делящихся и не делящихся клеток (I – число клеток находящихся в стадии интерфазы). В каждом варианте подсчитывалось от 2000 до 3000 клеток.

В каждом препарате анализировали все ана-

телофазные клетки и учитывали долю клеток с абберациями хромосом. Анализ спектра аббераций проводили с выделением хроматидных (одиночных) и хромосомных (двойных) фрагментов и мостов. Сложные, нераспознаваемые абберации относили к группе неклассифицируемых.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Всхожесть семян лука во всех случаях ниже контроля (рис. 1). Это показывает, что вода в реке Исса обладает ингибирующим эффектом на всхожесть семян лука. Наименьшая всхожесть семян в течение всего года наблюдалась на участке среди сельскохозяйственных полей перед селом Кашаево. Это показывает, что в данном участке реки вода содержит вещества, ингибирующие клеточное деление. В течение года наименьшая всхожесть на этом участке реки зарегистрирована в осенней водной пробе, а наибольшая – в зимней пробе.

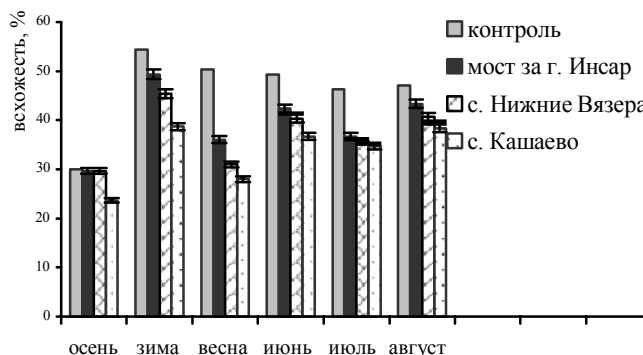


Рис. 1. Динамика всхожести семян *A. cepa* при проращивании в воде р. Исса

Митотическая активность определяет интенсивность роста. Помимо генетической обусловленности этого показателя, на его проявление могут оказывать значительное влияние и факторы внешней среды. При этом ингибирование митотического индекса происходит при высоких уровнях стрессовых воздействий [11]. Поскольку митотический индекс в определенное время суток у конкретного вида – достаточно устойчивый показатель, его изменение может отражать мутагенное действие на исследуемые объекты факторов среды [7].

Из полученных результатов можно сделать вывод, что вода реки Исса в черте Инсарского района обладает митотоксической активностью (рис. 2). Во всех пробах, взятых из разных участков реки Исса, распре-

деление митотоксической активности в семенах лука идет неравномерно. Наибольшая активность митотоксикантов приурочена к сельской местности, где много химикатов, попадающих в реку с полей и бытовых отходов.

Анализ митотической активности в разные сроки отбора проб выявляет существенные колебания. В течение года наименьшая митотическая активность клеток наблюдалась осенью 2011 г. и повышалась зимой 2012 г. Известно, что уменьшение общей продолжительности клеточного цикла приводит к понижению эффективности работы репарирующих систем клетки, и сокращение времени митоза препятствует нормальному расхождению хроматид в процессе деления [2].

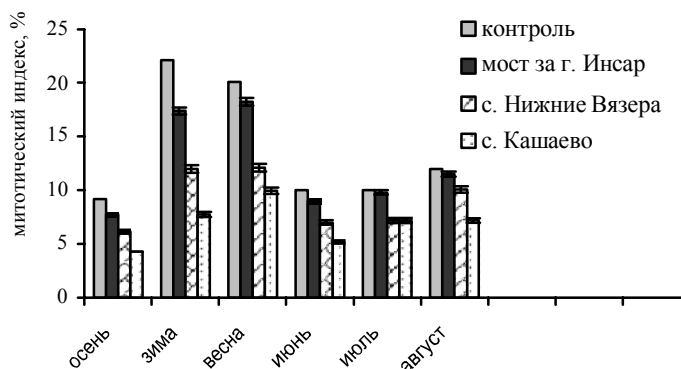


Рис. 2. Митотический индекс клеток апикальной меристемы *A. cepa*

В ходе регистрации хромосомных aberrаций на тест-объекте *A. cerea* было установлено, что вода из реки Исса способна вызывать рост числа патологий митоза клеток апикальной меристемы *A. cerea* (табл.). Индукция хромосомных aberrаций воды р. Исса показала, что наибольший эффект по данному тесту наблюдался для *A. cerea* в участке перед с. Кашаево, наименьший эффект в участке моста за г. Инсар. В ходе анализа был установлен достоверный эффект мутагенности, максимальный в июле месяце, минимальный в весенней пробе воды. Поврежденность клеток во всех вариантах опыта составила 100%.

Проведенный эксперимент показал, что вода, взятая с разных участков индуцирует все типы структурных мутаций: хроматидные и хромосомные aberrации.

Осенью преобладали хромосомные aberrации с одиночными фрагментами, с мостами и неклассифицированными аномалиями. В контексте различной повреждаемости ДНК в зависимости от того, в какой фазе клеточного цикла находятся растительные клетки, отметим, что aberrации хромосомного типа отражают воздействие генотоксикантов, когда клетка находится на стадии G₁; aberrации хроматидного типа происходят, когда клетка находится на стадии S и G₂ [1; 14]. Одиночные фрагменты представляют собой фрагменты хроматидного происхождения. Среди неклассифицированных aberrаций наблюдали отстаивание хромосом и слипание хромосом. Отставшие хромосомы или хроматиды распознаются легко, так как в них можно видеть центромеру либо неоднородность структуры, что нехарактерно для фрагментов.

Таблица. Частота хромосомных aberrаций *A. cerea*, индуцированных водой р. Исса

Варианты опыта		Клетки с aberrациями, %	Типы структурных мутаций			
место взятия пробы	время взятия пробы		Одиночные фрагменты	Двойные фрагменты	мосты	неклассифицированные
контроль	осень	—	—	—	—	—
	зима	—	—	—	—	—
	весна	—	—	—	—	—
	июнь	—	—	—	—	—
	июль	—	—	—	—	—
	август	—	—	—	—	—
проезжая часть – мост за г. Инсар	осень	0,43 ± 0,22	0,05 ± 0,06	0,05 ± 0,06	0,03 ± 0,03	0,63 ± 0,23
	зима	0,70 ± 0,14	0,17 ± 0,07	—	0,17 ± 0,03	0,53 ± 0,10
	весна	0,17 ± 0,18	0,03 ± 0,04	—	0,05 ± 0,03	0,44 ± 0,07
	июнь	0,63 ± 0,11	0,17 ± 0,12	0,13 ± 0,03	0,07 ± 0,03	0,43 ± 0,03
	июль	0,47 ± 0,11	0,06 ± 0,04	—	0,06 ± 0,07	0,30 ± 0,19
	август	0,53 ± 0,11	0,14 ± 0,02	—	0,08 ± 0,05	0,29 ± 0,09
за селом Нижняя Вязера	осень	0,73 ± 0,33	0,13 ± 0,16	0,12 ± 0,02	0,06 ± 0,07	0,64 ± 0,29
	зима	0,87 ± 0,29	0,19 ± 0,03	0,13 ± 0,09	0,15 ± 0,09	0,54 ± 0,06
	весна	0,70 ± 0,18	0,18 ± 0,09	0,16 ± 0,08	0,31 ± 0,01	0,50 ± 0,05
	июнь	1,03 ± 0,11	0,23 ± 0,14	—	0,16 ± 0,03	0,45 ± 0,10
	июль	0,97 ± 0,11	0,30 ± 0,06	0,16 ± 0,07	0,08 ± 0,03	0,45 ± 0,10
	август	0,93 ± 0,18	0,21 ± 0,06	0,08 ± 0,06	0,22 ± 0,01	0,49 ± 0,01
перед селом Кашаево	осень	1,17 ± 0,22	0,17 ± 0,12	0,13 ± 0,08	0,18 ± 0,14	0,85 ± 0,02
	зима	0,97 ± 0,40	0,31 ± 0,10	—	0,16 ± 0,10	0,55 ± 0,04
	весна	0,93 ± 0,16	0,33 ± 0,08	0,17 ± 0,05	0,25 ± 0,01	0,50 ± 0,06
	июнь	1,70 ± 0,37	0,27 ± 0,03	0,19 ± 0,05	0,20 ± 0,02	0,65 ± 0,21
	июль	2,13 ± 0,29	0,64 ± 0,24	—	0,16 ± 0,03	0,77 ± 0,08
	август	1,50 ± 0,12	0,38 ± 0,11	0,09 ± 0,06	0,33 ± 0,17	0,68 ± 0,02

Зимой преобладали хромосомные aberrации с одиночными фрагментами и неклассифицированными аномалиями. Для *A. cerea* во втором и четвертом вариантах опыта встречались клетки с одиночными фрагментами, мостами и неклассифицированными aberrациями, в третьем варианте опыта – клетки с одиночными и двойными фрагментами, мостами и неклассифицированными аномалиями.

Весной преобладали хромосомные aberrации с одиночными фрагментами, мостами и неклассифицированными аномалиями. Преобладающим типом хромосомных aberrаций в июне и июле являлись одиночные фрагменты и неклассифицированные аномалии. Мосты, которые возникают из-за появления дикентриков или из-за того, что один кинетохор прикреплен микротрубочками одновременно к двум противоположным полюсам веретена деления встречались в небольших количествах. Мосты иногда разделяют на хромосомные и хроматидные. По «толщине» моста нельзя судить о его хромосомном или хрома-

тидном характере. К сожалению, не всегда можно дифференцировать характер моста и поэтому нецелесообразно проводить такое разделение при использовании тотального метода окрашивания хромосом, не позволяющего идентифицировать отдельные хроматиды.

В августе встречались все типы хромосомных aberrаций: одиночные и двойные фрагменты, мосты и неклассифицированные aberrации. Двойные фрагменты – это фрагменты изохроматидного или хромосомного происхождения. Следует отметить, что двойные разрывы обеих нитей более опасны для функционирования ДНК, так как при этом безвозвратно утрачивается часть генетической информации.

Таким образом, наибольшей генотоксичностью обладает вода реки Исса в участке Инсарского района в летний и осенний периоды, когда отмечается высокая хозяйственная деятельность человека. По полученным результатам можно дать следующие практические рекомендации: 1) в мониторинге природных и

искусственных водоемов рекомендуется использовать наряду с другими методами цитогенетический метод анализа, дающий прямую оценку суммарного токсического и генотоксического загрязнения вод; 2) при анализе генотоксического воздействия загрязнённых вод на объекты природы следует использовать одновременно несколько взаимодополняющих критериев для повышения объективности оценки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ахиянц И.Л., Сентурова Л.Г. Проблемы генетико-морфологического мониторинга волжской воды // Естественные науки. Журнал фундаментальных и прикладных исследований. 2005. № 3. С. 25-28.
2. Бабкина Э.И., Сурнин В.А., Самсонов Д.П. Полигоны захоронения пестицидов как источники загрязнения окружающей среды // Научные и технические аспекты охраны окружающей среды. 2004. № 2. С. 49-59.
3. Будников Г.К., Евтюгин Г.А. Обобщенная оценка загрязнения вод с помощью биологических (биохимических) методов анализа // Научные и технические аспекты охраны окружающей среды. 2002. № 5. С. 87-111.
4. Буторина А.К., Вострикова Т.В., Бельчинская Л.И., Кондратьева Л.В. Влияние промышленных сточных вод на цитогенетические показатели березы повислой // Лесное хозяйство. 2005. № 6. С. 27-28.
5. Голубчик М.Е., Еремкин В.О., Ионов В.С., Лузгин А.С. Все о Мордовии. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2001. 720 с.
6. Государственный доклад о состоянии и об охране окружающей среде в Республике Мордовия в 2011 г. Шумкин В.Т., Макейчев А.Н., Черашев Р.В. и др. (ред.). Саранск: Министерство лесного, охотничьего хоз-ва и природопользования Респ. Мордовия, 2012. С. 38-39.
7. Довгалоук А.И., Калиняк Т.Б., Блюм Я.Б. Оценка фито- и цитотоксической активности соединений тяжелых металлов и алюминия с помощью корневой апикальной меристемы лука // Цитология и генетика. 2001. Т. 35. № 1. С. 3-9.
8. Довгалоук А.И., Калиняк Т.Б., Блюм Я.Б. Цитогенетические эффекты солей токсичных металлов в клетках апикальной меристемы корней проростков *Allium cepa* L. // Цитология и генетика. 2001. Т. 35. № 2. С. 3-10.
9. Илющенко В.П., Щегольков В.Н. Чувствительность *Allium*-теста к присутствию тяжелых металлов в водной среде // Химия и технология воды. 1990. Т. 12. № 3. С. 275-278.
10. Евсеева Т.И., Гераськин С.А., Шуктомова И.И., Храмова Е.С. Комплексное изучение радиоактивного и химического загрязнения водоемов в районе расположения хранилища отходов радиевого промысла // Экология. 2003. № 3. С. 176-183.
11. Крышнев И.И., Алексахин Р.М., Рябов И.Н., Фесенко С.В. Радиоактивное загрязнение районов АЭС. М.: Ядерное общество СССР, 1990. 150 с.
12. Магулаев А.Ю. Приготовление временных цитологических препаратов // Биология в школе. 1980. № 3. С. 45-46.
13. Пашин Ю.В., Козаченко В.И., Зацепилова Т.А., Бахитова Л.М. Химические мутагены окружающей среды. М.: Наука, 1983. С. 95-107.
14. Тимошевский В.А., Назаренко С.А. Интерфазная цитогенетика в оценке геномных мутаций в соматических клетках // Генетика. 2005. Т. 41. № 1. С. 5-16.
15. Ямашкин А.А. Антропогенное воздействие на географическую оболочку. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 1998. С. 32-35.
16. Fiskesjo G. *Allium* test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters // Plants for Environmental Studies / W. Wang, J. W. Gorsuch i J. S. Hughes (eds). New York: Lewis Publishers. 1997. P. 308-333.
17. Kovalchuk O., Kovalchuk I., Arkhipov A., Telyuk P., Hohn B., Kovalchuk L. The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident // Mutat Res. 1998. Jul 8; 415 (1-2). P. 47-57.
18. Rank J., Nielsen M.H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay // Mutat Res. 1998. Oct 12; 418 (2-3). P. 113-119.

ECOLOGICAL AND GENETIC STUDY OF THE WATERS OF RIVERS OF THE REPUBLIC OF MORDOVIA

©2013 T.A. Maskaeva, M.V. Labutina, N.D. Chegodaeva

Mordovia State Pedagogical Institute named M.E. Evseviev, Saransk

In this article testings of water of the river Issah in a site of the Insarsky area of the Republic of Mordovia on a genotoxicity are submitted data.

Keywords: genotoxicity, turbidity, viability of seeds, mitotic index, chromosomal aberration, mutations.

Tatyana Maskaeva, Candidate of Biology, associate professor, e-mail: masckaeva.tania@yandex.ru; Marina Labutina, Candidate of Biology, associate professor, head of department, e-mail: labutina-m@mail.ru; Nina Chegodaeva, Candidate of Agriculture, associate professor, e-mail: chegodaevand@mail.ru