

## НЕКОТОРЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ АККУМУЛЯЦИИ ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В ОТДЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТАХ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ ВОРОНЕЖСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА

Е. Ю. Иванова

*Воронежский государственный университет*

Наши исследования показывают, что среди образцов отдельных компонентов водной экосистемы Воронежского водохранилища, водоросли (*Chara foetida*) наиболее активно накапливают генотоксические соединения. Донный грунт и вода являются более слабыми аккумуляторами. Способность водорослей активно накапливать мутагены из окружающей среды позволяет использовать их как чувствительный показатель общего загрязнения водоема. Химические методы анализа накопления в воде и донном грунте СПАВ и ароматических углеводов не позволяют объяснить результаты, полученные в тесте Эймса сальмонелла/микросомы. Под действием генотоксикантов изменяется активность пероксидазы водорослей, что может быть использовано в качестве индикатора уровня загрязнения.

Для исследования мутагенной активности химических соединений созданы и в настоящее время широко используются различные биологические тест-системы, среди которых наиболее популярным является тест Эймса сальмонелла/микросомы. Живые организмы не только пассивно накапливают мутагены, но и активно метаболизируют их, выводя из организма. У животных основную роль в процессах детоксикации играет монооксигеназная система, которую, в частности, используют для метаболической активации ксенобиотиков в тесте Эймса. У растительных организмов эти процессы в основном осуществляются водорастворимым ферментом пероксидазой.

Одним из примеров водных экосистем, подвергающихся значительной антропогенной нагрузке, может служить Воронежское водохранилище. В бассейне реки расположены Новолипецкий металлургический комбинат, а вдоль самого водохранилища – еще ряд высокоразвитых промышленных предприятий: вагоноремонтный завод, Воронежский завод электроламповых трубок, объединение «Электроника», авиазавод, завод синтетических каучуков, теплоэлектростанция, шинный завод, которые заметно влияют на уровень загрязнения водоема.

Согласно данным гидрогеологических и гидрохимических исследований водохранилище мож-

но условно разделить на три участка: верхний, средний и нижний, – различающихся по глубине и объему поступающих сточных вод. Средний участок водохранилища расположен в черте города и на его гидрохимический режим влияют стоки промышленных предприятий и городской ливневый сток.

В водных экосистемах растения являются первым звеном в пищевых цепях, именно с них в водоемах начинается аккумуляция мутагенных ксенобиотиков из донного грунта и воды. В качестве объекта исследований нами были выбраны харовые водоросли (*Chara foetida*), которые наиболее многочисленны среди других растительных форм акватории Воронежского водохранилища.

При исследовании загрязнения Воронежского водохранилища мутагенными ксенобиотиками необходимо было изучить: 1) накопление мутагенных соединений в различных компонентах водных биогеоценозов – воде (В), донных отложениях (До), водорослях (Вр); 2) накопление ароматических углеводов и анионоактивных СПАВ в водной среде; 3) активность пероксидазы харовых водорослей; 4) накопление мутагенных ксенобиотиков и активность пероксидазы харовых водорослей при содержании их в аквариуме в присутствии промутагенного соединения 2-ацетиламинофлуорена (2-ААФ).

Для решения поставленных задач весной и осенью в пяти точках среднего участка водохра-

нилища отбирали пробы воды, донного грунта и водорослей (*Chara foetida*). Мутагенную активность экстрактов проб изучали в тесте Эймса сальмонеллы/микросомы [3, 4] на тестерных штаммах сальмонеллы, учитывающих мутации типа сдвига рамки считывания (ТА 98) и замены оснований (ТА 100) в присутствии (+МА) [промутагены] и без (-МА) [прямые мутагены] индуцированной 3-метилхолантронем системы метаболической активации ксенобиотиков из печени крыс. Результаты экспериментов представлены в виде мутагенного индекса (МИ) – отношение числа колоний сальмонеллы, выросших в условиях опыта, к таковому в контроле (диметилсульфоксид – ДМСО). Мутагенными считали пробы, значения МИ которых было не меньше 1,8.

Экстракцию мутагенных ксенобиотиков осуществляли многократно системой органических растворителей ацетон-гексан (1:1). Объединенные экстракты упаривали на ротаторном испарителе и растворяли в ДМСО в расчете 100 мкг сухого веса экстракта на 1 мл ДМСО.

Ароматические углеводороды и анионные СПАВ определяли фотокolorиметрически по стандартным методикам.

Активность пероксидазы водорослей, измеряемую по стандартной методике [2], определяли в природных (1) и лабораторных (2) условиях. 1. Водоросли, собранные на Воронежском водохранилище, сразу гомогенизировали и измеряли пероксидазную активность в супернатанте, сравнивая ее с активностью пероксидазы водорослей того же вида, выращенных в аквариуме. 2. Постановка модельного эксперимента. Харовые водоросли из Воронежского водохранилища помещали в аквариумы с отстоянной водой и содержали при естественном освещении. Через 10 дней вносили спиртовой раствор 2-ацетиламинофлуорена из расчета 1, 10 и 50 мг на литр. Для измерения активности пероксидазы пробы отбирали через 1, 3, 5, 7, 10, 15 и 20 суток. Параллельно фиксировали пробы водорослей с целью определения способности исследуемых растений аккумулировать 2-ацетиламинофлуорен в динамике эксперимента.

В результате исследования обнаружено, что в образцах проб Воронежского водохранилища накапливаются как прямые, так и промутагенные генотоксические соединения, вызывающие мутации только одного тестерного штамма сальмонеллы – ТА 98. Наиболее часто мутагенный эффект с выраженной сезонностью обнаруживается в пробах нижней части водохранилища в районе ТЭЦ-1.

Увеличение концентрации мутагенных ксенобиотиков в конце летнего периода обнаружено нами и при исследовании Рыбинского водохранилища, что связано с повышенным в этот период уровнем обмена веществ живых организмов.

По сравнению с пробами воды и донных отложений водоросли чаще накапливают прямые и промутагенные ксенобиотики. Следовательно, водные растения являются не только продуцентами водных экосистем, но и первичными аккумуляторами ксенобиотиков и, в частности, мутагенных соединений. Это дает возможность выделить харовые водоросли в качестве индикаторного организма для Воронежского водохранилища.

В результате проведенных исследований содержания ароматических углеводородов и СПАВ установлено, что в воде их концентрация не превышает предельно допустимой. Донные отложения значительно лучше аккумулируют исследуемые соединения, чем вода. Превышение уровня ПДК было обнаружено в пяти из пятнадцати исследованных образцов. Наиболее высокие концентрации обнаружены в районе моста ВОГРЭС. Можно предположить, что на состояние водохранилища здесь оказывают влияние сточные воды, находящиеся в этом районе предприятий. Также превышение уровня ПДК отмечено в районе Чернавского и Северного мостов на левом берегу водохранилища. Возможно, это связано с выбросами предприятий расположенных в Северо-восточном районе города.

Если сравнить полученные данные с результатами исследования аккумуляции генотоксических соединений, то можно отметить, что наибольшее количество проб, проявляющих мутагенные эффекты в тесте Эймса, также обнаружены в районе моста ВОГРЭС. Мутагенные эффекты типа замены оснований (штамм ТА100) обнаружены в районе Северного моста, там же отмечены повышенные концентрации СПАВ и ароматических углеводородов. Однако, в районе Чернавского моста, где накопление детергентов не обнаружено значимого превышения мутагенных индексов, а мутагенные эффекты в районе Отрожкинских железнодорожных мостов, проявлены в тесте на фоне наиболее низких концентраций исследуемых веществ. Следовательно, невозможно объяснить полученные в тесте Эймса данные, только накоплением в воде и донных отложениях ароматических углеводородов и СПАВ.

По данным литературы, накопление ксенобиотиков водорослями влияет на уровень перокси-

дазной активности [1]. Для проверки этого положения был проведен лабораторный эксперимент по изучению сравнительной динамики накопления мутагенных ксенобиотиков и активности пероксидазы у харовых водорослей, отобранных в Воронежском водохранилище.

Получены следующие результаты: 1) активность пероксидазы в период с 7 по 20 день плавно падает с примерно одинаковой скоростью во всех вариантах опыта; 2) скорость падения активности в первые 7 дней заметно различается в зависимости от концентрации 2-ацетиламинофлуорена; 3) угол наклона прямых, отражающих скорость падения активности, равен, соответственно, для различных вариантов опыта: 50 мг/л – 50°; 10 мг/л – 70°; 1 мг/л – 80°; контроль – 85° (рис. 1).

Дозы для данных вариантов опыта выбирались в ходе предварительных экспериментов эмпирически. Минимальная концентрация 2-АФ позволяет водорослям накапливать промутаген из воды в количествах, которые регистрируются тестом Эймса. При концентрации 2-АФ в воде, более 50 мг/л водоросли слишком быстро погибают, что не позволяет проследить динамику накопления и изменения активности. Поэтому для эксперимента были выбраны две пограничные концентрации и одна промежуточная.

Накопление 2-АФ водорослями регистрировалось в тесте Эймса и имело характер экспоненциального роста (рис. 2). Основные различия в скорости накопления приходятся на первые пять дней. Водоросли, помещенные в аквариум с высокой концентрацией промутагена, накапливают его быстрее и, соответственно раньше достигают уровня плато. Далее накопление практически прекращается во всех аквариумах. Только после 15 дней

экспозиции наблюдается довольно резкое повышение мутагенности экстракта водорослей из аквариума с максимальной концентрацией 2-АФ. Это объясняется пассивной адсорбцией промутагена на поверхности уже погибшей водоросли.

Сравнивая изменение активности пероксидазы водорослей со скоростью накопления 2-АФ можно отметить, что эти величины обратно пропорциональны, т.е. падение активности пероксидазы сопровождается увеличением накопления промутагена.

Далее, нами было проведено исследование природного уровня пероксидазы водорослей и определение мутагенной активности соответствующих образцов. Накопление водорослями генотоксических ксенобиотиков отмечено в районе ТЭЦ-1 и здесь же зафиксирован самый низкий уровень пероксидазной активности.

Прямая мутагенная активность образцов обнаружена в нижних точках средней части водохранилища. В районе ТЭЦ-1 прямые мутагены выявлены в водных растениях в ходе всех трех экспедиций. В районе Чернавского моста в водорослях также найдены прямые мутагены. В самой нижней из исследованных нами точек Воронежского водохранилища, район Гидроузла, обнаружены прямые мутагены в экстракте воды.

Как было сказано выше, в организме животных происходит трансформация поступающих ксенобиотиков. Чтобы моделировать этот процесс в тест-системе на бактериях, не имеющих ферментов модификации, в опыт вводят микросомную фракцию печени крыс (варианты +МА). Добавление фракции может снижать или полностью устранять значение обнаруженного мутагенного эффекта, то есть детоксицирующая система организ-

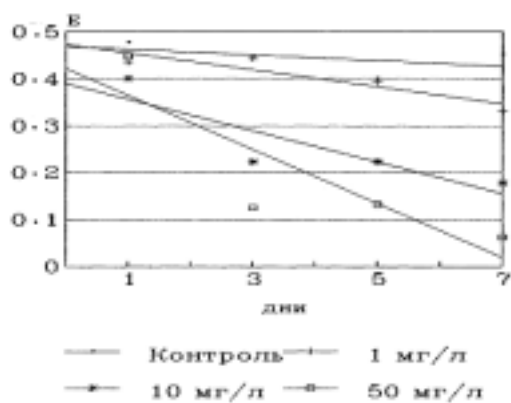


Рис. 1. Накопление 2-ААФ водорослями, регистрируемое в тесте Эймса сальмонелла/микросомы в присутствии метаболической активации

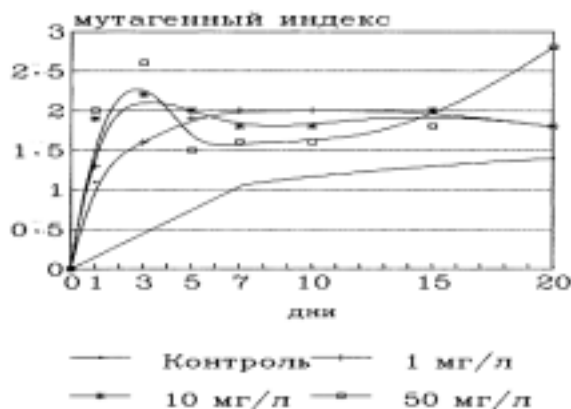


Рис. 2. Активность пероксидазы (мкмоль/мин мг пробы)

ма способна обезвредить данные чужеродные соединения. Генотоксические соединения такого типа были обнаружены в воде около Гидроузла и водорослях, отобранных в ходе первой экспедиции в районе ТЭЦ-1. Микросомная фракция, вводимая в опыт полностью детоксицировала прямые мутагены, обнаруженные в этих экстрактах.

Кроме того, микросомная фракция может не оказывать существенного влияния. Таковы прямые мутагены, обнаруженные в водорослях из районов ТЭЦ-1 и Чернавского моста. Экстракты этих проб проявляют примерно равный слабый мутагенный эффект как в варианте без метаболической активации, так и в ее присутствии.

Существует обширный класс соединений (так называемые истинные промутагены), которые становятся генотоксичными только после взаимодействия с системой метаболической активации млекопитающих. Поступающие в организм соединения, не способные непосредственно связываться с молекулой ДНК, после трансформации в детоксицирующей системе приобретают свойства мутагенов и канцерогенов. Такие вещества были обнаружены в воде из района Окружного моста и ТЭЦ-1, а также в донном грунте из района ТЭЦ-1.

Таким образом, результаты исследований показывают, что среди исследованных образцов водоросли (*Chara foetida*) наиболее активно накапливают генотоксические соединения. Донный грунт и вода являются более слабыми аккумуляторами. Подобная активность водорослей может объясняться тем, что они аккумулируют в процессе роста и метаболизма генотоксические соединения из воды и донного грунта. Способность водорослей активно накапливать мутагены из окружающей среды позволяет использовать их как чувствительный показатель общего загрязнения водоема.

Корреляции между накоплением ароматических углеводов и СПАВ и мутагенными эффектами, проявленными в тесте Эймса, обнаружить не удалось. Следовательно, невозможно объяснить полученные данные, только накоплением в воде и донных отложениях исследуемых соединений.

Активность пероксидазы харовых водорослей значительно лучше коррелирует с результатами теста Эймса. Таким образом, харовые водоросли Воронежского водохранилища являются наиболее активными аккумуляторами генотоксических ксенобиотиков, а методы биотестирования более эффективны для их обнаружения в водной среде.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева В.А. Фермент пероксидаза / В.А. Андреева. – М.: Наука, 1988. – 128 с.
2. Едрева А. Активность пероксидазы / А. Едрева // Генетика и Селекция. – 1989. – Т. 22, №4. – С. 354-365.
3. Ильницкий А.П. Канцерогенные вещества в водной среде / А.П. Ильницкий, А.А. Королев, В.В. Худoley. – М.: Наука, 1993. – 219 с.
4. О распределении канцерогенных углеводов в пресноводных водоемах. / А.П. Ильницкий [и др.]. – М.: Наука, 1979. – 236 с.
5. Фонштейн Л.М. Тест-система для оценки загрязненности среды на сальмонелле: метод. указания / Л.М. Фонштейн [и др.]. – М.: Изд-во МГУ, 1977. – 107 с.
6. Addis P.B. Some lipid oxidation products of xenobiotics in Foods and Feeds / P.B. Addis, A.S. Csallamy, S.E. Kindom // ACS Symposium. : Amer. Chem. Soc., Washington. – 1987. – Ser. 234. – P. 85-98.
7. Ames B.N. Method for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian microsomes mutagenicity test / B.N. Ames., J. Mc. Cann, E. Jamasaki. – Mutat. Res. – 1975. – V. 31. – P. 347-364.