

УДК 579.5:526.633.64

Т. В. Васильева, канд. биол. наук, В. И. Мединец, канд. физ.-мат. наук,
Н. Ю. Васильева, инж., Н. Н. Панченко, канд. биол. наук,
О. А. Ковтун, ассист., Я. И. Ляликов, студ.
Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, кафедра
микробиологии и вирусологии,

ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА В ПРИДУНАЙСКИХ ОЗЕРАХ

Методами биотестирования с использованием бактериальной тест-системы *S. typhimurium* TA 100 изучены токсичность и мутагенная активность воды и донных отложений Придунайских озер. Определены уровни и распределение генотоксических показателей в природных биоценозах озер Китай, Кагул, Картал, Котлабух и Ялпуг. Установлено сезонное проявление проверяемых показателей, максимум которых регистрировали в летнее время года. Методами математической статистики выявлена корреляционная взаимосвязь генотоксических показателей и данных химического анализа воды Придунайских озер, которая носит как линейный, так и нелинейный характер.

Ключевые слова: экологический мониторинг, придунайские озера, токсичность, мутагенность

Исследование природных экосистем в условиях естественной и антропогенной изменчивости является одним из важнейших направлений природоохранной деятельности. Постоянно существующее и возрастающее антропогенное вмешательство приводит к негативным изменениям природных биоценозов. Одним из таких наиболее ярких примеров являются Придунайские озера. Экологическая проблема этого региона состоит, с одной стороны, в уникальности водно-болотных угодий с высоким биоразнообразием и биопродуктивностью, а, с другой, – в критическом уровне антропогенной нагрузки. Придунайские озера эвтрофированы, высокие концентрации биогенных элементов привели к развитию гипоксии; в озерах нарушены процессы самоочищения и восстановления биологической полноценности, наблюдается массовая гибель рыбы [1-3].

В 2000 году начаты работы по выполнению проекта ТАСИС «Придунайские озера», одной из задач которого является проведение глобального экологического мониторинга придунайских озер, в том числе по генотоксическим показателям [4].

В связи с вышеизложенным основной целью данной работы было биотестирование на токсичность и мутагенность воды и донных отложений придунайских озер – Кагул, Кугурлуй, Китай, Котлабух и Ялпуг.

Материалы и методы

Объектами исследования были вода и донные отложения придунайских озер — Ялпуг, Кугурлуй, Китай, Котлабух и Кагул. Исследования проведены в период 2000-2001 годов. В 2000 году для биотестирования донные отложения отбирали весной (оз. Кагул, Кугурлуй, Ялпуг) и летом (оз. Картал, Китай и Котлабух). Донные отложения — один из наиболее информативных компонентов экосистемы водоемов, которые отражают всю совокупность процессов, протекающих в них и на всей площади водосбора. В условиях современной токсификации донные отложения могут быть индикаторами загрязнения водоемов различными веществами: органическими, неорганическими, биогенными. Донные отложения, обладая кумулятивными свойствами, накапливают генотоксиканты и тем самым обуславливают качество воды всего водоема. По данным исследований в донных отложениях континентальных водоемов содержание тяжелых металлов в 2-16 раз больше, чем в почвах региона, с которыми они генетически связаны, и в десятки тысяч раз больше, чем в воде водоемов. В связи с вышесказанным наряду с биотестированием воды были проведены работы по выявлению генотоксической активности донных отложений придунайских озер.

Биотестирование по генотоксическим показателям (оценку токсичности и мутагенности) проводили с применением бактериальных моделей. Бактерии являются первичными звеньями водных и почвенных биоценозов; они в первую очередь реагируют на воздействие различных факторов окружающей среды, поэтому их использование для целей биологического контроля экологически обосновано. К преимуществам бактериальных и, еще, водорослевых, моделей относится возможность регистрации эффекта стимуляции роста и развития живых организмов под влиянием загрязнителей. Таким действием обладают низкие концентрации ядов, некоторые химические соединения, в том числе неорганические и биогенные элементы. Кроме того, используемые нами модели являются стандартными в мировой практике генетических исследований.

Бактериальные модели позволяют определять такие качества объектов окружающей природной среды: воды, донных отложений, почвы, а также индивидуальных химических веществ, как токсичность и мутагенность. Токсичность — это свойство или качество, приводящее к гибели живых организмов; мутагенная активность является причиной перестроек в их генетическом аппарате. Использование бактериальных тест-систем позволяет проводить исследования на различных уровнях биологической организации живых систем. Так, в бактериальной тест-системе *S. thyphimurium* TA 100 токсическое действие определяли на популяционном уровне, а индукцию мутаций — на клеточном.

Характеристика тест-объекта. Используемый для биотестирования мутантный штамм *Salmonella thyphimurium* TA 100 дефектен по системе синтеза гистидина и биотина, и, вследствие этого, не способен к самостоятельному размножению вне лабораторных условий. Мутация

gal bio urv В вызывает дополнительные нарушения систем восстановления поврежденной ДНК за счет синтеза эндонуклеазы 1, повышение проницаемости клеточной стенки бактерий и нарушения в синтезе биотина (bio). Наличие плазмиды рЖМ 101 обеспечивает устойчивость к ампициллину и повышает частоту спонтанного и индуцированного мутагенеза. Использование указанного штамма позволяет регистрировать токсическое действие и выявлять мутации, возникающие по типу замены пар оснований, обусловленные плазмидой his D 33052 [5,6].

В основу методического приема биотестирования на токсичность и мутагенность положено использование тест-объекта в стандартном физиологически активном состоянии (фаза логарифмического роста); предварительное культивирование тест-объекта в жидких питательных средах с введением испытуемых агентов (опыт) и без них (контроль); последующий высев тест-объекта на плотные питательные среды. При этом на МПА колонии формируют все жизнеспособные клетки сальмонеллы (оценка токсичности); на селективной среде САС – his-ревертанта [7,8].

Показателем токсического действия было статистически достоверное уменьшение количества жизнеспособных клеток *Salmonella thyphimurium* 100 в опыте, по сравнению с контролем. Критериями степени токсического действия были: гибель 50,0% и более клеток тест-объекта – сильное токсическое действие; гибель от 35,0 до 50,0 % — умеренное токсическое действие; гибель в пределах 15,0-35,0 % — слабое токсическое действие; гибель 15,0 и менее % клеток тест-объекта рассматривалась как отсутствие токсического действия [8].

Показателем мутагенного действия было количество мутантных клеток сальмонеллы в опыте, по сравнению с контролем. Критерием мутагенного действия служило статистически достоверное отклонение проверяемого показателя [8].

В контроле количество жизнеспособных клеток принято за 100,0 %, а уровень спонтанного мутагенеза — за 1,0.

Результаты и их обсуждение

Как показали наши исследования, проведенные в 2000 году, донные отложения Придунайских озер при биотестировании в бактериальной тест-системе *Salmonella thyphimurium* TA 100 обладали негативными биологическими эффектами и приводили, с одной стороны, к гибели клеток тест-объекта и, с другой, – к индукции мутаций типа замены пар оснований.

Весной донные отложения Придунайских озер Кагул, Кугурлуй и Ялпуг токсическим действием при биотестировании в бактериальной тест-системе *Salmonella thyphimurium* TA 100 не обладали; численность жизнеспособных клеток сальмонеллы под влиянием донных отложений озер Кугурлуй и Ялпуг практически не отличалась от контроля. Согласно выбранному критерию, токсичность донных отло-

жений озера Кагул была слабой; количество нежизнеспособных клеток в опыте не превышало 30,0% (табл. 1).

В то же время, летом токсичность донных отложений озер Картал и Котлабух была сильной — численность нежизнеспособных клеток сальмонеллы соответствовала 50,0 и более %; в озере Китай — умеренной — гибель клеток сальмонеллы не превышала 40 % (табл. 1).

Таблица 1
Генотоксические характеристики донных отложений Придунайских озер по результатам наблюдений 2000 года

Проверяемый показатель	Придунайские озера					
	Весна			Лето		
	Кагул	Кугурлуй	Ялпуг	Картал	Китай	Котлабух
Токсичность, число жизнеспособных клеток, %	70,0	90,0	90,0	50,0	60,0	40,0
Мутагенность, отн. ед.	17,0	6,0	1,0	16,0	10,0	4,0
Контроль	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Помимо токсического эффекта, исследуемые донные отложения обладали мутагенной активностью. Количественные значения проверяемого показателя были различными — от максимально высоких (17,0 отн.ед) до сравнимых с контрольными значениями (1,0 отн. ед.). По убыванию количества мутаций, индуцируемых донными отложениями весной Придунайские озера можно расположить следующим образом: Кагул (17,0 отн. ед.) > Кугурлуй (6,0 отн. ед.) > Ялпуг (1,0 отн.ед.). Летом количественные значения проверяемого показателя донных отложений позволили расположить исследуемые озера следующим образом: Картал (16,0 отн.ед.) > Китай (10,0 отн.ед.) > Котлабух (4,0 отн. ед.).

Таким образом, результаты биотестирования свидетельствуют о высоком уровне загрязнения донных отложений изученных Придунайских озер генотоксическими факторами.

Привязка полученных результатов к месту отбора проб позволяет выделить на фоне общего загрязнения локальные места с высоким уровнем мутагенного потенциала (табл. 2).

К ним с полным правом отнесены населенные пункты, в которых уровень мутагенной активности превышал контрольные показатели в 2,0 – 7,0 раз (табл. 2). В местах интенсивной хозяйственной деятельности — фермы, каналы — донные отложения индуцировали выход мутантных колоний в 36,0 — 100,0 раз превышающий спонтанный уровень (табл. 2). Высокие генотоксические показатели донных отложений на станциях у р. Дунай возможно связаны с загрязнителями,

которые поступают вместе с речной водой. Станции в центре озера также характеризуются высоким уровнем мутагенной активности.

Таблица 2

Количественные показатели мутагенной активности донных отложений Придунайских озер в различных точках отбора

Озера	Расположение станций						
	низовья	населенные пункты	центр озера	пляжи	фермы	Дунай	каналы
Ялпуг*	1,0	2,0	—	—	—	—	
Кугурлуй*	1,0	—	—	—	—	—	
Кагул*		7,0	20,0	1,0	36,0	—	3,2
Картал	—	—	3,0	—	—	5,0	100,0
Китай	—	3,0	—	—	4,0	4,0	12,0
Котлабух	—	2,5	—	—	—	—	—

Примечание: * — исследования проведены весной 2001 года.

В плане выполнения программы ТАСИС в 2001 году проведены сезонные: весна, лето, осень, определения токсичности и мутагенной активности воды и донных отложений озер Кагул, Ялпуг, Китай, Котлабух и Кугурлуй. Для генотоксического анализа в каждом озере воду и донные отложения отбирали на 2-х станциях, расположенных в верховьях и в низовьях вышеуказанных озер.

В этих исследованиях установлено, что вода и донные отложения изученных Придунайских озер обладали не только прямым, но и «специфическим» токсическим действием, которое регистрировали по стимуляции роста и развития клеток сальмонеллы. Полученные результаты обусловлены загрязнением Придунайских озер разнообразными химическими соединениями, как неорганическими, так и органическими, для которых характерна способность индуцировать выявленные ответные реакции тест-объекта. Полученные данные соответствуют результатам химического анализа и не противоречат имеющимся литературным сведениям [3,4,8].

Мутагенную активность воды и донных отложений Придунайских озер в бактериальной тест-системе *S. typhimurium* TA 100 регистрировали только в летнее время года (табл. 3). Максимальный мутагенный потенциал установлен для воды озера Котлабух (38,0 отн. ед.); далее в порядке убывания количественных значений проверяемого показателя исследуемые озера образуют следующий ряд: Кагул (5,0 отн. ед.) > Ялпуг (4,0 отн. ед.) > Кугурлуй (3,0 отн. ед.) > Китай (2,3 отн. ед.). Мутагенная активность донных отложений озера Котлабух в 10,0 раз превышала спонтанный уровень (табл. 4). Донные отложения озер Кагул, Ялпуг и Китай индуцировали выход *his*-ревертантов в 4,8 – 1,2 раза больше контрольного уровня. Превышение проверяемого

показателя в 2 раза зафиксировано при биотестировании донных отложений озера Кугурлуй (табл. 4).

Сравнительный анализ полученных результатов позволил выявить сезонное проявление генотоксичности, максимальные значения которой регистрировали в летнее время года. Кроме того, независимо от озера, на станциях, расположенных в верховьях исследованных озер уровень мутагенности был выше, чем на станциях, расположенных в низовьях (табл. 3, 4).

Таблица 3

Мутагенная активность воды Придунайских озер по результатам наблюдений 2001 года

№ станции	Время года	Придунайские озера			
		Кагул	Китай	Ялпуг	Котлабух
1*	весна	1,7	1,0	1,0	1,0
	лето	5,0	2,3	4,0	38,0
	осень	1,5	1,0	1,0	1,0
Контроль		1,0	1,0	1,0	1,0
2*	весна	1,0	1,0	1,0	1,0
	лето	1,0	1,0	1,0	1,5
	осень	1,0	1,0	1,0	1,0
Контроль		1,0	1,0	1,0	1,0

Примечание: 1* — станция отбора проб расположена в верховьях озера; 2* — станция отбора проб расположена в низовьях озера.

Данные химического анализа свидетельствуют об устойчивом загрязнении Придунайских озер тяжелыми металлами, стойкими органическими соединениями, радионуклидами: цезий-137, радий-226, торий-232, калий-40. Согласно существующим украинским стандартам, нормой является полное отсутствие вышеперечисленных загрязнителей [1-3].

Методами математической статистики выявлена корреляционная зависимость между данными химического анализа и результатами биотестирования. Результаты математической обработки указывают на наличие прямой корреляционной зависимости мутагенного эффекта, нитритами и значениями БПК (табл. 5). Прямой корреляционной зависимостью связаны общий и аммонийный азот и показатели токсичности. Уравнением непрямой корреляционной взаимосвязи описывается токсический эффект, общая минерализация, общий фосфор, нитрат и нитрит ионы (табл. 5).

Необходимо отметить, что общие закономерности проявления генотоксических показателей воды и донных отложений Придунайских озер и других природных водоемов Южного региона — Днестровский лиман, водохранилища Ивановского, Коминтерновского и Березовского районов — сопоставимы. Их характеризует значительный общий уро-

вень мутагенного потенциала с выделением локальных мест с высокой мутагенной активностью, причиной которой является интенсивная антропогенная деятельность — это фермы, населенные пункты и т. д. Для всех изученных водоемов характерна сезонность с максимальным проявлением негативных биологических эффектов в летнее время года [9].

Таблица 4
Мутагенная активность донных отложений Придунайских озер по результатам наблюдений 2001 года

№ станции	Время года	Придунайские озера			
		Кагул	Китай	Ялпуг	Котлабух
1*	весна	1,0	1,0	1,0	1,0
	лето	4,8	1,0	1,5	1,0
	осень	1,0	1,0	1,0	1,0
Контроль 2*		1,0	1,0	1,0	1,0
	весна	1,0	1,0	1,0	1,0
	лето	1,2	1,0	1,3	10,0
	осень	1,0	1,0	1,0	1,0
Контроль		1,0	1,0	1,0	1,0

Примечание: 1* — станция отбора проб расположена в верховьях озера; 2* — станция отбора проб расположена в низовьях озера.

Таблица 5
Коэффициенты корреляционной зависимости между данными генотоксического анализа и гидрохимическими показателями воды Придунайских озер

Весна 2001 г	Гидрохимические показатели					
	фосфаты	общий фосфор	N-NH ₄	N-NO ₃	N-NO ₂	БПК ₅
Мутагенность	0,25	0,20	-0,10	-0,27	-0,07	0,45
Токсичность	-0,23	-0,34	-0,04	0,01	-0,08	-0,53

Лето 2001 г	Гидрохимические показатели							
	минерализация	фосфаты	общий фосфор	общий азот	N-NH ₄	N-NO ₃	N-NO ₂	БПК ₅
Мутагенность	0,13	-0,02	-0,23	0,14	-0,32	0,70	-0,07	0,40
Токсичность	-0,60	0,30	0,60	0,42	0,53	-0,40	-0,52	-0,04

Приведенные результаты не вызывают сомнения в том, что экосистемы Придунайских озер испытывают значительную антропогенную нагрузку, приводящую к снижению способности к самоочищению

и восстановлению биологической полноценности их биоценозов. Полученные данные указывают на определяющую роль в концентрации и распределении мутагенных факторов донных отложений изученных озер. Выявленные количественные закономерности указывают на связь негативных биологических эффектов, индуцируемых компонентами экосистемы, с химическим загрязнением. Полученные данные могут быть использованы для создания банка данных экологического мониторинга Южного региона.

Данные исследования проведены при финансовой поддержке проекта ЕС-Тасис WW SCRE 1/ № 1 «Придунайские озера: устойчивое сохранение и восстановление естественного состояния и экосистем». Авторский коллектив выражает глубокую благодарность участникам программы и сотрудникам офиса за всестороннюю помощь при ее выполнении.

Литература

1. Горюпан П., Мединец В.И. Интегрированный экологический мониторинг придунайских озер и бассейна их водосбора: стратегия, программа и методология // Наукові записки. Серія: Біологія. Спеціальний випуск: гідроекологія. Тернопільський педуніверситет ім. В. Гнатюка. — 2001. — 4 (14). — С. 207-209.
2. Гонченко Е.П., Кулакова П.А. Экологические проблемы придунайских озер Украины // Наукові записки. Серія: Біологія. Спеціальний випуск: гідроекологія. Тернопільський педуніверситет ім. В. Гнатюка. — 2001. — 4 (14). — С. 189-190.
3. Исследования токсических веществ в экосистемах придунайских озер / В. И. Мединец, Ю. М. Деньга, В. А. Воробьев и др. // Наукові записки. Серія: Біологія. Спеціальний випуск: гідроекологія. Тернопільський педуніверситет ім. В. Гнатюка. — 2001. — 4 (14). — С. 213 – 214.
4. Результаты гидроэкологических исследований придунайских озер весной и летом 2000 года / В. И. Мединец, Т. В. Васильева, Е. И. Газетов и др. // Наукові записки. Серія: Біологія. Спеціальний випуск :гідроекологія. Тернопільський педуніверситет ім. В. Гнатюка. — 2001. — 4 (14). — С. 74 – 75.
5. Ames B. N., Lee F. D., Durstin W. An improved bacterial test system of the detection and classification of mutagen and cancerogens // Proc. Nat. Fc. Sci. USA. — 1973. — 70, № 3. — P. 782 – 786.
6. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхарда. — М.: Мир, 1984. — С. 98 – 127.
7. Панченко Н. Н., Кияницкая М. А. Выявление генотоксического действия приоритетных компонентов загрязнений и культур клеток бактерий на микробных системах // Методические основы комплексного глобального мониторинга океана. — М.: Гидрометеоздат, 1988. — С. 103 – 148.
8. Оценка токсичности и мутагенности некоторых приоритетных компонентов загрязнения в бактериальной тест-системе *Salmonella typhimurium* TA 100 / Т. В. Васильева, В. А. Иванюца, Н. Н. Панченко и др. // Технические и системные методы экологического мониторинга. — Тр. Ин-та кибернетики НАН Украины, 1998. — С. 64 – 68.
9. Васильева Н. Ю., Панченко Н. Н., Васильева Т. В. Комплексний мікробіологічний контроль вод полігону «Балай» // Вісник Одеського національного університету. — 2001. — Т.6, випуск I. — С. 111 – 116.

Т. В. Васильєва, В. І. Медінець, Н. Ю. Васильєва, М. М. Панченко,
Я. І. Ляліков

Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова,
кафедра мікробіології і вірусології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

ЧИСЕЛЬНІ ПОКАЗНИКИ І РОЗПОДІЛ МУТАГЕНОГО ПОТЕНЦІАЛУ У ПРИДУНАЙСЬКИХ ОЗЕРАХ

Резюме

Методами біотестування з використанням тест-системи *Salmonella typhimurium* TA 100 вивчені токсичність і мутагенна активність води і донних відкладень Придунайських озер. Визначені рівні та розподіл генотоксичних показників у природних біоценозах озер Китай, Кагул, Картал, Котлабух і Ялпуг. Встановлено сезонне проявлення показників токсичності і мутагенності, максимум яких реєстрували тільки влітку. Методами математичної статистики з'ясовано кореляційний зв'язок між генотоксичними показниками і результатами хімічного аналізу води Придунайських озер.

Ключові слова: екологічний моніторинг, Придунайські озера, токсичність, мутагенність

N. V. Vasilyeva, V. I. Medintes, N. Yu. Vasilyeva, N. N. Panchenco,
O. A. Kovtun, Ya. I. Lyalikov

Odessa National I. I. Mechnikov University,
Department of microbiologic and virology,
Dvoryanscaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

QUANTITATIVE INDEXES AND DISTRIBUTION OF MUTAGENITY POTENTIAL IN THE LOWER DANUBE LAKES

Summary

Mutagenity and toxicity activity of water and soil of the Lower Danube Lakes were studied with bioassay methods using the bacterial test-system *Salmonella typhimurium* TA 100.

Levels and distribution of genotoxicity activity in natural biosystems of Kitay, Kagyl, Kartal, Katlabuch and Yalpug lakes were defined. The seasonal dynamics of studied indexes (maximum was registered in summer) was defined.

The correlation (on-line and non-line) between genotoxicity indexes and chemical analysis data of Lower Danube Lakes was found with mathematical statistic methods.

Key words: ecological monitoring, Lower Danube Lakes, toxicity, mutagenity.