

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ В МОНИТОРИНГЕ ПОЧВ ПРИ ТЕХНОГЕННОМ ЗАГРЯЗНЕНИИ МИКРОЭЛЕМЕНТАМИ

Цитогенетический анализ выявил мутагенную опасность сточных вод газоперерабатывающей промышленности как факторов микроэлементного загрязнения почв. Проведен модельный эксперимент, целью которого являлось определение роли Ni и его антагонистов – Cu и Zn – в формировании мутагенного фона. В эксперименте учтены предмутационные события, происходящие в растительных клетках.

Ключевые слова: мутагены, микроэлементы, химические загрязнители, металлы, предмутационные события, время гидролиза.

Введение. В течение 30 лет сточные воды Оренбургского газохимического комплекса (ОГХК) утилизируются на сельскохозяйственных полях орошения (ЗПО). В результате многолетнего орошения в почвах ЗПО и в кормах, получаемых с полей орошения, содержание солей Ni, Zn, Cu и ряда других микроэлементов выше допустимых концентраций. Нами [5] установлена зависимость валового содержания Cu, Zn, Ni, Pb, Mn, Mo в кормах от их концентрации в почве, она выражается коэффициентом корреляции – 0,83. Распределение микроэлементов в почвах и растениях при орошении сточными водами ОГХК показано в таблице 1. В отличие от остальных элементов Cu и Cг не задерживаются в почвах, а локализуются в растениях. С каждым годом наблюдается динамичное возрастание концентрации металлов в растениях [3]. Таким образом, возникает растительная популяция, толерантная к техногенному воздействию, способная стать опасным звеном трофической связи. Изучение роли отдельных загрязняющих компонентов в формировании реакций растений на токсикацию представляет интерес при разработке систем очистки сточных вод предприятия и технологий рекультивации земель.

Избыток солей металлов в окружающем растворе оказывает повреждающее действие на клеточные структуры. Некоторые агенты способствуют деформации мембраны, ее фрагментации. Неорганические соли металлов оказывают влияние на деления в клетке и ядерный аппарат. Способность ингибировать митоз и вызывать хромосомные аномалии возрастает вместе с увеличением молекулярной массы элементов. Существует также значимая корреляция между дозой солей металлов и цитотоксическим действием. Индуцированные в растении

и животных хромосомные аномалии включают в себя изменения в структуре хромосом: фрагментации, инверсии, транслокации; дефекты веретена: разрывы, полиплоидию, К-митозы и др. Длительное воздействие солей металлов ведет к резкому изменению клеточной активности, хромосомным aberrациям и снижению митотического индекса [10]. Многие профазные клетки могут возвращаться в интерфазное состояние. У них наблюдается наличие разрушенных или раздробленных ядер. Некоторые клетки полностью теряют ядра в результате полной дезинтеграции ядерного материала. Встречаются двуядерные клетки, из-за задержки клеточного цикла, в котором ДНК хромосом реплицирована, но не распределяется обычным образом. Встречаются трех-, четырехполярные клетки из-за нарушения синтеза элементов веретена деления. Разнообразие и степень аномалий в клетках зависят от физико-химических свойств загрязнителя – потенциального мутагена [8].

Целью нашего эксперимента было выявление мутаций и предмутационных эффектов, вызываемых воздействием микроэлементов в отдельности и комплексе. К предмутационным эффектам мы отнесли ингибирование процессов деления и усиление белкового синтеза на основании представлений о стимулирующем и ингибирующем действии химических мутагенов [7]. Выбор солей Ni, Cu и Zn для модельного эксперимента был основан на том, что они представлены в сточных водах в предельно допустимых концентрациях для вод, предназначенных для орошения, и в почвах наблюдается неблагоприятное для растений соотношение этих элементов: $\min Cu/Ni=0,19$; $\max Cu/Ni=0,45$. Существуют мнения, что повреждающее дей-

ствие никеля на растения не проявляется, если соотношение Cu/Ni в почвах равно или более 1. Кроме того, учитывалось то, что Zn выступает как критический кофактор на рост клеток, особенно в фазах репродукции и дифференцировки. Известна его роль в нуклеиновом обмене, процессах транскрипции, стабилизации нуклеиновых кислот, белков и, особенно, компонентов биологических мембран [1]. Все три компонента являются генетически активными по отношению к штаммам ТА 1535, ТА 1537, ТА 98, ТА 102 в тесте Эймса по данным Wong [14]. Cu и Zn являются антагонистами Ni и ингибируют абсорбцию этого элемента на 25–42%, а в высоких дозах Zn ингибирует передвижение Cu [13].

Методика. Повреждения митотических хромосом и нарушения митоза исследовали в соответствии с методиками, предложенными Паушевой [6]. В качестве объекта использовали лук *Allium cepa*. Корешки лука проращивали в исследуемом растворе до 9–10 мм при комнатной температуре, фиксировали уксусным алкоголем на холоде. Мацерацию проводили 10%-ным раствором соляной кислоты. Для окраски корня помещали в ацетокармин, окрашивание проводили с кипячением в водяной бане в течение 10 мин; затем приготавливали давленные препараты, определяли митотическую активность (MI), анализировали хромосомные aberrации. Помимо вышеуказанных показателей дополнительно учитывали время, необходимое для мацерации (гидролиза) (HT); число ядрышек в ядре клеток [4]. Пробы отбирались в трех точках: №1 – сточные воды из емкости сезонного регулирования (ЕСР); №2 – сточные воды, поступающие в ЕСР; №3 – сточные воды придонного уровня. В качестве контроля использована дистиллированная вода.

Модельный эксперимент на определение цитогенетических эффектов компонентов сточной воды включал варианты растворов (в мг/л):

1. Медь углекислая – 5*; 0,5; 0,05; 0,005**
2. Никель углекислый – 7*; 0,7; 0,07; 0,007**
3. Двухлористый цинк – 10*; 1,0; 0,10; 0,010**
4. Комбинация солей:

– медь углекислая – 5*; 0,5; 0,05; 0,005**

– никель углекислый – 7*; 0,7; 0,07; 0,007**

– двухлористый цинк – 10*; 1,0; 0,10; 0,010**

* концентрации металлов в почве

** концентрации металлов в сточной воде

ОГХК.

Таблица 1. Распределение микроэлементов в почвах и растениях при орошении сточными водами ОГХК (по Гариповой, 1998)

Элемент	Ba	Pb (Mn)*	Sr	Cu (Mn) (Ni)	Co (Ni)	Sn	Mo	Zn (Mn) (Ni)	Mn	Ni (Mn)
Локализация в почве*	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
в растениях*	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+

(*) антагонисты элемента

Таблица 2. Влияние сточных вод ОГХК на цитогенетические показатели в клетках корневой меристемы лука

№ точки отбора пробы	Митотический индекс, %		Митотический индекс к контролю, %	Число клеток с нарушениями на 1000 клеток		
	сточные воды	контроль		полиплоидных	с отставаниями хромосом	с фрагментами хромосом
1.	132,7±3,8	34,5±2,2	384,4	0	0	0
2.	192,3±4,2	97,9±5,6	196,0	2,28±0,06	4,55±0,02	0
3.	139,5±6,9	28,6±4,7	487,7	1,32±0,04	2,63±0,02	0
α = 0,05						

Таблица 3. Изменение митотического индекса в зависимости от концентрации микроэлементов в сточных водах

Показатели	Образцы сточной воды		
	1	2	3
Содержание микроэлементов, мг/л	0,742	1,055	0,647
Сухой остаток, мг/л	1884	1410	1500
Сумма микроэлементов от сухого остатка, %	0,039	0,075	0,043
MI к контролю, %	196,0	69,1	117,6
MI в контроле, %	97,9±5,6	52,8±4,2	78,6±4,6
α = 0,05			

Статистическая обработка результатов включала определение средней арифметической и ее стандартной ошибки по трем независимым повторностям. Сравнение средних значений в контроле и вариантах опыта проводили, используя t-критерий Стьюдента с использованием приложения Microsoft Excel. В таблицах указывается среднее значение показателя с доверительным интервалом при уровне значимости 0,05.

Результаты исследований и обсуждение. По результатам тестирования сточные воды ОГХК у растений не вызывали фрагментации хромосом, индуцировали отставания хромосом, а также значительные изменения показателя митогенности (MI) относительно контроля (табл. 2).

Таблица 4. Изменение цитогенетических показателей под влиянием сточных вод ОГХК и солей никеля, меди, цинка

Вариант*	Время необходимое для мацерации	Митотический индекс, %	Число клеток с ядрышками более двух на 1000 клеток
Контроль	3'17"± 0'06"	111,5±8,8	2,2±0,4
Пробы с точки № 2	4'05"±0'07"	68,4±5,2	25,1±3,0
Пробы с точки № 3	3'12"±0'04"	58,1±6,8	21,80±4,2
Медь углекислая, 5 мг/л*	2'36"±0'06"	78,2±6,3	18,45±2,9
Медь углекислая, 0,5 мг/л	3'11"± 0'08"	98,6±7,2	3,0±1,2
Медь углекислая, 0,05 мг/л	3'15"± 0'07"	117,6±8,1	2,8±0,9
Медь углекислая, 0,005 мг/л	3'12"± 0'08"	120,3±7,9	1,8±3,0
Цинк двухлористый, 10 мг/л*	3'42"±0'05"	89,1±4,9	30,99±3,2
Цинк двухлористый, 1,0 мг/л	3'26"± 0'07"	102,5±8,2	5,2±2,4
Цинк двухлористый, 0,10 мг/л	3'27"± 0'08"	121,5±4,0	1,6±2,0
Цинк двухлористый, 0,010 мг/л	3'19"± 0'06"	109,4±7,8	1,2±0,4
Никель углекислый, 7 мг/л *	10'47"±0'03"	52,4±6,7	28,57±3,4
Никель углекислый, 0,7 мг/л	3'31"± 0'08"	121,5±7,3	3,2±0,8
Никель углекислый, 0,07 мг/л	3'16"± 0'07"	108,4±8,0	2,0±0,5
Никель углекислый, 0,007 мг/л	3'18"± 0'09"	126,7±6,9	0,9±0,4
Медь углекислая (5 мг/л) + никель углекислый (7 мг/л)+ цинк двухлористый (10 мг/л)*	2'23"±0'06"	38,4±6,2	42,2±4,1
Медь углекислая (0,5 мг/л) + никель углекислый (0,7 мг/л)+ цинк двухлористый (1,0 мг/л)	3'07"± 0'09"	97,3±8,8	5,2±2,3
Медь углекислая (0,05 мг/л) + никель углекислый (0,07 мг/л)+ цинк двухлористый(0,10 мг/л)	3'09"± 0'08"	116,5±7,4	3,2±0,7
Медь углекислая (0,005 мг/л) + никель углекислый (0,007 мг/л)+ цинк двухлористый (0,010 мг/л)	3'11"± 0'07"	127,5±9,1	2,8±0,6
$\alpha = 0,05$			

* – Статистически достоверные отличия относительно контроля

Нами замечено, что показатель митогенности в различных пробах варьирует в зависимости от общего содержания микроэлементов в сухом остатке (табл. 3). Так, при содержании микроэлементов в концентрации 1 мг/л подавляется митотическая активность ткани на 30,9%, а при концентрации 0,6–0,7 мг/л – стимулируется на 17–96%. Последнее подтверждает значимость суммы минимальных концентраций микроэлементов в формировании биологической активности сточных вод.

В результате модельного эксперимента на корешках лука не выявлены хромосомные и геномные нарушения по исследованным компонентам сточных вод в дозах: медь углекислая – 5 мг/л; никель углекислый – 7 мг/л; цинк двухлористый – 10 мг/л (табл. 4).

В меньших концентрациях не наблюдали статистически достоверных различий относительно контроля, выявляли тенденции к стимулированию или ингибированию митотической активности.

Во всех вариантах наблюдали снижение показателей митотического индекса и увеличе-

ние числа ядрышек. Корешки, полученные на фоне повышенной концентрации Си, легче подвергались мацерации, а следовательно, корнеобразование протекало в условиях измененного режима формирования клеточной оболочки и межклеточного пространства. Это, безусловно, отражается на транспортной функции мембран и функциональности корневой системы. Можно предположить нарушение избирательности поглощения окружающего раствора клеточными мембранами и усиление всасывающей способности корня на фоне токсичных концентраций Си.

Корешки, полученные в условиях воздействия Ni, вызывали значительное – более чем в 3 раза относительно контроля – увеличение времени, необходимого для мацерации. Этот свидетельствует о формировании утолщенной клеточной оболочки, уплотнении межклеточного пространства и блокировании всасывающей способности корня. Огрубление тканей корня, повышение их ломкости наблюдали и при изготовлении препаратов.

Корешки, полученные при воздействии Zn, незначительно увеличивали показатель *HT*.

В присутствии Cu эффекты уплотнения тканей, вызываемые никелем и цинком, исключались. При этом относительно контроля увеличилось число клеток с ядрышками более двух в 19 раз и сопровождалось подавлением показателя митотической активности ткани – в 2,9 раза. Таким образом, можно предполагать, что разряжение ткани способствовало проникновению Ni и Zn в активную зону корешка, где наблюдались максимальное угнетение митотического деления и мобилизация синтетических процессов. Усиление метаболизма в индуцированных токсикантами тканях мы связываем с синтезом стрессовых белков, мобилизацией металлотиионеинов.

В пользу сказанного, по исследованиям Nishizoho Hiromi с соавт. [12], изучавших распределение Cu и Zn в растениях двух загрязненных местностей и незагрязненной, более 90% тяжелых металлов в корнях было локализовано во фракции клеточных стенок, величина объемной емкости клеточных стенок для Cu была выше, чем для Zn. Таким образом, ионы Cu обладали более высоким сродством к клеточной стенке, чем ионы Zn.

В исследованиях Kennedy C.D. и Gonsalves F.A. [11] введение микроэлектродов в клетки

эпидермиса корня определило, что Cu и Zn являются деполяризаторами транскорневого потенциала и ингибируют H^+ -отток, при этом максимальная скорость ингибирования H^+ -отока у меди выше, чем у Zn.

Таким образом, ни один из компонентов модельного эксперимента, взятых в токсичных дозах, не индуцировал генетические нарушения на корешках лука. Но в отдельности, и особенно при совместном влиянии на ткань корневой системы, соли Ni, Cu и Zn ингибировали митотическое деление, усиливали белковый синтез в клетках. Исходя из эмпирического и теоретического источников, можно предположить, что усиленное поглощение Cu из субстрата корневой системой и локализация ее в растениях объясняется повышенной биогенной активностью элемента. Ni и Zn накапливаются в почвах по причине меньшей проникающей способности в сравнении с солями меди. С этим связано неблагоприятное соотношение Cu/Ni и накопление Zn в исследуемых почвах. Концентрация меди способна нарушить барьерный потенциал корневой системы и способствовать кумуляции прочих токсикантов в тканях и, следовательно, являться проводником и индуктором предмутационных процессов в растительных тканях.

Список использованной литературы:

1. Авцын А.П., Жаворонков А.А., Риш М.А., Строчкова Л.С., 1991. Микроэлементозы человека: этиология, классификация, органопатология. – М.: Медицина, 496 с.
2. Гарипова Р.Ф., 1998. Токсикогенетическая оценка сточных вод газоперерабатывающей промышленности: Автореф. канд. дис. Оренбург, изд-во ОГУ, 20 с.
3. Гарипова Р.Ф., Калиев А.Ж., 2004. Динамика микроэлементного состава почв и растений, подверженных воздействию сбросных вод газоперерабатывающей промышленности. // Вестник ОГУ. 2004. №10. С. 110-112.
4. Гарипова Р.Ф., 2008. // Патент на изобретение RU №2322669 от 02.07.2007. Способ комплексного биотестирования воды, почвы, биологически активных веществ в фитогестах. Бюл. №11. от 20.04. 2008. 6 с.
5. Калиев А.Ж., 1995. Экологическая оценка влияния газоперерабатывающего комплекса на окружающую среду: Автореф. докт. дис. Курск, 29 с.
6. Паушева З.П., 1988. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 120 с.
7. Раппопорт И.А., 1984. Действие генетически активных веществ на фенотип и чистота генетического состояния // Химический мутагенез в повышении продуктивности сельскохозяйственных растений. – М.: Наука, С. 85-97.
8. Физиология растительных организмов и роль металлов, 1989. /Под ред. Н.М. Чернавской. – М.: Изд-во МГУ, 156 с.
9. Ченцов Ю.С., 1984. Общая цитология. – М.: МГУ, 352 с.
10. Heck J.D., Costa M., 1982. // Biol. Trace Element Res. Vol. 4. №3. P. 319-330.
11. Kennedy C.D., Gonsalves F.A.N., 1987. The action of divalent zinc, cadmium, mercury, copper and lead on the trans-root potential and H^+ efflux of excised roots // J. Exp. Bot. Vol. 38. №190. P. 800-817.
12. Nishizono H., Kubota K., Suzuki S., Jshii T., 1989. Accumulation of heavy metals in cell walls of Polygonum cuspidatum roots from metalliferous habitats // Plant and cell Physiol. Vol. 30, №4. P. 595-598.
13. Ruano A. Barcelo J., Poschenrieder Ch., 1987. Zinc toxicity induced variation of mineral element composition in hdroponically growth buch bean plants // J. Plant Nutz. Vol. 10, №4. P. 373-384.
14. Wong P.K., 1988. Mutagenicity of heavy metals // Bull. Environ. Contam. And Toxicol. Vol. 40, №4. P. 597-603.