

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. Лялик, 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 Китая, 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 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, который отражает 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 почве 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 относят 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, и используемые нами модели являются стандартными в мировой практике генетических исследований.

Бактериальные модели позволяют определять такие качества объектов окружающей природной среды: воды, донных отложений, почвы, 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. typhimurium* TA 100 токсическое действие определяется на популяционном уровне, а индукцию мутаций – на клеточном.

**Характеристика тест-объекта.** Используемый для биотестирования мутантный штамм *Salmonella typhimurium* TA 100 дефектен по системе синтеза гистидина и биотина, и, вследствие этого, не способен самостоятельно размножиться вне лабораторных условий. Мутации

gal bio uvv 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 pKM 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 мутагенность положено использование тест-объекта в стандартно 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 SAC - his-ревертанта [7,8].

Показателем токсического действия было статистически достоверное уменьшение количества жизнеспособных клеток *Salmonella thuyphimurium* 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 до 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 thuyphimurium* 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 thuyphimurium* 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-

#### Мутагенный потенциал Придунайских озер

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  
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 при 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 выделенные 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

Мутагенный потенциал Придунайских озер

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      |
| 2*        | Контроль   | 1,0                | 1,0   | 1,0   | 1,0      |
|           | 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 не прямой 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

Мутагенная активность донных отложений Придунайских озер по результатам наблюдений 2001 года

| № станции   | Время года | Придунайские озера |       |       |          |
|-------------|------------|--------------------|-------|-------|----------|
|             |            | Кагул              | Китай | Ялпуг | Котлябух |
| 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 озер  
2\* — станция отбора проб расположена в низовьях озера.

Таблица

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

| Весна 2001 г | Гидрохимические показатели |              |                   |                   |                   |                  |
|--------------|----------------------------|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
|              | фосфаты                    | общий фосфор | N-NH <sub>4</sub> | N-NO <sub>3</sub> | N-NO <sub>2</sub> | ВПК <sub>5</sub> |
| 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 <sub>4</sub> | N-NO <sub>3</sub> | N-NO <sub>2</sub> | ВПК <sub>5</sub> |
| 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. Горюп 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. Деняга, 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.: Гидрометеоиздат, 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. Иваннича, 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. Комплексный микробиологичний контроль вод полігону «Балай» // Вісник Одеського національного університету. — 2001. — Т. 6, випуск 1. — С. 111-116.