

БИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ПОЛЛЮТАНТОВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ

В.М. Юрин, А.П. Кудряшов, И.И. Смолич, Т.И. Дитченко,
Е.Н. Крытынская, О.Г. Яковец

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

В настоящее время для решения задачи контроля качества окружающей среды разработаны многочисленные методы аналитического определения содержания поллютантов. Однако, как уже неоднократно отмечалось, физико-химический анализ содержания биологически активных веществ в среде не позволяет провести адекватную оценку характера их биологического действия [1].

Принципиальные основы биологического анализа заключаются в следующем. Все живые организмы для своей жизнедеятельности, роста и размножения требуют среду строго определенного химического состава. Если исключить из этого состава определенный компонент или ввести его дополнительно, то организм через определенное время подаст соответствующий сигнал о качественном изменении в составе среды. Установление связи интенсивности ответного сигнала организма, используемого в качестве тест-объекта, с количеством введенного (исключенного) в среду компонента служит основой для разработки метода количественного определения исследуемого вещества.

Ответный сигнал организма (тест-объекта) на изменение химического состава среды может быть весьма разнообразным. Например, изменение характера поведения, интенсивности роста, состава крови, биоэлектрической активности, нарушение функций кроветворной системы, пищеварения, дыхания и т.д. Обобщенным показателем эффективности действия исследуемого вещества является либо выживаемость тест-объекта, либо его гибель.

Взаимодействие тест-организма с поллютантом очень сложное и зависит от уровня его организации. Попадая в организм, химическое вещество проникает в определенные ткани; в тканях взаимодействует с определенными клетками; в клетках – с определенными субклеточными структурами, а в пределах этих структур взаимодействует с биополимерами или низкомолекулярными соединениями клетки. В обратном порядке развивается реакция целостного организма – от молекулы-мишени до организма. Результаты воздействия поллютанта зависят в первую очередь от химической структуры самого вещества, его физико-химических свойств, которые определяют тропность вещества к определенным тканям, клеткам и характер взаимодействия с молекулярными мишенями, а также зависят от структуры мишени и его функциональной роли [2].

Выбор метода регистрации ответного сигнала (тест-реакции) на заключительной стадии анализа зависит от характера и глубины действия как вещества на организм, так и организма на вещество. И это, в свою очередь, характеризует чувствительность и избирательность биологического метода анализа. Величина регистрируемой ответного параметра (тест-параметр) отражает количественные характеристики наступивших сдвигов в компонентном составе среды.

Рассмотрим возможности использования приемов биологического анализа, связанные с тестированием отдельных химических соединений, на примере развиваемого нами электроальгологического метода.

Методы исследования

В качестве объектов исследования служили интернодальные клетки пресноводной харовой водоросли *Nitella flexilis*. Используемая в настоящей работе культура водоросли выращивалась в лабораторных условиях в среде следующего состава (М): 10^{-4} KH_2PO_4 , $4 \cdot 10^{-3}$

CaCl_2 , 10^{-3} NaHCO_3 , $10^{-4} \text{ Mg(NO}_3)_2$, рН 7,2. Обеспечивался постоянный цикл освещения – 12 часов свет/12 часов темнота.

Базовым раствором в экспериментах с *Nitella flexilis* служил раствор искусственной прудовой воды (ИПВ) состава (М): 10^{-4} KCl , 10^{-3} NaCl , 10^{-4} CaCl_2 , значения рН которого поддерживалось с помощью буферной системы Трис-НСI на уровне $7,0 \pm 0,1$.

При изучении действия различных химических соединений важное значение имеет прижизненный контроль наблюдаемых эффектов. В настоящей работе это достигается использованием внеклеточного и внутриклеточного отведения биоэлектрической активности клетки [3, 4]. Измерялись величины независимых параметров – потенциал покоя (Ψ) и сопротивление (\mathcal{R}), а также потенциал действия (ПД) в контрольном растворе и анализируемой пробе. Для регистрации ПД использовался созданный генератор деполяризующих импульсов тока.

Для оценки достоверности результатов использовались стандартные методы вариационной статистики [5].

Результаты и обсуждение

Эффект химических соединений, как отмечалось выше, проявляется через нарушение нормального течения различных жизненных отправлений живых организмов, используемых в качестве тест-объектов.

Клеточные мембраны весьма чувствительны ко многим химическим соединениям; другие вещества, не влияя непосредственно на мембранные структуры, вызывают их разрушение косвенным путем – через нарушение биохимических процессов клетки, ответственных за поддержание нормального функционирования мембран. Таким образом, присутствие в окружающей среде подавляющего большинства чужеродных соединений вызывает нарушение структуры мембран, с чем связано резкое изменение их проницаемости для ионов, в результате чего происходит изменение электрических параметров клетки. На этом эффекте основан метод электроальгологического тестирования биологической полноценности природных сред, использующий в качестве тест-объекта клетки харовых водорослей.

Некоторое представление об индикаторных возможностях электроальгологического тестирования дают полученные нами результаты, касающиеся тяжелых металлов (таблица 1). Видно, что среди исследуемых тяжелых металлов наиболее сильным негативным эффектом обладают ионы меди.

Таблица 1 – Пороговые концентрации ионов тяжелых металлов (М), вызывающие достоверные сдвиги биоэлектрической реакции клеток *Nitella flexilis*

Ионы тяжелых металлов	ИПВ		ИПВ – CaCl_2	
	Ψ	\mathcal{R}	Ψ	\mathcal{R}
Cu^{2+}	10^{-6}	10^{-5}	$5 \cdot 10^{-7}$	10^{-6}
Pb^{2+}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-5}	10^{-4}
Zn^{2+}	10^{-4}	10^{-4}	$5 \cdot 10^{-5}$	10^{-5}
Cd^{2+}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-4}	10^{-6}
Ni^{2+}	10^{-5}	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-5}$	10^{-5}

Согласно результатам, представленным в таблице 1, ионы кальция во многом определяют чувствительность электрофизиологической реакции водорослей на наличие тяжелого металла. Так, введение 10^{-4} M сульфата никеля в ИПВ деполяризовало плазмалемму и практически не сказывалось на величине сопротивления плазмалеммы (таблица 2). Увеличение содержания Ni^{2+} до $3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ приводило к заметно большему сдвигу потенциала покоя и увеличению сопротивления мембраны. Дальнейший рост концентрации ионов никеля в среде индуцировал значительную деполяризацию мембраны и слабо сказывался на величине сопротивления плазмалеммы в состоянии покоя.

Таблица 2 – Влияние ионов никеля на потенциал покоя и сопротивление плазмалеммы клеток *Nitella flexilis* в ИПВ

Параметр	Концентрация сульфата никеля, М			
	0	10^{-4}	$3 \cdot 10^{-4}$	10^{-3}
Ψ, мВ	143±2	140±2	139±3	123±3
R, кОм·см ²	39,5±5,7	40,4±4,8	58,9±6,7	39,5±5,7

Удаление обменного кальция из клеточной стенки междоузлий водоросли заметно модифицировало характер воздействия ионов никеля на электрофизиологические характеристики плазмалеммы. В этом случае уже низкие концентрации сульфата никеля сильно влияли на величину электрофизиологических параметров, характеризующих плазматическую мембрану в состоянии покоя (таблица 3).

Таблица 3 – Влияние ионов никеля на потенциал покоя и сопротивление плазмалеммы клеток *Nitella flexilis* в ИПВ–Са.

Параметр	Концентрация сульфата никеля, М			
	0	10^{-4}	$3 \cdot 10^{-4}$	10^{-3}
Ψ, мВ	129±3	131±2	120±3	113±2
R, кОм·см ²	19,5±3,7	34,5±5,6	53,8±4,6	24,5±4,6

Повышение чувствительности мембраны в отсутствие ионов Ca^{2+} в среде (ИПВ – CaCl_2) связано с ролью последнего в стабилизации плазматической мембраны исследуемых клеток. Уже в работах 70-х годов прошлого столетия наряду с влиянием кальция на поступление других ионов отмечалась его роль в регуляции селективных, электрических и других свойств мембраны [3]. В этой связи становятся очевидными полученные закономерности, обусловленные его присутствием в окружающей клетку среде.

Поскольку одним из вероятных кандидатов на восприятие экзогенных стрессоров являются ионные каналы и помпы, образованные интегральными белками, которые рецептируют и передают сигнал внутрь клетки, то возможна дальнейшая детализация и классификация наблюдаемых эффектов. Например, в присутствии ионов никеля отмечается резкое изменение формы ПД. Причем, и в этом случае на развитие электрофизиологического ответа плазматической мембраны клеток междоузлий *Nitella flexilis* оказывает существенное влияние наличие или отсутствие в клеточных стенках обменного кальция. Отмечаемое воздействие ионов Ni^{2+} на генерацию ПД, по-видимому, не связано с его поступлением в клетку. На это же указывает и возможность быстрого восстановления характеристик потенциала действия после «отмыва», т.е. удаления его из среды при кратковременной обработке клеток междоузлий раствором комплексона (10^{-4} М ЭДТА). Наиболее значительные изменения параметров ПД достигались в том случае, когда предварительно с поверхности клетки удалялись ионы Ca^{2+} раствором ЭДТА, затем в среду вносились ионы Ni^{2+} . В этом случае клетки междоузлий не теряли способности к возбуждению, однако отмечалось значительное увеличение (в 2–5 раз) длительности ПД.

Воздействие ионов никеля на форму ПД регистрировали и в присутствии ионов Ca^{2+} в среде, однако эти эффекты были не столь значительными, а иногда и не отмечались заметные изменения длительности возбужденного состояния мембраны. Вероятнее всего, эффект ионов никеля на процессы возбуждения плазмалеммы клеток *Nitella flexilis* связан с особенностями замещения ими кальция. Ионы кальция имеют исключительно важное значение для процессов жизнедеятельности клетки, в том числе и для генерации ПД. С другой стороны некоторые физико-химические свойства ионов никеля (например, величина и знак заряда) позволяют им связаться с сайтами ионов кальция. Однако с химической точки зрения такое замещение не может быть полноценным: кальций – щелочноземельный металл, а никель – металл группы железа.

Следует отметить, что расширить возможности качественных оценок степени воздействия химических соединений на биологический тест-объект возможно при определении не одного параметра его реакции на поллютант, а нескольких независимых друг от друга. Расширение количества регистрируемых параметров позволяет значительно дифференцировать биологическую реакцию, характер которой определяется присутствующими в среде поллютантами.

Помимо тяжелых металлов особую опасность в загрязнении окружающей среды представляют пестициды, попадающие после обработки культурных растений в почву и водную среду. В этой связи нами были проведены эксперименты по их действию на плазматическую мембрану растительных клеток.

Среди пестицидов были выбраны сим-триазиновые гербициды, триазоловые фунгициды и пиретроидные инсектициды. В результате проведенных экспериментов [5] были установлены пороговые концентрации испытанных пестицидов, т.е. концентрации, вызывающие достоверные сдвиги биоэлектрических параметров мембраны. Для всех испытанных сим-триазиновых гербицидов и триазоловых фунгицидов минимальные действующие концентрации составляют 10^{-6} – $3 \cdot 10^{-5}$ М. Пиретроидные инсектициды оказывали действие в более низких концентрациях – 10^{-7} М (рисунок 1).

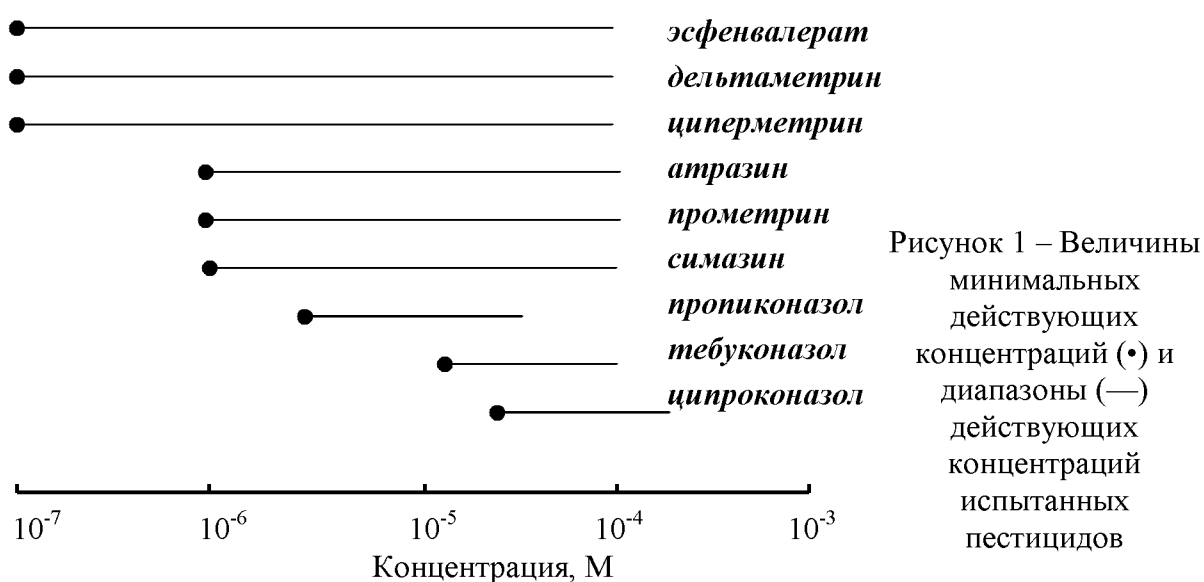


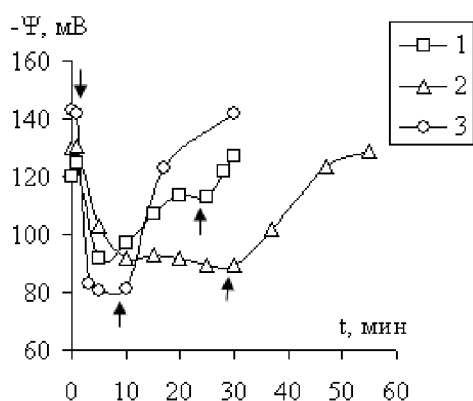
Рисунок 1 – Величины минимальных действующих концентраций (•) и диапазоны (—) действующих концентраций испытанных пестицидов

Сразу следует отметить, что выбранные для тестирования биологических эффектов минимальные концентрации не превышали, а в ряде случаев, были ниже, чем применяемые в полевых условиях.

Отмеченная быстрая скорость развития биоэлектрической реакции (10–20 мин) растительной клетки на действие испытанных гербицидов, фунгицидов и инсектицидов свидетельствует об их непосредственном влиянии с наружной стороны плазмалеммы [6]. Как пример приводим развитие биоэлектрической реакции плазматической мембраны клетки *Nitella flexilis* на действие инсектицидов (рисунок 2).

Анализ биоэлектрической реакции мембраны показал, что триазоловые фунгициды, сим-триазиновые гербициды и пиретроидные инсектициды характеризуются различной степенью мембранотропной активности, располагаясь по мере ее убывания в соответствующие ряды: пропиконазол>тебуконазол>ципроконазол; атразин>симазин>прометрин и эсфенвалерат>дельтаметрин>циперметрин [6].

Одним из вероятных кандидатов на восприятие экзогенных стрессоров являются ионные каналы и помпы, образованные интегральными белками, которые рецептируют и передают сигнал внутрь клетки. Обстоятельно эти подходы описаны в нашей монографии [7].



Стрелками указаны моменты введения (↓) и удаления (↑) инсектицидов: 1 – циперметрин, 2 – дельтаметрин, 3 – эсфенвалерат

Рисунок 2 – Кинетика изменений разности электрических потенциалов плазматической мембраны клеток *Nitella flexilis* в ответ на действие пиретроидных инсектицидов в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М

В заключение отметим, что развиваемые нами методические схемы могут быть применены для экспрессного эффективного контроля загрязнения водной среды и почв [2]. Действительно, биологический метод анализа находит все более широкое применение. За последние годы многие страны (Япония, США, Англия, Германия, Польша и др.) пересмотрели свои правила и организацию ресурсами, введя в систему контроля методы биотестирования, причем ряд из них стандартизирован [2].

Следует также подчеркнуть, основные выигрышные стороны развиваемого нами электроальгологического подхода: экспрессность (для развития реакции на действие эффектора необходимо 10–30 минут); высокая чувствительность; получение информации в виде электрического сигнала позволяет автоматизировать сбор и обработку полученных данных; достаточная разнообразность биоэлектрической реакции клетки позволяет в отдельных случаях сделать даже суждения о характере загрязнителя.

Список литературы

1. Крайнюкова, А.Н. Биотестирование в охране вод от загрязнения / А.Н. Крайнюкова // Методы биотестирования вод: сб. // Ин-т хим. физ. АН СССР. – Черногоровка, 1988. – С. 4–14.
2. Юрин, В.М. Основы ксенобиологии: учеб. пособие / В.М. Юрин. – Минск: БГУ, 2001. – 234 с.
3. Юрин, В.М. Регуляция ионного транспорта через мембрану растительной клетки / В.М. Юрин, А.И. Соколик, А.П. Кудряшов. – Минск: Наука и техника, 1991. – 271 с.
4. Юрин, В.М. Электрофизиологический анализ основных закономерностей взаимодействия органических соединений с мембранами растительных клеток: дис. ... д-ра. биол. наук: 03.00.02. – Минск, 1980. – 420 л.
5. Рокицкий, Т.Ф. Биологическая статистика / Т.Ф.Рокицкий. – Минск: Высшая школа, 1978. – 320 с.
6. Физиологические аспекты первичного избирательного действия пестицидов на растения / В.М. Юрин [и др.] // Вестн. Белорус. гос. ун-та. Сер. 2, Химия. Биология. География. – 2009. – № 1. – С. 40–47.
7. Пестициды и растение: влияние на ион-транспортные системы плазматической мембраны: монография / В.М. Юрин [и др.]. – Минск: Изд. центр БГУ, 2011. – 260 с.

BIOLOGICAL ANALYSIS OF THE POLLUTANTS CONTENT IN THE ENVIRONMENT

V.M. Yurin, A.P. Kudryashov, I.I. Smolich, T.I. Ditchenko,
H.N. Krytynskaya, O.G. Yakovets
Belarusian State University, Minsk, Belarus

On the example of testing of heavy metals and pesticides demonstrated ability to use electroalgal method of monitoring the integrated assessment of water and soil pollution.