

ный характер. Константа ингибирования пероксидазного окисления ТМБ силимарином K_i составляет $0,45 \times 10^{-6}$ М.

Таким образом, нами было показано, что процесс пероксидазного окисления флаволигнанов может протекать как в отсутствии восстановителя (НАДН или НАДФН), так и в присутствии. Причем, следует отметить, что в присутствии НАДН происходит уменьшение константы Михаэлиса почти в 3 раза, а при добавлении НАДФН – увеличение в 1,3 раза. Это свидетельствует о том, что, по-видимому, НАДН в данных условиях выступает ингибитором процесса пероксидазного окисления флаволигнанов, а НАДФН наоборот ускоряет этот процесс. Это утверждение подтверждается величинами каталитических констант: количество каталитических актов в активном центре фермента уменьшается в присутствии НАДН в 1,4 раза, а в присутствии НАДФН – увеличивается в 1,17 раза. При совместном окислении с ТМБД, силимарин, являясь медленно окисляемым субстратом, подвергается активации [1] и эффективно ингибирует пероксидазное окисление аминобифенила.

Литература

1. Рогожин В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов // СПб.: ГИОРД. – 2004. – 240 с.
2. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. Пер. с англ. // М.: Мир. – 1990. – С. 183–203.
3. Курченко В.П., Гавриленко Н.В. и др. Роль пероксидазного окисления в метаболической активации канцерогенных аминобифенилов // Ксенобиотики и живые системы. – 2000. – С.39–40.

ЭЛЕКТРОАЛЬГОЛОГИЧЕСКАЯ ОПЕРАТИВНАЯ ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ВОДНОЙ СРЕДЫ

В.М. Юрин, А.П. Кудряшов, А.И. Соколик, И.И. Смолич, Д.А. Ониани*

*Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь
kudrant@mail.ru*

**Тбилисский государственный университет, г. Тбилиси, Грузия
joniani2002@yahoo.com*

Ежегодно в мире синтезируется десятки тысяч новых химических соединений. К этому следует добавить трудно поддающиеся учету, но наверняка очень многочисленные новые побочные продукты органического синтеза, пищевой промышленности и т.д. Многие из этих веществ являются ксенобиотиками.

Очевидно, что выполнение химического анализа, который обеспечил бы оперативную информацию о концентрациях в испытываемом образце всех соединений, перечисленных в таблицах предельно-допустимых концентраций (ПДК) совершенно немыслимо. Можно не сомневаться в том, что и при наличии данных о концентрации всех без исключения загрязнителей (и соответствующих величин ПДК) удалось бы правильно оценить степень опасности загрязнения. Действие некоторой совокупности различных токсикантов, как правило, не является суммой эффектов составляющих соединений, чаще всего сочетанное влияние проявляется (в форме некоторого негативного эффекта) в концентрациях меньших, чем ПДК – нередко, на многие порядки. Поэтому нередки, например, ситуации, когда контролируемые показатели остаются в пределах ПДК, а в водоеме наблюдается массовая гибель рыбы.

В этой связи любая оценка влияния химических соединений на окружающую среду должна включать биологические параметры.

Различают три основных подхода к применению биологических объектов в системе контроля состояния среды:

- использование организмов, входящих в данный биогеоценоз, за состоянием которых ведется слежение (эндогенные биоиндикаторы);
- использование организмов искусственно вводимых в данный биогеоценоз (экзогенные биоиндикаторы);
- использование объектов, не имеющих отношения к данному биогеоценозу, выращиваемому в лабораторных условиях или взятых из чистых мест обитания, и применяемых в качестве чувствительного элемента датчика, контролирующего состояние среды при введении их в прибор (биотесты или биодатчики).

В системе мониторинга среды для оценки происходящих изменений часто применяют способы визуального контроля состояния биоиндикаторов. Но даже первоначально обнаруженные визуальные изменения каких-то показателей биоиндикаторов могут характеризовать достаточно глубокие нарушения в состоянии биогеоценоза, эффективное предотвращение которых оказывается невозможным.

В этом случае более целесообразным является использование живых организмов разного уровня организации (биотест), выращенных искусственных условиях или взятых из «чистых» природных источников. Оценка проводится по регистрации физиологических ответов (тест-реакция) на действие проб окружающей среды целого организма или его отдельных структурных элементов. Тест-реакция определяется количественной характеристикой, называемой тест-параметром.

Выбирая способ биотестирования для системы контроля загрязнения водной среды и руководствовались следующими требованиями к тест-объекту: чувствительность к широкому кругу поллютантов, особенно токсичным для человека, быстрота развития тест-реакции и надежность ее регистрации, доступность и простота подготовки тест-объекта, отсутствие нарушений основных физиологических отпавлений и стандартизация тест-объекта, точность системы и отсутствие воздействия посторонних факторов внешней среды, возможность автоматизации сбора и обработки информации и минимальная квалификация обслуживающего персонала.

Как оказалось, плазматическая мембрана клетки, весьма чувствительно реагирует на присутствие тех или иных ксенобиотиков, модифицирующих ее структуру, состав, и нарушающих метаболизм клетки в целом.

Именно поэтому данные о сдвигах ионных потоков, проницаемости или производных величин – электрических параметров мембраны – можно использовать для суждения о реакции клеточной мембраны на то или иное воздействие. Таким образом, сдвиги электрических параметров по сравнению с нормой можно использовать для обнаружения в среде химических соединений. С другой стороны, для контроля загрязнения водной среды достаточно чувствительными к различным химическим агентам являются водоросли.

В развиваемом нами методе электроальгологического тестирования в качестве тест-объекта используются клетки харовых водорослей, в частности клетки *Nitella*. Благодаря значительным размерам (длина 5–6 см, диаметр 0,3–0,5 мм), изолированности от остальных клеток, четкой дифференцировке основных клеточных компартментов клетки нителлы являются удобным объектом для электрофизиологических измерений.

Клетки легко выращиваются в лабораторных условиях вегетативным путем в стеклянных аквариумах в довольно простых питательных растворах. С целью стандартизации материала накануне проведения испытаний вторая или третья от верхушки интернодальные клетки препарируются; с одной из сторон оставляется фрагмент соседней клетки длиной 1 мм. Клетки помещаются в чашку Петри с искусственной прудовой водой (ИПВ) состава 10^{-4} моль/л KCl , 10^{-3} моль/л $NaCl$ и 10^{-4} моль/л $CaCl_2$ и содержатся при указанных выше значениях температуры и освещенности в течение суток.

В качестве тест-параметра используется биоэлектрическая реакция клетки. Экспериментальная процедура регистрации осуществляется с помощью разработанного нами метода внеклеточного отведения, который позволяет проводить измерения двух независимых параметров: разности электрических потенциалов (РЭП) между клеткой и наружной средой и сопротивления.

При проведении биологического анализа измерение электрических параметров клеток харовых водорослей проводится в непрерывном режиме.

Схема биотестирования выглядит следующим образом:

ИПВ → ИПВ + образец, разбавление 10^n → ИВП → ИВП + образец, разбавление 10^{n-1} → и т. д. или ИВП → ИВП + образец, разбавление 10^n → ИВП + образец, разбавление 10^{n-1} → и т. д., где n – кратность разбавления.

Длительность каждого этапа определяется выходом регистрируемых величин на стационарный уровень и обычно составляет 20–30 мин; полная длительность цикла – 0,5–4 часов в зависимости от количества необходимых разбавлений. Отметим, что при тестировании сточных вод длительность цикла более продолжительна по сравнению с природными водами.

Предложенная схема позволяет определять не только пороговые и обратимые разбавления проб жидкости по регистрируемым параметрам, но и выявлять особенности качественного состава смеси поллютантов, содержащихся в пробе, предотвращая преждевременную гибель тест-объекта.

Представление о возможности электроальгологического тестирования процедуре оценки токсичности отдельных веществ дает сравнение достоверных пороговых сдвигов регистрируемых параметров РЭП (Ψ) и/или сопротивления (\mathfrak{R}) с существующими государственными нормативами – предельно допустимыми концентрациями (ПДК).

В результате проведенного сравнения было, что случаи чувствительности используемого тест-объекта большей или меньшей ПДК встречаются примерно с равной частотой. Присутствие в среде таких соединений, как неионогенное ПАВ хлористый аммоний, о-крезол может быть обнаружен при концентрациях на порядки меньших, чем ПДК; с другой стороны, фенол не оказывает заметного влияния на биоэлектрические параметры клетки в концентрации на два порядка выше ПДК.

Результаты биологического тестирования образцов технологических вод химического предприятия позволило выявить наиболее загрязненные стоки. В таблице 1 указаны кратность разбавления проб воды отдельных цехов и общего стока, вызывающих достоверный электрический ответ биодатчика.

Таблица 1

**Пороговые разбавления проб,
вызывающие достоверные сдвиги биоэлектрической реакции**

Наименование технологических вод	Ψ , мВ	\mathfrak{R} , кОм·см ²
Цех № 1	10^7	10^7
Цех № 2	10^5	10^5
Цех № 3	10^4	10^3
Цех № 4	10^5	10^5
Общий сток	10^6	10^6

На основании полученных результатов можно заключить, что наиболее загрязненными являются технологические воды цеха № 3, после которых идут воды цехов № 2 и № 4.

Далее было проведено тестирование токсичности стоков вод отдельных цехов, общего стока и биопруда (после общей очистки) одного из микробиологических предприятий. По данным сдвига биоэлектрической реакции клеток установлены цеха, вносящие в общий сток

основную массу загрязнителей. Стоки одного из цехов вызывают весьма специфическую биоэлектрическую реакцию клетки – появление ритмических колебаний; переход в этот режим наблюдается при разбавлении стоков в 10^3 раз, и при разбавлении стоков 10^2 – 10^1 раз наблюдается возникновение волны потенциала действия (ПД).

Представление полученных результатов сдвигов РЭП и сопротивления клеточной мембраны на диаграмме ($\Delta\Psi$, $\Delta\mathcal{R}$) показывает, что сточные воды второго цеха и общего стока попарно перекрываются, что, вероятно, связано с преобладанием в общем стоке токсических агентов второго цеха. Данные химического анализа по некоторым элементам подтверждают этот вывод (табл. 2).

Таблица 2

Содержание некоторых агентов в образцах вод

Элемент, мг/л	Место взятия пробы		
	Цех №2	Общий сток	Биопруд
Железо	0,8	0,9	0,5
Цинк	0,9	1,0	0,4
Марганец	0,1	0,1	отсут.

Образцы вод биопруда в штатной ситуации не вызывают достоверных сдвигов регистрируемых параметров клеток, что свидетельствует об эффективной очистке сбрасываемых в водосток вод (см. табл. 2); следует также отметить, что содержание определяемых тяжелых металлов в воде после очистки (биопруд) не превышают значений ПДК.

Количественный и компонентный состав технологических стоков определяют, в конечном итоге, токсичность последних. Характер и степень токсичности и опасности сточных вод предприятия должна определяться качеством очистки и остаточным количеством веществ на стадии сброса очищенных стоков в водоем.

В этой связи изучались характеристики образцов вод усреднителя и биопруда микробиологического предприятия (табл. 3).

Таблица 3

Количественная характеристика основных показателей образцов вод усреднителя и биопруда

Наименование показателей	Ед. изм.	Усреднитель	Биопруд
БПК	мг О/л	663	15
ХПК	мг О/л	873	79
Эфирорастворимые вещества	мг/л	206	9,3
Взвешенные вещества	мг/л	467	16,3
Плотный остаток	мг/л	2062	1074
Прокаленный остаток	мг/л	915	577
Железо	мг/л	6,28	0,50
Цинк	мг/л	0,56	0,24

Как уже ранее отмечалось, следует учитывать синергизм сочетанного действия ряда факторов; в этой связи только по показателям биологического датчика возможно более корректная оценка биологической безопасности тестируемых проб среды.

Одной из наиболее важных токсикологических характеристик ксенобиотиков является класс их токсичности. Учитывая величину сдвигов параметров биоэлектрического ответа тест-объекта на действие токсикантов, предлагается следующая количественная оценка токсического действия химических соединений и проб жидкости в рамках существующих градаций (табл. 4).

**Классификация химических соединений и проб жидкости
по степени токсичности (в % от контроля)**

Параметр	Концентрация, М	Классы токсичности			
		чрезвычайно токсичные	высоко токсичные	умеренно токсичные	мало токсичные
$\Delta\psi$, мВ	10^{-6}	>90	60–90	30–59	<30
$\Delta\mathcal{E}$, кОм·см ²	10^{-6}	>90	60–90	30–59	<30

Полученные нами экспериментальные результаты показали, что экспрессную эффективную оценку токсических эффектов можно осуществить по биоэлектрическому ответу клеток харовых водорослей.

В заключение следует отметить, что без применения методов биологического тестирования невозможно дать оценку токсического действия однокомпонентного и сочетанного действия химических соединений и оценить степень их биобезопасности.

ИЗМЕНЕНИЯ СЕЛЕКТИВНОСТИ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ K⁺-КАНАЛОВ ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ДЕЛЬТАМЕТРИНА

В.М. Юрин, А.И. Соколик, Е.Н. Крытынская, О.Г. Яковец

Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь

krylena@inbox.ru

Широко представленные на рынке синтетические пиретроидные препараты обладают высокой инсектицидной активностью с широким спектром действия. Потенциальная ценность фотоустойчивых пиретроидов для защиты растений стимулировала большой объем работы по исследованию их механизма действия, путей деградации, а также токсического эффекта в различных биологических системах на разных уровнях организации (клеточном, тканевом, организменном). Вопросы относительно фитотоксического влияния инсектицидов до сих пор мало изучены: не выявлены механизмы, лежащие в основе наблюдаемой разной цитотоксичности в зависимости от вида растения, до конца не установлены закономерности мембранотропных эффектов у защищаемых растений, тогда как плазматическая мембрана является первым барьером на пути поступления данных ксенобиотиков.

Ранее проведенные нами исследования установили модифицирующее действие препаратов на проницаемость плазматической мембраны растительной клетки к катионам (K⁺, Na⁺) [1] и функциональную активность потенциал-зависимых K⁺-каналов [2]. В настоящей работе поставлена задача установить закономерности модифицирующего действия дельтаметрина на катионную избирательность внутрь- (Г) и наружу- (Д) выпрямляющих типов K⁺-каналов плазматической мембраны растительных клеток.

В работе использовали коммерческий препарат пиретроидного инсектицида Децис, 12 % (действующее вещество – дельтаметрин или (1R)-цис-3-(2,2-дибромовинил)-2,2-диметилциклопропанкарбоновой кислоты (S)-3-фенокси- α -цианобензиловый эфир) фирмы Bayer в концентрациях 10^{-5} и 5×10^{-5} моль/л (по действующему веществу), при которых мембранотропный эффект данного инсектицида наиболее выражен [3]. Исходные маточные растворы 10^{-2} моль/л, использованные для приготовления экспериментальных сред, получены путем разбавления этиловым спиртом (96 %) коммерческого препарата. Экспериментальные среды готовились с добавлением в контрольные растворы соответствующего количества 1 % спиртового раствора инсектицидов.