

ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДОЕМОВ МИНСКА

A battery of test-systems for estimation of water and air pollution by genotoxic compounds was worked out. Monitoring of Svisloch's river water pollution was conducted in Minsk. All samples, which have been taken in spring, showed the presence of genotoxic compounds. Samples, which have been taken in autumn, contained much less mutagens. The only place, which preserved high level of genotoxic compounds, was near the "Kristal" plant.

Охрана окружающей среды является одной из остерейших проблем. Широкая химизация промышленности и сельского хозяйства, повсеместное использование химических препаратов в быту кроме видимых преимуществ таят в себе огромную опасность, связанную с увеличением мутагенного давления в популяциях растений, животных и человека. Основными объектами загрязнения являются вода, воздух, почва. Особенность загрязнения водоемов заключается в их способности аккумулировать вещества, находящиеся в атмосфере и почве. В исследованиях по генетической токсикологии принято различать поверхностные воды, источники питьевого водоснабжения, а также промышленные, бытовые и сельскохозяйственные стоки [1]. Загрязнения, поступающие в сточные воды, условно можно разделить на несколько групп. Так, по физическому состоянию выделяют нерастворимые, коллоидные и растворимые примеси. Кроме того, загрязнения делятся на минеральные, органические, бактериальные и биологические [1]. Одной из самых обширных и опасных является группа органических загрязнителей воды. Уже сейчас из природных источников выделено более 20 тыс. химических соединений антропогенного происхождения, проявляющих биологическую и мутагенную активность [2]. Вместе с тем, санитарно-эпидемиологическая служба, контролирующая состояние водоемов, не располагает надежными методами оценки суммарных показателей генотоксичности загрязненной воды.

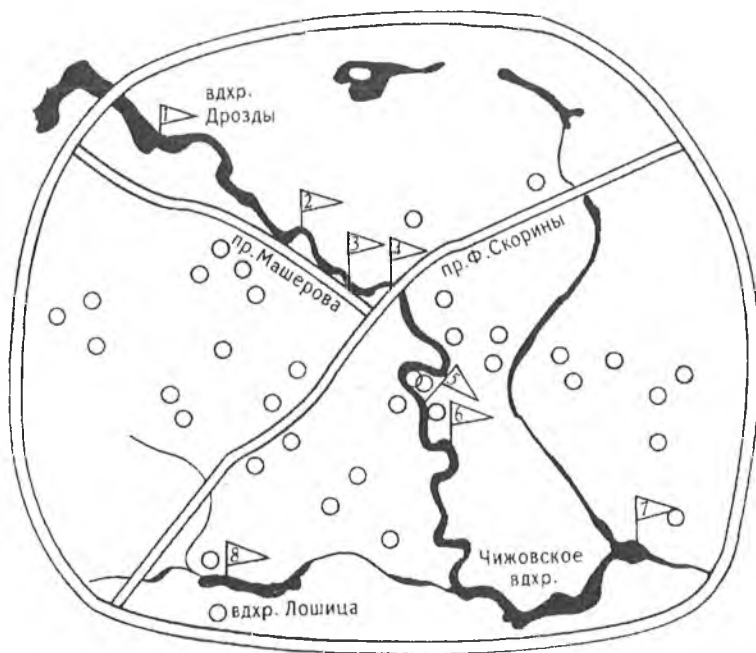


Рис. 1. Карта водоемов Минска с указанием мест взятия проб воды

Цель данной работы состояла в разработке батареи тест-систем, пригодной для оценки загрязнения генотоксичными веществами воздуха и водоемов. Удобной моделью для испытания методов оценки генотоксичности и степени

загрязнения мутагенными веществами открытых водоемов является Минск, в черте которого расположено большое количество промышленных предприятий (рис.1). В связи с этим был проведен эколого-генетический мониторинг загрязнения водоемов Минска в различные сезоны года.

Материал и методика

Пробы воды объемом 1000 мл перед исследованием на наличие генотоксичных веществ концентрировали путем экстракции хлороформом с последующим его упариванием на ротаторном испарителе. Экстракт растворяли в 1 мл диметилсульфоксида (ДМСО), увеличивая концентрацию образца в 1000 раз.

Для пиролиза пластмасс и экстракции образующихся продуктов горения образец сжигался над пламенем спиртовки или без нее. Образующиеся при этом продукты горения барботировались через растворитель под действием пониженного давления. По окончании сжигания растворитель упаривался на ротаторном испарителе и полученный осадок растворялся в 1 мл диметилсульфоксида.

Присутствие прямых и непрямых мутагенных веществ в пробах выявлялось использованием двух методических подходов: по наличию повреждений экспонированной к пробам ДНК, а также по количеству ревертантов в тесте Эймса.

Экстракты проб воды экспонировались к ДНК с системой метаболической активации и без нее. Наличие межнитевых сшивок ДНК и ее денатурация выявлялись после разделения ДНК с помощью электрофореза и визуализации бромистым этидием.

Пробы экспонировались к ДНК фага λ в иммунологическом планшете. Общий объем реакционной смеси составлял 50 мкл. Последовательно приливали цитратно-ацетатный буфер (pH 5,5), фаговую ДНК (7 мг/мл), пероксидазу хрена (3×10^{-6} М), исследуемую пробу. Реакцию запускали добавлением перекиси водорода (0,001 М). Смесь инкубировали на встряхивателе 30 мин при комнатной температуре. Непосредственно перед электрофорезом к смеси добавляли 3 мкл 50%-го глицерина и переносили в лунки 0,9%-го агарозного геля.

Электрофорез проводили по известному методу [3]. После разделения ДНК гели фотографировали в ультрафиолетовом свете, а негативы сканировали для количественной оценки степени денатурации образцов ДНК, вызванной экстрактами проб. В качестве позитивного контроля непрямого генотоксического действия на ДНК был использован известный мутаген бензидин (БД), вызывающий межнитевые сшивки ДНК при пероксидазной метаболической активации.

Тест Эймса ставили по общепринятой методике [4]. В работе использовали штаммы *Salmonella thyphimurium* TA-98 и TA-100.

Микросомальную фракцию получали из печени беспородных крыс-самцов массой 120–200 грамм по общепринятой методике [5]. В качестве индуктора микросомального окисления использовали арохлор. Индуктор вводили внутрибрюшинно в дозе 100 мг/кг массы животных. Индукцию вели 5 сут. Хранили микросомы при -20°C . Перед употреблением микросомы оттаивали и суспендировали в 10 объемах 0,1 М цитратно-ацетатного буфера (pH 5,5).

При проведении эксперимента в стерильные пробирки вносили по 0,1 мл ночной культуры штаммов TA-98 или TA-100, выращенной на среде с ампицилином (0,04 мг/мл), затем добавляли физиологический раствор, раствор пероксидазы хрена (10–6 М) или микросом печени крыс (0,5 мг/мл), исследуемую пробу. Реакцию начинали добавлением перекиси водорода (до концентрации 0,001 М) или НАДФН₂ (до концентрации 0,005 М). Общий объем реакционной смеси составлял 0,5 мл. Смесь инкубировали в течение 30 мин, а затем вносили в охлажденный до 42°C полужидкий агар и высевали на чашки. Подсчет ревертантов и оценку выживаемости бактерий вели через 36 ч.

Белок определяли микробиуретовым методом [6].

Результаты и их обсуждение

В предварительных опытах была определена возможность использования электрофореза для разделения и выявления нативной и модифицированной

мутагенами ДНК. На рис.2 представлены результаты влияния на ДНК различных концентраций БД, подвергнутого метаболической активации пероксидазой хрена (ПХ) в присутствии перекиси водорода. Оксиданты БД вызывают перекрестные сшивки ДНК, которые обладают малой электрофоретической подвижностью и накапливаются на старте. Этот процесс зависит от концентрации БД и достигает максимума при концентрации мутагена 10^{-5} М.

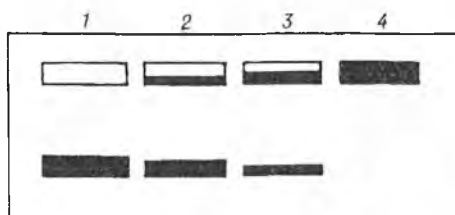


Рис.2. Электрофоретическая подвижность ДНК фага λ , экспонированной к продуктам пероксидазного окисления БД: 0,1 М цитратно-ацетатный буфер, pH 5,5, 30°C; [БД]= 10^{-5} М (дорожка 2); 2×10^{-5} М (дорожка 3); 10^{-6} М (дорожка 4)

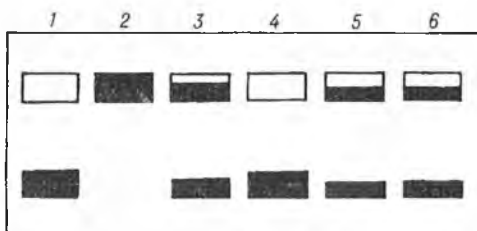


Рис.3. Электрофоретическая подвижность ДНК фага λ , экспонированной к продуктам сжигания пластмасс АВС (дорожки 3,4) и полиамида-6 (дорожки 5,6): дорожки 3,5 – прямое действие проб; 4,6 – после окисления пероксидазой

Исследование эффективности процедуры экстракции показало, что БД в количестве 10^{-5} моль/л воды практически полностью экстрагируется по описанной методике и вызывает повреждения ДНК, аналогичные повреждениям, представленным на рис.2.

Загрязнение водоемов мутагенными веществами происходит во многом за счет продуктов сжигания различных веществ, в том числе и широко используемых полиамидных пластмасс. Нами проведена оценка мутагенности продуктов пиролиза полиамида-6. На рис.3 показана способность экстрактов продуктов сжигания полиамидных пластмасс вызывать повреждения ДНК. Для пробы, полученной сжиганием пластмассы АВС, при прямом экспонировании обнаружено ее повреждающее действие на ДНК, часть которой остается на старте (см. рис.3, дорожка 3), в то время как при использовании системы метаболической активации (см. рис.3, дорожка 4) различий между подвижностью нативной ДНК и ДНК инкубированной с пробой не наблюдается. Пробы, полученные из полиамида-6, воздействуя на ДНК, повреждали ее как с системой метаболической активации, так и без нее (см. рис.3, дорожки 4,5).

Таким образом, продукты горения АВС-пластика содержат соединения, обладающие только прямым генотоксичным действием, в то время как образцы, полученные из полиамида-6 содержат как прямые, так и не прямые мутагенные вещества.

Для исследования генотоксичности воды открытых водоемов нами было выбрано 8 мест в черте Минска (см. рис.1). Пробы брались из проточных и закрытых водоемов. Такой выбор был обусловлен различиями в динамике и интенсивности загрязнения химическими веществами этих водоемов.

Одно из мест забора проб воды находилось на берегу Лошицкого водохранилища (см. рис.1, точка 8). Выбор этого технического водоема обуславливался тем, что в него попадают стоки химчистки, завода "Интеграл". Кроме того, на его берегу расположена ТЭЦ, выбрасывающая в воздух большое количество продуктов сжигания топлива. Они тоже могут попасть в водоем вместе с атмосферными осадками.

Проба была взята в объеме 1 л и сконцентрирована, как указано выше.

Исследование электрофоретической подвижности ДНК фага λ , экспонированной к пробе из Лошицкого водохранилища показало наличие не прямых мутагенов (см. табл.), поскольку после пероксидазного окисления ДНК остается на старте.

Проба 8 была испытана на мутагенную активность в тесте Эймса и вызывала массовую гибель микроорганизмов. При активации пероксидазой и микроСОМами печени количество ревертантов на обоих штаммах возрастало в 4 раза. При прямом действии пробы на штаммы TA-100 и TA-98 достоверного роста ревертантов не наблюдалось.

Таким образом, в исследованной нами пробе воды обнаружены мутагены, регистрируемые по повреждению ДНК и в тесте Эймса.

Действие проб воды р. Свислочь на электрофоретическую подвижность ДНК фага 1 (+ – более 10% сшивок ДНК)

Проба	Апрель		Июль		Сентябрь	
	прямое действие	после окисления пероксидазой	прямое действие	после окисления пероксидазой	прямое действие	после окисления пероксидазой
1	—	+	—	+	—	—
2	—	+	—	+	—	—
3	—	+	—	+	—	—
4	—	+	—	+	—	—
5	—	+	—	+	+	+
6	—	+	—	+	—	—
7	—	+	—	+	—	—

Изучение генотоксичности воды проточных водоемов представляет большие трудности по сравнению с закрытыми. Количество и соотношение мутагенов в проточных водах может колебаться в зависимости от времени года, режима работы предприятий, технические сбросы которых осуществляются в реку. Кроме того мутагены могут попадать в воду выше по течению, изначально создавая повышенный фон.

Учитывая эти особенности, мы не ограничились одним местом забора проб из р. Свислочь. Пробы брались в 7 различных местах (см. рис.1). Они были взяты в апреле, июле и сентябре. Выбор мест забора воды был обусловлен близостью промышленных предприятий. Концентрирование проб объемом 1 л проводилось по указанной методике.

Как видно из табл.1, пробы, полученные в апреле и июле показали наличие не прямых мутагенов, вызывающих образование сшивок ДНК-ДНК. В большинстве проб, полученных в сентябре, подобных повреждений ДНК не наблюдалось. Единственной пробой, показавшей выраженный генотоксический эффект оказалась проба 5, вызывающая образование сшивок ДНК. Как видно из рис.1, 5-я проба была взята в непосредственной близости от дрожжевого завода, завода эндокринных препаратов, Минского ликеро-водочного завода. В тесте Эймса эти пробы воды проявляли мутагенное действие на штамм TA-100 после пероксидазного окисления, вызывая увеличение количества мутантов в 2 раза.

Таким образом, в р. Свислочь содержится высокое количество мутагенных веществ непрямого действия. Максимальное количество мутагенов в реке регистрировалось весной после таяния снега. Летом их количество уменьшалось. Осенью детектируемая мутагенная активность проб практически исчезала. Она была выявлена только в одной пробе в непосредственной близости от большого числа промышленных предприятий.

Выводы:

1. Пробы воды р. Свислочь содержат мутагены.
2. Содержащиеся в пробах воды р. Свислочь генотоксичные вещества являются преимущественно непрямыми мутагенами.
3. Количество мутагенов в р. Свислочь колеблется по сезонам и максимальное весной.
4. Вода Лошицкого водохранилища содержит как прямые, так и не прямые генотоксичные вещества.
5. Продукты пиролиза полиамидных пластмасс содержат генотоксичные соединения прямого и непрямого действия.

1. Дубинин Н. П. // Общая генетика. М., 1986.
2. Порошенко Г. Г., Абилов С. К. // Итоги науки и техники ВИНТИ. Сер.Общая генетика. 1988. Т.12.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., 1984.
4. Ames D.N., Durston W.E., Yamasaky E., Lee E.D. // Proceeding of the National Academy of Sciences. USA. 1973. V.70. N.5. P.2281.
5. Орехович В. Н. // Современные методы в биохимии. М. 1978.
6. Практикум по биохимии: Учеб. пособие / Под ред. С.Е.Северина, Г.А.Соловьевой. М. 1989.