

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОЯДЕРНОГО ТЕСТА ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ВОДОЁМОВ ОРЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Арабаджи А.А., Крюков В.И.

// Проблемы развития АПК Орловской области. Матер. конф. мол. учёных и спец. ф-та биотехнологии и ветеринарной медицины ОрёлГАУ, 11-12 мая 2006 г. –Орёл: Издательство ОрёлГАУ, 2006. – 140 с. (с. 6-10).

Введение. Негативные последствия антропогенного воздействия на биосферу – одна из серьёзных проблем человечества. Сильное влияние антропогенных экологических факторов испытывают на себе водные экосистемы. Даже в экологически относительно благополучных регионах многие поверхностные водоёмы подвергаются интенсивному химическому загрязнению, поскольку очень часто используются для сброса отходов промышленного и сельскохозяйственного производства. Орловская область не является исключением из общей тенденции [Воронков А., 2006]. Химический мониторинг загрязнения водных экосистем недостаточно информативен для биологов, так как при его выполнении анализируют чрезвычайно ограниченное число химических веществ. При этом не учитываются концентрации огромного количества других веществ, попадающих в биосферу и возможность синергидных эффектов совместного действия этих загрязнителей на живые организмы. По этой причине биологические индикаторы, т.е. группы особей одного вида, по наличию или состоянию которых можно судить о естественных и антропогенных изменениях в среде, предоставляют много большую информацию о состоянии экосистем.

Простым и удобным методом диагностики генетических нарушений в соматических клетках является микроядерный тест, который используют для анализа мутагенности различных факторов, а также для контроля экологического состояния экосистем. Метод анализа микроядер успешно использован на рыбах [Гришанин А.К. и др., 1993; Manna G.K., Sadhukhan A., 1986].

В данном сообщении приведены первые результаты биоиндикации состояния водоёмов Орловской области с использованием генетических тест-систем.

Материалы и методы. Объектом исследования были эритроциты плотвы обыкновенной *Rutilus rutilus*. Материал собран в феврале 2006 г. в двух водоёмах, испытывающих разный уровень химической нагрузки: 1) в р. Оке в черте г. Орла (0,5 км ниже по течению от места впадения р. Орлик); 2) в истоке реки Рыбница (Глазуновский район). Из каждой географической точки анализировали по 15 экземпляров.

Частоту микроядер анализировали в эритроцитах периферической крови рыб. Для приготовления препаратов крови у рыб отсекали заднюю треть хвостового плавника. Каплю крови наносили на сухое предметное стекло в виде мазка и высушивали его на воздухе. Сухие препараты окрашивали азур-

езином (1 мл маточного раствора на 10 мл дистиллированной воды) в течение 10 мин. После промывки и высушивания препараты анализировали при увеличении 1350[×]. На окрашенных препаратах анализировали по 1 тыс. эритроцитов от каждого животного, фиксируя при этом число клеток с микроядрами (рис.). Статистическую обработку данных выполняли по В.Ю. Урбах [1975, с. 182-169].

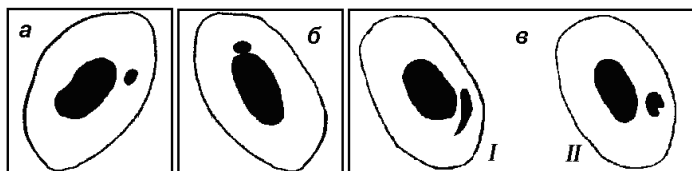


Рис. Микроядра в эритроцитах плотвы: **а** – «стандартного» вида; **б** – прикреплённого вида; **в** – неоформленный ядерный материал в виде палочек (I) и клубков (II);

Результаты и обсуждение. Использование рыб как биоиндикаторов состояния водной среды обусловлено следующими причинами [Кудерский Л.А., 1987]: 1) рыбы обладают длительным жизненным циклом и благодаря этому способны накапливать вредные вещества в течение продолжительного периода времени; 2) разные виды рыб имеют неодинаковую чувствительность к различным антропогенным токсикантам и, поэтому, могут быть использованы как биоиндикаторы различных степеней антропогенного загрязнения водоемов; 3) рыбы обладают неодинаковой чувствительностью на разных этапах онтогенеза, что расширяет возможности использования этих животных для биоиндикации. В токсикологических исследованиях наиболее часто используют радужную форель, карпа, гамбузию. Международная организация стандартизации рекомендовала для этих целей использовать даниорию (*Brachidanio rerio*) [Хамбургер Б., 1985]. Задачи иктиомониторинга изложены в работе [Лукияненко В.И., Черкашин С.А., 1987]. Из них для генетического мониторинга представляют интерес следующие: 1) оценка мутагенности для рыб разных видов и экологических групп различных веществ, поступающих в водоёмы; 2) разработка принципов и методов выявления отдалённых последствий загрязнения водоёмов мутагенами.

Для предварительной оценки возможности использования плотвы обыкновенной *Rutilus rutilus* в качестве модельного объекта для генетического тестирования и биоиндикации были выбраны два водоёма, экологическое состояние которых сильно различается. Объём каждой выборки – 15 особей. На каждом препарате подсчитывали число нормальных эритроцитов, а также число эритроцитов, содержащих микроядра и ядерный материал, не оформленный в четкое микроядро, отнесенное к общему количеству просмотренных клеток. У каждой рыбы анализировали по 1000 эритроцитов. Таким об-

разом, сравнение частот микроядер у рыб изученных водоёмов проводится на основании анализа 15000 эритроцитов в каждой выборке.

В ходе работы были обнаружены эритроциты с микроядрами различных видов и неоформленным ядерного материала, однако в данном сообщении рассматриваются только суммарные частоты аномальных эритроцитов (табл.).

Таблица

Число клеток с микроядрами в эритроцитах периферической крови плотвы, отловленной в водоёмах с различным уровнем антропогенного загрязнения

Река	Изучено особей	Число эритроцитов		Частота клеток с микроядрами, $p \pm t \cdot \sigma_p$, %*
		проанализированных	с микроядрами	
Рыбница (исток)	15	15 000	57	3,8±0,3
Ока (г. Орел)	15	15 000	119	7,9±0,4

* – при $P=0,05$

В периферической крови рыб, отловленных в истоке рыбницы (Глазуновский район) среди 15000 просмотренных клеток было выявлено 57 клеток с микроядрами. Из них 46 клеток содержали микроядра вида *a*, 10 клеток – микроядра вида *b* и 1 клетка имела микроядро вида *в*. У одной особи в эритроцитах микроядра не были обнаружены. В среднем каждое животное на 1500 ядросодержащих клеток имело по 4 клетки с микроядрами. В периферической крови рыб, пойманных в р. Оке в черте г. Орла, при анализе 15000 клеток обнаружено 119 эритроцитов с аномалиями, в том числе 79 клеток с микроядрами вида *a*, 14 клеток – с микроядрами вида *b* и 26 клеток содержали неоформленный ядерный материал (вид *в*).

Расчёт достоверности различий между частотами аномальных эритроцитов выполнен после ϕ -преобразования долей [Урбах В.Ю., 1975, с. 182-169]. Анализ свидетельствует о существовании статистически достоверных различий между частотами аномальных эритроцитов у рыб двух проанализированных выборок (критерий $u=15,4$).

Принимая во внимание обнаруженные доказательства роста частоты генетических нарушений в соматических клетках рыб в р. Оке, можно предположить, что в их генеративных клетках также происходит рост частоты мутаций. Этот процесс может снижать воспроизводительные качества рыбы и уменьшать эффективность мероприятий, направленных на восстановление биологических ресурсов водных экосистем Орловской области.

Таким образом, результаты данного исследования позволяют сделать следующие **выводы**:

1. Плотва обыкновенная *Rutilus rutilus* может быть использована в качестве вида-индикатора для проведения биоиндикационных исследований антропогенного загрязнения водных экосистем Орловской области.

2. На территории Орловской области есть реки, отдельные участки русел которых имеют такой уровень суммарного химического загрязнения воды, который вызывает статистически достоверное увеличение частот генетических нарушений в соматических клетках у рыб.

3. Учитывая недостаточную информативность химического контроля для оценки влияния на биоту суммарного загрязнения экосистем, рекомендуем Комитету природных ресурсов Орловской области инициировать разработку комплексной системы генетического мониторинга, его внедрение и выполнение на территории области. Эта работа может быть выполнена специалистами ОрёлГАУ в тесном сотрудничестве с другими ВУЗами.

Литература

Воронков А. Гляжу в озёра мутные... //«Орловская искра» –2006, –№ 23, –С. 8.

Гришанин А.К., Степанова В.А., Павлов Д.Ф. Изучение мутагенного действия дихлорофоса, кадмия и нафталина на эритроциты тилапий (*Oreochromis mossambicus*, Peters) при помощи метода учета микроядер //Генетика. –1993. –Т. 29, –№ 7. –С. 1213-1217.

Кудерский Л.А. Рыбы как биологические индикаторы состояния водной среды //Методы ихтиологических исследований: Тез. докл. 1-го Всес. симпозиума по методам ихтиотоксикол. исслед. –Л., 1987. –С. 71-73.

Лукьяненко В.И., Черкашин С.А. Ихтиологический мониторинг – важнейший инструмент оценки качества водной среды //Методы ихтиотоксикологических исследований: Тез. докл. 1-го Всес. симпозиума по методам ихтиотоксикол. исслед. –Л., –1987. –С.91-93.

Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. –М.: Медицина, –1975. –295 с.

Хамбургер Б. Подопытные рыбы и критерии их отбора //Методы исследований токсичности на рыбах. –М.: Агропромиздат, –1985. –С 9-11.

Manna G.K., Sadhukhan A. Use of cell of gill and kidney of tilapia fish in micronucleus test //Curr. Sci. (India). –1986. –V.55. –№ 10. –P. 498-501.