

ОЦЕНКА МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ПРИЗЕМНОГО СЛОЯ ВОЗДУХА ПРОМЫШЛЕННЫХ РЕГИОНОВ МЕТОДОМ ИНДУЦИРОВАННОЙ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Омельченко Г.В., Вардуни Т.В., Шиманская Е.И., Бураева Е.А., Прокофьев В.Н., Чохели В.А., Азарин К.В., Вьюхина А.А., Вардуни М.М., Шерстнева И.Я.

Научно-исследовательский институт биологии Южного федерального университета, г. Ростов-на-Дону, Россия

Оценены аккумуляционные способности пилезии многоцветковой по отношению к тяжелым металлам в условиях урбанизированной экосистемы. Проведенные исследования позволили разработать подход к биоиндикации атмосферного воздуха, основанный на учете интенсивности свободнорадикальных процессов методом индуцированной хемилюминесценции в клетках *Pylaisia polyantha*. Результаты биомониторинга урбанизированной экосистемы (г. Ростов-на-Дону) с использованием пилезии многоцветковой позволили выделить зоны максимальной мутагенной опасности атмосферного воздуха. Практическое использование результатов исследования рекомендуется при разработке программ по улучшению качества городской среды г. Ростова-на-Дону, а также при оценке эколого-генетического состояния среды обитания. Предлагаемая система биомониторинга позволяет прогнозировать мутагенную опасность в различных урбанизированных экосистемах со сходным уровнем техногенной нагрузки.

Ключевые слова: биомониторинг, мутагенная опасность, индуцированная хемилюминесценция, свободнорадикальные процессы, *Pylaisia polyantha*.

THE INDUCED CHEMILUMINESCENCE ASSESSMENT OF MUTAGEN ACTIVITY OF THE GROUND AIR LAYER IN INDUSTRIAL REGIONS

Omelchenko G.V., Varduni T.V., Shimanskaya E.I., Prokofev B.N., Chokheli V.A., Azarin K.V., Varduni M.M., Vyukhina A.A., Sherstneva I. Y.

Research institute for Biology, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia

The accumulation capacity of *Pylaisia polyantha* with respect to heavy metals under urban ecosystem conditions has been analyzed. Our study allowed us to develop a new approach for bioindication of atmospheric air, which is based on the measuring of free radical process efficacy by the induced chemiluminescence in the cells of *Pylaisia polyantha*. The results of biomonitoring of the urban ecosystem (Rostov-on-Don) allowed us to identify the most mutagenically dangerous zones in the atmospheric air. It may be recommended to use the results of the study for development of the programs aimed at the improvement of the urban environment in Rostov-on-Don. The obtained data may be also useful for assessment of ecological and genetic conditions of the environment. The proposed biomonitoring system makes it possible to predict mutagenic danger in different urban ecological ecosystems, which are characterized by similar level of anthropogenic pressure.

Keywords: biomonitoring, mutagenic danger, induced chemiluminescence, free radical process, *Pylaisia polyantha*.

Введение

Урбанизированные экосистемы испытывают на себе негативные последствия антропогенной активности, включающие загрязнение окружающей среды токсическими веществами. Проблема разработки технологий биоиндикации урбанизированных экосистем становится все более актуальной, так как постоянное возрастание техногенной нагрузки требует объективной оценки любых изменений в биоте. Эффективность системы биоиндикации определяется возможностью прогнозирования и моделирования экологической опасности в урбанизированных экосистемах. Для биоиндикации мутагенов окружающей среды в настоящее время используют широкий спектр различных растительных

организмов [4; 7; 9]. Эпифитные мхи являются чрезвычайно информативным и удобным тест-объектом [8]. Однако в большинстве случаев при анализе экологического состояния исследуемых территорий с помощью эпифитных мхов исследователи ограничиваются инструментальными методами, предполагающими анализ содержания в пробах мха радионуклидов, тяжелых металлов и т.д. [1]. На наш взгляд, большой интерес представляет анализ показателей, характеризующих последствия мутагенного воздействия на анализируемые тест-объекты, оценивающих комплексный эффект воздействия недифференцированных мутагенных факторов окружающей среды.

Цель исследования. Биоиндикация состояния атмосферного воздуха урбанизированной экосистемы (г. Ростов-на-Дону) с использованием эпифитного мха пилезии многоцветковой (*Pyralisia polyantha*) методом индуцированной хемилюминесценции.

Материалы и методы исследования

Исследования проводилась с 2010 по 2012 г. Были определены зоны биоиндикации в г. Ростове-на-Дону, характеризующиеся экологической специфичностью и разной степенью антропологической нагрузки. Расположение зон для биоиндикации в различных районах г. Ростова-на-Дону показано на рисунке 1.

Автотранспортная зона (2 площадки, 20 точек) – охватывает территории с автомобильным движением различной интенсивности, транспортными развязками.

Промышленная зона (2 площадки, 20 точек) – территории ТЭЦ, ТЭЦ-2, заводов рыбных гранулированных кормов, «Мясомолмаш», ОАО ГПЗ-10.

Зоны, сочетающие промышленную и автотранспортную нагрузки (5 площадок, 50 точек) - территории, характеризующиеся наличием промышленных предприятий (Электровозоремонтный завод, ОАО «Моряк», «Донская кожа» и др.) и автомагистралей с интенсивным потоком автотранспорта.

Парковая зона (точка относительного контроля) (1 площадка, 10 точек) - территория Ботанического сада ЮФУ, характеризующаяся отсутствием промышленных предприятий и интенсивного движения автотранспорта.

Фоновая зона (Каменский район Ростовской области, хутор Богданов), удаленная более чем на 100 км от урбанизированной экосистемы (г. Ростова-на-Дону), со сходными природно-климатическими условиями [8].

В каждой точке были исследованы 10 проб мха.

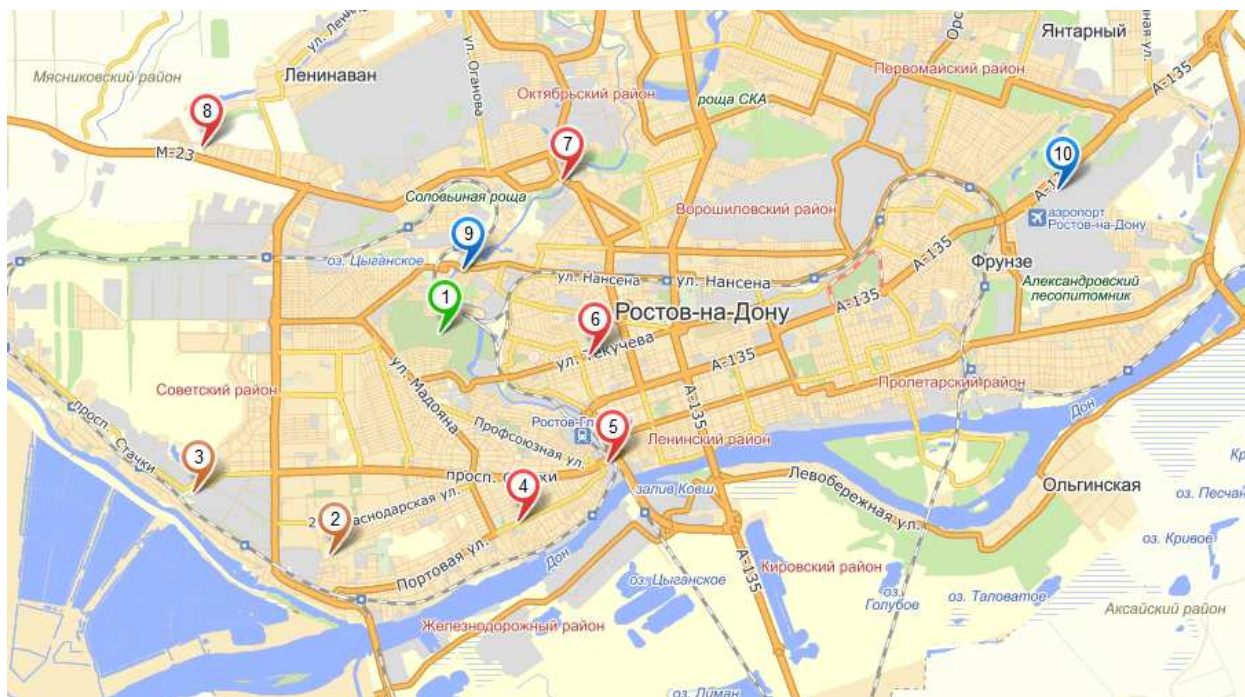


Рис. 1. Карта-схема расположения точек биоиндикации

1 – Ботанический сад; 2 – Советский район (ТЭЦ); 3 – Советский район (ТЭЦ-2); 4 – Железнодорожный район; 5 – Ленинский район (ул. Северса, устье реки Темерник); 6 – Ленинский район (между пр. Буденновским и пер. Доломановским /ул. Текучева/Мечникова); 7 – Октябрьский район (ул. Вавилова, вдоль автомагистрали, вблизи реки Темерник); 8 – Октябрьский район (Таганрогское шоссе); 9 – Октябрьский район (Змиевский проезд, вблизи реки Темерник); 10 – Первомайский район (аэропорт).

Хемилюминесцентный анализ проводили на приборе AutoLumatPlusLB 953 фирмы Verhold Technologies (Германия). Навеску гомогената мха 10 мг растирали в 2 мл трис-НСI буфера. Гомогенат центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут. Реакционную смесь, содержащую 2 мл 5×10^{-4} М раствора люминола в 0,1 М трис-НСI буфере, рН 7,4 и 200 мкл исследуемого образца термостатировали при 25 °С. В кювету с реакционной смесью вносили 450 мкл 0,35 М раствора H_2O_2 . Регистрировали максимальную быструю вспышку (I_{max}). Расчет светосуммы хемилюминесценции проводили с учетом фонового свечения и выражали в относительных единицах (количество импульсов в секунду). Длительность записи ХЛ-кинетики (не менее трёх повторностей) составляла 100 секунд. При оценке кинетограмм использовали такие информативные параметры, как амплитуду ХЛ-реакции (I_{max} , имп./с); время достижения максимума (T_{max} , мин); суммарное количество квантов за время наблюдения, или светосумму (S , млн имп.). По степени достоверного снижения или повышения продукции свободных радикалов оценивали окислительно-восстановительный статус. Статистическую обработку данных проводили по критерию Стьюдента. Корреляционную зависимость показателей биомониторинга оценивали методом ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и их обсуждение

В нашем исследовании с помощью метода хемилюминесценции (ХЛ) в системе H₂O₂-люминол анализировали уровень свободнорадикальных процессов в клетках пилезии многоцветковой, находящихся в консортативных взаимосвязях с маркерными деревьями тополя, произрастающими в различных точках г. Ростова-на-Дону (рис. 1). Результаты исследования интенсивности люминолзависимой хемилюминесценции пилезии многоцветковой (*Pyralisia polyantha*) исследуемых площадок г. Ростова-на-Дону представлены в таблице 1 (рисунок 2).

Таблица 1

Показатели H₂O₂ индуцированной люминолзависимой хемилюминесценции пилезии многоцветковой (*Pyralisia polyantha*) исследуемых площадок г. Ростова-на-Дону

Площадка	Светосумма (Sm) у.ед.	Высота быстрой вспышки (Imax) у.ед.
фоновая	$2,9 \pm 0,06 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$
1 (относительный контроль)	$4,6 \pm 0,1 \times 10^5 * +$	$3,6 \times 10^5$
2	$5,9 \pm 0,1 \times 10^5 * +$	$4,3 \times 10^5$
3	$14,8 \pm 0,1 \times 10^5 *** ++$	$8,7 \times 10^5$
4	$9,4 \pm 0,1 \times 10^5 *** +$	$9,3 \times 10^5$
5	$17,9 \pm 0,21 \times 10^5 **** +++$	$11,0 \times 10^5$
6	$13,2 \pm 0,2 \times 10^5 *** ++$	$12,8 \times 10^5$
7	$7,9 \pm 0,15 \times 10^5 *** ++$	$5,2 \times 10^5$
8	$16,8 \pm 0,2 \times 10^5 *** ++$	$11,3 \times 10^5$
9	$5,2 \pm 0,25 \times 10^5 * +$	$4,5 \times 10^5$
10	$20,0 \pm 0,15 \times 10^5 **** +++$	$19,6 \times 10^5$

*достоверный уровень значимости относительно фона *P<0,05;**P<0,01;*** P<0,001;
+достоверный уровень значимости относительно относительного контроля +P<0,05; ++P<0,01;
+++ P<0,001;

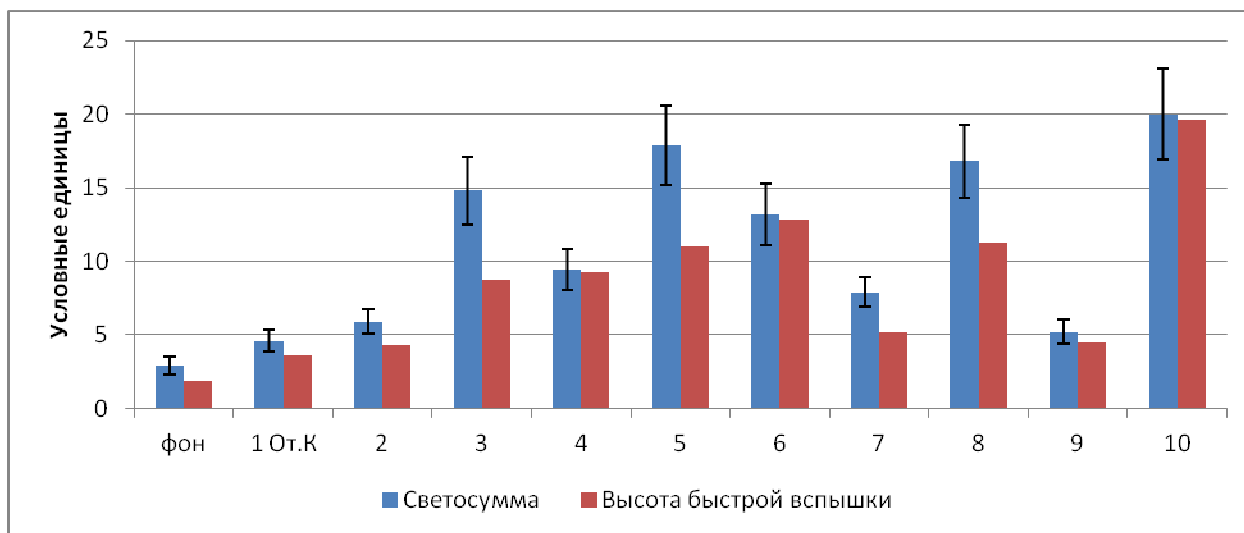


Рис. 2. Интенсивность люминолзависимой хемилюминесценции пилезии многоцветковой (*Pylaisia polyantha*) исследуемых площадок г. Ростова-на-Дону

Автотранспортная зона: (пл. 9 - Змиевский проезд, пл. 10 – пр. Шолохова); **Промышленная зона:** (пл. 2 - ТЭЦ; пл. 3 – ТЭЦ-2, ОАО «ГПЗ» – 10); **Зоны, сочетающие промышленную и автотранспортную нагрузки** (пл. 4 – ул. Портовая, пл. 5 - ул. Сиверса; пл. 6 - пр. Буденновский, пер. Доломановский/ул. Текучева и Мечникова; пл. 7 - ул. Вавилова; пл. 8 - Таганрогское шоссе); **Парковая зона** (пл. 1 - относительный контроль - Ботанический сад)

Показатели величины ХЛ-ответа в точке относительного контроля достоверно ниже показателей на других исследуемых площадках г. Ростова-на-Дону. Максимальные значения светосуммы наблюдались в Первомайском районе города (район аэропорта), где контрольные значения были превышены в 4,3 раза (превышение фоновых значений составило 7 раз), Ленинском (ул. Сиверса) и Октябрьском (Таганрогское шоссе) районах – превышение контрольных показателей в 4 раза (превышение фоновых значений – в 6 раз). Сходная динамика наблюдалась по показателям высоты быстрой вспышки. На основе хемилюминесцентного анализа пилезии многоцветковой к числу зон с максимальной мутагенной активностью атмосферного воздуха были отнесены автотранспортная зона (Первомайский район), зона, сочетающая промышленную и автотранспортную нагрузки - Ленинский (ул. Сиверса) и Октябрьский (Таганрогское шоссе) районы.

Активизация процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) является универсальной реакцией растительной клетки на экстремальные условия внешней среды. Выявлена корреляционная взаимосвязь между уровнем содержания пероксидных группировок, способностью к образованию свободных радикалов и интенсивностью мутационного процесса у некоторых исследованных видов растений [5; 6].

Спонтанная хемилюминесценция (СХЛ) тканей возникает, главным образом, в процессе свободнорадикального окисления липидов и липопротеидов. Благодаря присутствию антиоксидантов (АО) в тканях процесс свободнорадикального окисления

удерживается на относительно низком стационарном уровне. Известно, что изменение скорости свободнорадикальных процессов, вызванное воздействием различных факторов, вызывает изменение интенсивности биохемилюминесценции. Метод регистрации хемилюминесценции (ХЛ) растительных тканей и клеточных суспензий высокочувствителен и отражает быстропротекающие сдвиги равновесия ПОЛ=АО, позволяет интегрально оценивать их направление и выраженность даже без учета поведения компонентов равновесия [2].

В наших экспериментах был использован метод ХЛ в системе H_2O_2 -люминол. H_2O_2 -люминол является химическим активатором ХЛ, который реагирует со свободными радикалами с образованием возбужденных молекул. Важно, что люминол не обладает побочным цитотоксическим действием и при окислении дает высокий квантовый выход. При взаимодействии H_2O_2 с прооксидантными компонентами происходит образование активных форм кислорода (гидроксильный радикал, синглетный кислород и супероксиданион-радикал). Активация СРП ведет к образованию перекисных радикалов RO^* , рекомбинация которых сопровождается высвечиванием кванта света, амплитуда (высота) вспышки ХЛ (H), индуцированной H_2O_2 , характеризует резистентность тканей к перекисному окислению. Величина ее прямо пропорциональна окисляемости тканевых липидов и концентрации металлов переменной валентности и обратно пропорциональна содержанию природных антиоксидантов в исследуемом биосубстрате. Светосумма ХЛ (S_m) отражает скорость расходования свободных радикалов липидной природы, что обусловлено уровнем прооксидантов в системе.

На основе хемилюминесцентного анализа мха пилезии многоцветковой (*Pylaisia polyantha*) к числу точек с максимальной мутагенной активностью атмосферного воздуха были отнесены Первомайский район города (район аэропорта), Ленинский район (ул. Сиверса, устье реки Темерник), Октябрьский (Таганрогское шоссе) и Советский (ТЭЦ-2) районы. В результате оценки гено- и цитотоксичности проб мха *Pylaisia polyantha* с коры реперных деревьев было установлено, что на протяжении трех лет исследования (2010-2012 гг.) наибольшей генотоксичностью характеризовались пробы мха из Ленинского, Железнодорожного и Октябрьского районов [7]. Минимальное превышение уровня aberrаций хромосом по сравнению с точкой относительного контроля (Советский район) достигало 2,1 раза, а максимальное – 7 раз. Показатели уровня aberrаций хромосом в различных точках на протяжении 3-х лет исследования оставались стабильными (коэффициент по Спирмену 0,99) [7].

Таким образом, предлагаемая схема биомониторинга позволяет, используя растительные организмы, находящиеся в консорциативных взаимодействиях, вести

круглогодичный мониторинг генотоксичности окружающей среды, получая сведения как о суммарном эффекте воздействия недифференцированных мутагенных факторов за длительный период времени, так и о сезонных изменениях мутагенности атмосферного воздуха в точках исследования. Информативность предлагаемой схемы мониторинга основывается на использовании широкого спектра биохимических и цитогенетических показателей растительных организмов, характеризующихся различной чувствительностью к воздействию мутагенных факторов среды и адаптированных к условиям урбанизированной экосистемы. Предлагаемая схема биомониторинга предусматривает возможность прогнозирования мутагенной опасности факторов окружающей среды экосистем со сходным уровнем техногенной нагрузки.

Выводы

Пилезия многоцветковая (*Pylaisia polyantha*) является удобным тест-объектом, который может быть использован для биоиндикации окружающей среды методом люминол-зависимой хемилюминесценции.

Применение метода хемилюминесценции позволило получить информацию как об интенсивности деструктивных окислительных процессов в клетках пилезии многоцветковой, так и о работе защитной антиоксидантной системы, резистентности тканей к перекисному окислению.

Уровень свободнорадикальных процессов в гомогенате мха *Pylaisia polyantha*, произрастающего на различных участках промышленных территорий, отражает степень повреждения генетического материала клеток и в случае невозможности цитогенетического анализа является важным косвенным показателем интенсивности мутационного процесса.

Список литературы

1. Бураева Е.А. Содержание и распределение естественных радионуклидов в различных типах почвы Ростовской области / Бураева Е.А. [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 4 (электронный журнал). - URL: www.science-education.ru/110-9652.
2. Владимиров Ю.А. Активированная хемилюминесценция и биолюминесценция как инструмент в медико-биологических исследованиях // Соросовский образовательный журнал. – 2001. - № 1. – С. 48-54.
3. Вьюхина А.А. Применение методов биотестирования для индикации закономерностей варьирования фенотипических и цитогенетических изменений растений-индикаторов в зависимости от степени тектонической нарушенности зоны произрастания / Вьюхина А.А.

[и др.] // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки. - 2013. - № 1. - С. 45-51.

4. Гуськов Е.П. Свободнорадикальные процессы и уровень aberrаций хромосом в листьях древесных растений как тест-система на генотоксичность городской среды / Гуськов Е.П. [и др.] // Экология. – 2000. -- № 4. – С. 38-44.

5. Гуськов Е.П. Генетика окислительного стресса / Гуськов Е.П. [и др.]. - Ростов н/Д : Изд-во СКНЦ ВЦ ЮФУ, 2009. – 156 с.

6. Мерзляк М.Н. Активированный кислород и жизнедеятельность растений // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – № 9. – С. 20-26.

7. Омельченко Г.В. Оценка генотоксичности окружающей среды урбанизированных территорий с использованием древесно-моховых консорциев (на примере г. Ростова-на-Дону) / Омельченко Г.В. [и др.] // Экология и промышленность России. – 2012. - № 11. - С. 51-55.

8. Рыжакова Н.К. Контроль состояния атмосферы с помощью мхов-биоиндикаторов / Рыжакова Н.К. [и др.] // Оптика атмосферы и океана. - 2009. - Т. 22 (1). - С. 101-104.

9. Шиманская Е.И. Разработка и внедрение в практику новых методов биоиндикации токсичности приземного слоя воздуха промышленных центров / Шиманская Е.И. [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - 2013. - № 8. - С. 156-158.

Рецензенты:

Демина Ольга Николаевна, д.б.н., доцент, директор Ботанического сада Южного федерального университета, г. Ростов-на-Дону.

Симонович Елена Ильинична, д.б.н., старший научный сотрудник лаборатории радиобиологии и экологической генетики НИИ биологии Южного федерального университета, г. Ростов-на-Дону.