

ГЕНОТОКСИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВОДНЫХ ПРОБ ЕСТЕСТВЕННОГО ИСТОЧНИКА ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ ИЗ РЕКИ ОМЬ НА ГЕННЫЕ И ХРОМОСОМНЫЕ МУТАЦИИ

Александрова Т.В.¹, Нахаева В.И.²

¹ ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия», Омск, Россия (644043, г. Омск, ул. Ленина, 12), Nagini-snake@yandex.ru

² ГБОУ ВПО «Омский государственный педагогический университет», Омск, Россия (644099, г. Омск, наб. Тухачевского, 14), nakhaeva@mail.ru

Генотоксическая оценка мутагенного эффекта водных проб естественного источника питьевой воды реки Омь на тест-объектах лабораторные линии мышей (*C₅₇BL/6*) и *Dr. Melanogaster* (мутагенчувствительная линия Мюллер 5) показала, что вода реки Омь до и после водоподготовки обладает достоверным по сравнению с контролем токсическим эффектом, а также способностью вызывать как нарушения копийности генетической информации, т.е. индуцировать изменения структуры хромосом в клетках животного организма, так и рецессивные летальные генные мутации. Причиной тому может являться высокий уровень загрязненности не прошедшей очистку воды из реки Омь солями железа и гуминовыми соединениями, а также резко возрастающее после водоподготовки и превышающее предельно допустимую концентрацию для питьевой воды содержание соединений алюминия.

Ключевые слова: питьевая вода, ксенобиотики, клетки костного мозга млекопитающих, тест на рецессивные мутации, *Dr. Melanogaster*, хромосомные aberrации, показатель летальности.

GENOTOXIC ANALYSIS OF WATER SAMPLES FROM A NATURAL SOURCE OF DRINKING WATER (THE OM RIVER) ON GENE MUTATIONS AND CHROMOSOMAL ABERRATIONS

Aleksandrova T.V.¹, Nakhaeva V.I.²

¹ Omsk State Medical Academy, Omsk, Russia, (644043, Omsk, Lenin sreet, 12.), Nagini-snake@yandex.ru

² Omsk State Pedagogical University, Omsk, Russia, (644099, Omsk, Tukhachevskogo street, 14), nakhaeva@mail.ru

The mammal-marrow (laboratory strains of mice - *C₅₇BL/6*) and *Dr. Melanogaster* (mutagen sensitive Muller 5 race) tests assessment in order to evaluate genotoxic effect of the samples of natural source of drinking water (Om river) showed that the water from Om river (before and after water treatment in comparison with the control variant) is able to provoke the statistically significant toxic effect, chromosome aberrations and gene mutations in animal cells. The reason may be a high level of water pollution with iron salts and humic compounds as well as dramatically increasing and exceeding the maximum permissible concentration level of the aluminum compounds after water treatment.

Key words: potable water, xenobiotic, mutagenicity, recessive mutations test, mammal marrow cells, chromosome aberration, case-fatality rate.

В настоящее время очень остро стоит проблема антропогенного воздействия на окружающую природную среду. Это воздействие заключается в чрезмерном выбросе в атмосферу промышленных газов, усиленной эксплуатации почв, нерациональном использовании природных ресурсов и загрязнении водных объектов. На сегодняшний день вода многих рек России стала практически не пригодной для питья из-за превышающего ПДК содержания органических веществ синтетического происхождения (СПАВ, ПАУ, диоксины), нефти, нефтепродуктов и солей тяжелых металлов. Эти загрязняющие вещества, иначе называемые интерферентами, относятся к группе ксенобиотиков и могут оказывать токсическое, канцерогенное, тератогенное или аллергенное воздействия на

живые организмы. Однако наиболее опасны ксенобиотики, обладающие мутагенным эффектом, так как именно они влияют на изменения генетической информации, тем самым угрожая здоровью не только настоящего поколения, но и ряда последующих поколений. При воздействии повреждающих факторов окружающей среды на человека могут наблюдаться три типа нежелательных эффектов: изменения наследственных структур; патологические проявления экспрессии генов на специфические факторы среды; изменения генофонда популяций как результат нарушения генетического равновесия между мутационным процессом и отбором [2]. Таким образом, прежде неисчерпаемый ресурс – чистая пресная вода – становится исчерпаемым, требующим проведения программ тщательной водоподготовки и изучения механизма действия загрязнителей на различных уровнях организации живых систем.

Данная проблема актуальна и для города Омска и Омской области. В настоящее время в области в качестве основных источников питьевой воды используется две реки – Иртыш и Омь. При этом Иртыш используется как основной источник, снабжающий водой город и область, а Омь как второстепенный, питающий только некоторые районы Омской области – Калачинский, Кормиловский и Нижнеомский. Иртыш является трансграничной рекой: помимо России, ее воду в большом объеме используют такие страны, как Казахстан и Китай, что является одной из причин обмеления ее русла. Данная ситуация усугубляется ещё и тем, что в последние десятилетия отмечается очень высокий уровень загрязнения реки: величина удельного комбинаторного индекса загрязнения воды (УКИЗВ) составила 3,51, что позволяет отнести качество воды к 3Б классу. Основными интерферентами, ежегодно превышающими предельно допустимые концентрации, являются соединения железа (2,1 ПДК среднегодовая концентрация; максимальная – 9,0 ПДК), меди (8,8 ПДК среднегодовая; 28,0 ПДК максимальная), цинка (1,6 ПДК среднегодовая; 4,0 ПДК максимальная), марганца (1,3 ПДК среднегодовая; 4,7 ПДК максимальная), фенолы (1,1 ПДК среднегодовая; 3,0 ПДК максимальная), нефтепродукты (0,7 ПДК среднегодовая; 3,2 ПДК максимальная), которые резко ухудшают качество питьевой воды [7].

В связи с этим в последнее время все чаще поднимаются вопросы о необходимости использования реки Омь как альтернативного источника питьевой воды. Однако, как и Иртыш, река Омь имеет достаточно высокий уровень загрязненности, содержит значительно большее количество соединений железа (5,8 ПДК среднегодовая концентрация; максимальная – 17,0 ПДК) по сравнению с Иртышом, а также отличительной особенностью Оми является наличие в ней гуминовых соединений – органических веществ, извлекаемых из природных продуктов (торф, бурый уголь, каменный уголь) водными растворами щелочей, высокое содержание которых приводит к тому, что показатели цветности и

мутности ежегодно превышают предельно допустимые в 7-10 раз, окисляемости в 3-4 раза. Гуминовые кислоты и продукты их взаимодействия с компонентами речной воды (такие, например, как соли гуматы) влияют на ее органолептические свойства, ускоряют коррозию металла, оказывают отрицательное влияние на развитие водных микроорганизмов, изменяют химический состав, снижая содержание кислорода и влияя на ионные и фазовые равновесия [4; 7].

Высокая степень загрязненности обеих рек обуславливает необходимость водоподготовки, которая включает следующие стадии: механическое отстаивание, затем коагуляция солями алюминия, флокуляция, фильтрация и обеззараживание хлором. В результате проведения этой процедуры снижаются показатели окисляемости и цветности, но возрастает количество других вредных веществ, в частности солей алюминия и продуктов взаимодействия органических соединений с хлором, что может быть не менее вредно для человека, употребляющего данную воду как питьевую [5]. В связи с этим экологические службы города Омска и Омской области регулярно осуществляют количественный учет интерферентов, в том числе и ксенобиотиков, но, к сожалению, такой учет не всегда сопровождается качественной характеристикой, то есть определением генотоксического эффекта, которым обладает тот или иной загрязнитель, а такая оценка, безусловно, необходима [8].

В 2008-2009 гг. в течение 12 месяцев на кафедре биологии ОмГПУ проводился тщательный анализ данных о химическом составе воды из реки Омь, полученных в экологической службе Омской области, и последующее изучение генотоксических свойств питьевой воды в серии первичного скрининга на тест-объекте мягкая яровая пшеница.

Цель исследования

Провести генотоксический анализ водных проб естественного источника питьевой воды из реки Омь и выявить ее способность вызывать генные и хромосомные мутации.

Особое внимание уделялось тем показателям, уровень которых ежегодно выходит за рамки предельно допустимого – содержанию соединений железа, цветности и мутности, а также остаточному алюминию, до водоподготовки не превышающему ПДК, но накапливающемуся в больших количествах вследствие проведения процедур водоочистки, и ежемесячное их изучение показало, что самые высокие цветность, окисляемость и общее железо фиксируются в летний период года. Анализ проб воды из реки Омь до и после водоподготовки в серии первичного скрининга подтвердил данные, полученные в ходе изучения физико-химического состава, и показал, что вода реки Омь до и после водоподготовки обладает достоверным ($p \leq 0,001$) токсическим и мутагенным эффектом, установленным в ходе регистрации показателей энергии прорастания, всхожести и

хромосомных aberrаций в растительной клетке, максимальным в варианте «водная проба июля до водоподготовки», минимальным в варианте «водная проба ноября после водоподготовки» [1].

После анализа результатов, полученных в ходе первичного скрининга, было принято решение исследовать способность воды из реки Омь до и после водоподготовки вызывать изменения копийности генетической информации и структуру гена в животной клетке, для чего в качестве следующих этапов эксперимента были выбраны такие методы оценки генотоксичности проб воды и водных растворов, как анализ хромосомных aberrаций на лабораторной линии мышей и оценка рецессивных мутаций на тест-объекте *Drosophila melanogaster*. Анализ хромосомных aberrаций в клетках костного мозга бедренных костей лабораторной линии мышей *C57BL/6* проводился в 2009 году, для чего брались пробы воды до и после водоподготовки только за июль – период, показавший наивысший уровень генотоксичности по результатам оценки на растительном тест-объекте, и соответственно были получены новые данные физико-химического анализа воды из реки Омь (табл. 1).

Таблица 1

Физико-химический анализ воды из реки Омь в июле 2009 г.

Показатель	ДВ	ПВ
Запах (баллы)	3,00	2,00
Привкус (баллы)	3,00	2,00
Мутность (мг/л)	6,07	0,94
Цветность °	220,00	185,00
Общее железо (мг/л)	2,71	1,35
Жесткость (мг·экв/л)	3,17	3,01
Остаточный алюминий (мг/л)	0,20	0,50
Окисляемость (мг/л)	25,60	26,60

Примечание: ДВ – до водоподготовки, ПВ – после водоподготовки.

При изучении показателей была выявлена схожая с июлем 2008 года закономерность: снижение содержания соединений железа (с 2,71 до 1,35 мг/л), цветности (с 220 до 185°), мутности (с 6,07 до 0,94 мг/л), возросшее в 2,5 раза (с 0,20 до 0,50 мг/л) после проведения водоподготовки содержание остаточного алюминия и подобный зафиксированному в 2008 г. небольшой подъем окисляемости (с 25,6 до 26,6 мг/л).

Материал и методы исследования

Эксперимент проводился по схеме, основанной на стандартной методике, предложенной авторским коллективом А.Д. Дурнева для тестирования фармакологических средств [6], с рядом изменений, внесенных по результатам многолетних предварительных исследований, проведенных в лаборатории генетики ОмГПУ [14]. В отличие от методики Дурнева и сотр.

при изучении препаратов регистрировались как нормальные ана- и телофазы, так и патологические, содержащие фрагменты, хромосомные мосты, отстающие хромосомы и сочетанная патология [9]. Статистическая обработка цитогенетической активности проводилась по стандартной методике. Достоверность различий определялась с помощью критерия Стьюдента. В эксперименте на тест-объекте *Dr. Melanogaster* использовалась схема изучения рецессивных мутаций, основанная на стандартных методиках оценки показателя летальности (отсутствие красноглазых самцов) у гибридов второго поколения, полученных от скрещивания мутагенчувствительной линии Мюллер 5 и особей дикого типа, выращенных на питательной среде с добавкой изучаемого раствора. Параллельно проводился контрольный вариант - питательная среда без добавок [6; 10]. Показатель летальности опытных вариантов сравнивался с показателем контрольного с помощью критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты изучения способности воды из реки Омь до и после проведения водоподготовки индуцировать хромосомные aberrации в клетках костного мозга бедренных костей лабораторной линии мышей *C57BL/6* свидетельствуют о том, что данные пробы в опытных вариантах (до и после водоподготовки) способны вызывать достоверное ($p \leq 0,001$) повышение уровня мутирования по сравнению с контролем, показавшим 0,34‰ патологий в анафазу и 0,20‰ в телофазу, всего 0,54‰ (табл. 2).

Таблица 2

Митотический режим клеток костного мозга мышей после воздействия воды из реки Омь в сравнении с контролем, ‰

Вариант		Анафаза		Телофаза		Итого патологий
		всего	патологий	всего	патологий	
Контроль		2,22±0,12	0,34±0,08	2,87±0,09	0,20±0,02***	0,54±0,09
июль 2009 г.	ДВ	2,19±0,11	1,06±0,06***	2,88±0,18	0,69±0,03***	1,75±0,07***
	ПВ	2,58±0,09	1,08±0,07***	2,68±0,09	0,76±0,03***	1,84±0,08***

Примечание: ДВ – до водоподготовки, ПВ – после водоподготовки; * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$.

В варианте «вода из реки Омь» до водоподготовки зарегистрировано увеличение числа патологических митозов в 3 раза в анафазу (1,06‰) и в 3,5 раза в телофазу (0,69‰), всего 1,75‰, практически тот же рост количества хромосомных aberrаций отмечался и в варианте «вода из реки Омь после водоподготовки» – 1,08‰ в анафазу и 0,76‰ в телофазу, общее число зарегистрированных патологий – 1,84‰. В свою очередь, между опытными вариантами достоверных различий зафиксировано не было.

При рассмотрении спектра патологий увеличение частоты хромосомных aberrаций в анафазу было отмечено в обоих вариантах, по сравнению с контрольным (табл. 3), и в

основном было связано с таким типом хромосомных aberrаций, как множественные фрагменты, количество которых возросло более чем в 4 раза, составив 0,78‰ до водоподготовки и 0,86‰ после ее проведения, в то время как в контрольном варианте была зарегистрирована частота лишь в 0,19‰ (отличия с контролем достоверны – $p \leq 0,001$; а достоверных отличий между опытными вариантами не установлено).

Таблица 3

Спектр патологий анафаз в клетках костного мозга мышей
после воздействия воды из реки Омь в сравнении с контролем, ‰

Вариант		Фрагменты	Множественные фрагменты	Соч. пат.
Контроль		0,09±0,03	0,19±0,04	0,06±0,02
июль 2009 г.	ДВ	0,006±0,004	0,78±0,05***	0,27±0,05***
	ПВ	0,003±0,008	0,86±0,06***	0,22±0,05***

Примечание: ДВ – до водоподготовки, ПВ – после водоподготовки; * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$.

Также достоверно ($p \leq 0,001$) возросла и частота встречаемости такого типа нарушения митоза, как сочетанная патология. Если в контрольном варианте было зафиксировано лишь 0,06‰, то в варианте «вода из реки Омь до водоподготовки» количество данных aberrаций возросло в 4,5 раза, то есть до 0,27‰, в варианте же «вода из реки Омь, прошедшая водоподготовку» показатель снизился до 0,22‰, но данное снижение достоверным не является.

Стоит отметить, что количество зафиксированных одиночных фрагментов (0,006‰ и 0,003‰ до и после водоподготовки соответственно) было достоверно меньше, чем в контрольном варианте (0,09 ‰), что, так же как и было отмечено по результатам первичного скрининга на растительной клетке, вероятнее всего, связано со способностью комплекса основных действующих агентов, содержащихся в воде из реки Омь, вызывать повреждения большого числа хромосом одновременно.

Аберрантные телофазы были представлены такими частями спектра, как одиночные и множественные фрагменты и сочетанная патология (табл. 4), частота встречаемости каждой из этих патологий достоверно ($p \leq 0,001$) превышала контрольные показатели.

Таблица 4

Спектр патологий телофаз в клетках костного мозга мышей
после воздействия воды из реки Омь в сравнении с контролем, ‰

Вариант		Фрагменты	Множественные фрагменты	Соч. пат.
Контроль		0,10±0,005	0,06±0,009	0,05±0,009
июль 2009 г.	ДВ	0,36±0,06***	0,19±0,04***	0,15±0,03***
	ПВ	0,40±0,04***	0,21±0,05***	0,15±0,04***

Примечание: ДВ – до водоподготовки, ПВ – после водоподготовки; * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$.

Доля патологических телофаз с фрагментами в опытных вариантах по сравнению с контролем (0,10‰) увеличилась в 3,6 раза при изучении речной воды, составив 0,36‰, и в 4 раза при изучении воды, прошедшей процедуры очистки (0,40‰). Частота встречаемости множественных фрагментов, которая в контрольном варианте была на уровне 0,06‰, до и после водоподготовки возросла в 3,2 и 3,5 раза (0,19‰, 0,21‰) соответственно, а количество сочетанных патологий в 3 раза – в обоих опытных вариантах 0,15‰, в контрольном 0,05‰.

Таким образом, в ходе регистрации хромосомных aberrаций на тест-объекте «лабораторная линия мышей *C₅₇BL/6*» было установлено, что вода из реки Омь способна вызывать достоверный по сравнению с контролем, не уменьшающийся при проведении водоподготовки рост числа патологий митоза клеток костного мозга млекопитающих, который вызывает комплексное действие таких загрязнителей, как соединения железа и остаточный алюминий.

Полученные в ходе эксперимента данные о способности воды реки Омь как до, так после проведения водоподготовки индуцировать изменения структуры хромосом в клетках животного организма позволили приступить к следующему этапу исследования – анализу генных мутаций на тест-объекте *Dr. Melanogaster*. На этом этапе проводилось исследование проб воды из реки Омь до и после водоподготовки, взятых в июле 2009 года (табл. 1). Как отмечалось ранее, данный период был выбран в связи с тем, что тесты первичного скрининга выявили максимальный уровень генотоксической активности воды в этом месяце.

В ходе оценки рецессивных мутаций на тест-объекте *Dr. Melanogaster* было выявлено достоверное ($p \leq 0,001$) снижение количества красноглазых самцов до 48,90% в варианте «вода из реки Омь до водоподготовки», и до 44,30% после водоподготовки по сравнению с контролем (64,41%). Различия между опытными вариантами также достоверны – уровень значимости $p \leq 0,01$ (табл. 5).

Таблица 5

Влияние воды из реки Омь на показатель летальности у *Dr. Melanogaster* (мутантная форма Muller 5) в сравнении с контролем, %

Вариант	Процент красноглазых самцов в пробирке	Показатель летальности
Контроль	64,41±1,30	0,0
ДВ (июль 2009 г.)	48,90±0,98***	4,0***
ПВ (июль 2009 г.)	44,30±1,15***	7,0***

Примечание: ДВ – до водоподготовки, ПВ – после водоподготовки; * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$.

Показатель летальности в контрольном варианте был равен нулю и достоверно возрастал до 4,0% в варианте «вода из реки Омь до водоподготовки», и до 7,0% в варианте

«вода из реки Омь после водоподготовки» – эти проценты соответствуют доле X-хромосом, несущих летальную мутацию. Опытные варианты также достоверно отличаются друг от друга ($p \leq 0,001$).

Таким образом, анализ способности воды из реки Омь вызывать рецессивные летальные мутации у самцов *Drosophila melanogaster* показал, что при изучении речной воды число индуцированных рецессивных леталей достоверно ($p \leq 0,001$) выше зафиксированного в контрольном варианте, и этот показатель также достоверно ($p \leq 0,001$) возрастает в 1,75 раза после проведения стандартных процедур водоподготовки.

Рост показателя летальности в варианте «вода из реки Омь после проведения водоподготовки» позволяет сделать вывод, что снижение количества железа в воде из реки Омь (как показано в таблице 1) до 1,35 мг/л, по сравнению с 2,71 мг/л, зафиксированными в пробе воды до водоподготовки, а также снижение ее цветности с 220 до 185° не приводит к уменьшению числа вызываемых ею генных мутаций, а следовательно, к ожидаемому улучшению качества воды. В то же время возросшее содержание соединений алюминия в пробе (с 0,20 до 0,50 мг/л) и небольшое увеличение показателя окисляемости с 26,6 до 25,6 мг/л, вероятно, являются одними из основных причин усиления ее способности вызывать генные мутации.

Заключение

Сравнение данных, полученных на последнем этапе эксперимента, с результатами исследований способности воды из реки Омь индуцировать патологии митоза, то есть в серии первичного скрининга и при учете хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей, позволило прийти к заключению, что пробы воды из реки Омь, прошедшие процедуры водоподготовки, вызывают достоверно ($p \leq 0,001$) большее количество генных мутаций, чем пробы речной воды. В то же время по способности индуцировать структурные изменения хромосом и патологию митотического аппарата клеток опытные варианты достоверно не отличались, находясь на одном уровне значимости, что, вероятно, объясняется способностью тех или иных агентов обуславливать определенный тип мутаций.

Список литературы

1. Александрова Т.В. Генотоксический анализ водных проб естественного источника питьевой воды реки Омь // Алтай: экология и природопользование : труды VIII Российско-монгольской научной конференции молодых ученых и студентов. – Бийск : БПГУ им. В.М. Шукшина, 2009. - С. 23-30.

2. Бочков Н.П. Экологическая генетика человека // Медицинская кафедра : научно-практический журнал. – 2003. – № 3. – С. 4-9, 107-110.
3. Нахаева В.И. Цитогенетическая оценка тяжелого металла цинка в системе биотестов на индукцию хромосомных aberrаций / В.И. Нахаева, О.П. Гурова, К.А. Рожко // Естественные науки и экология. Ежегодник. Вып. 6. Межвузовский сборник научных трудов. – Омск : ОмГПУ, 2001. – С. 199–203.
4. Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. – М. : МГУ, 1990. – 325 с.
5. Оптимизация процессов при комплексном водоснабжении объектов / С.В. Гуляк [и др.] // Автоматизация и современные технологии. - 2005. – № 1. – С. 41–43.
6. Оценка мутагенных свойств фармакологических средств / А.Д. Дурнев [и др.] // Ведомости фармакологического комитета. - 1998. – № 4. – С. 32– 39.
7. Состояние и охрана окружающей среды Омской области в 2007 году / М-во промышл. политики, транспорта и связи Ом. обл. – Омск : Манифест, ОмГПУ, 2008. – 200 с.
8. Системный подход к скринингу на мутагенную активность химических факторов окружающей среды // Наследственность человека и окружающая среда : сб. ст. / Рос. ком. по программам ЮНЕСКО «Человек и биосфера». - М., 1984-1992. - Вып. 2. – С. 140–151.
9. Kodama Y., Pawel D., et al. Stable chromosome aberrations in atomic bomb survivors: Results from 25 years of investigation // Radiation Research. - 2001; 156:337-46.
10. Zordan M., Costa R., Levis A.G. Perspectives in the use of *Drosophila melanogaster* in genotoxicity testing // [Prog Clin Biol Res.](#) - 1991; 372:423-31 (ISSN: 0361-7742).

Рецензенты:

Воробьева Т.Г., д.б.н., проф., зав. каф. биологии Омского государственного педагогического университета, г. Омск;

Богданов И.И., д.б.н., проф. каф. экологии и природопользования Омского государственного педагогического университета, г. Омск.