

## ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ СРЕДЫ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ В РАЙОНЕ КРУПНЫХ ГОРНО-ДОБЫВАЮЩИХ ПРЕДПРИЯТИЙ (НА ПРИМЕРЕ ПАВЛОВСКОГО ГОРНО-ОБОГАТИТЕЛЬНОГО КОМБИНАТА)

Калаев В.Н., Игнатова И.В., Епринцев С.А., Дмитриев Д.А., Тихомирова Е.В.

*ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж, e-mail: Dr\_Huixs@mail.ru*

Проведено исследование гомеостаза развития прудовой лягушки в районе Павловского горно-обогатительного комбината с использованием микроядерного теста в периферической крови и оценки флуктуирующей асимметрии. У особей лягушки прудовой (*Rana lessonae Camerano*), обитающих в водоемах Павловского района, уровень флуктуирующей асимметрии билатеральных морфологических признаков составила 0,3, что соответствует 1 баллу по пятибалльной шкале оценки Захарова В.М. В крови лягушек, отловленных в трех водоемах Павловского района, выявлены эритроциты с микроядрами пяти типов: стандартного (преобладающий тип), прикрепленного, в виде палочек, в виде клубочков и неоформленный ядерный материал большого размера. Наибольшая частота эритроцитов с нарушениями отмечается в Малоказинском водохранилище, что свидетельствует о большей степени его загрязненности по сравнению с другими водоемами. Установлены различия между полами в Малоказинском водохранилище: больше всего нарушений отмечено у самцов, что говорит об их большей чувствительности к токсикантам внешней среды, чем самок. Показана большая чувствительность к загрязнению окружающей среды цитогенетических показателей по сравнению с флуктуирующей асимметрией. Проведенные исследования являются элементом биомониторинга и отражают влияние состояния среды обитания на живые организмы в водных экосистемах в районах крупных горнодобывающих предприятий.

Ключевые слова: микроядро, флуктуирующая асимметрия, Павловский горно-обогатительный комбинат, лягушка прудовая.

## THE EVALUATION OF WATER ECOSYSTEMS CONDITIONS IN THE AREAS OF LARGE MINING COMPANIES (MINING AND PROCESSING PLANT PAVLOVSKY GOK)

Kalaev V.N., Ignatova I.V., Eprintsev S.A., Dmitriev D.A., Tikhomirova E.V.

*Voronezh State University, Voronezh, e-mail: Dr\_Huixs@mail.ru*

The study of homeostasis of the pond frog in Pavlovsk mining and processing plant area, using the micronucleus test in peripheral blood and evaluation fluctuating asymmetry has been provided. In individuals pond frog (*Rana lessonae Camerano*), inhabiting the waters of the Pavlovsk district, the level of fluctuating asymmetry of bilateral morphological traits was 0.3, which corresponds to 1 point for 5-point scale assessment of V. Zakharov. It has been revealed red blood cells with micronuclei of five types: standard (dominant type) attached, stick form, glomeruli form and unformed nuclear material pain-large dimensions in the blood of frogs, caught in the three reservoirs of Pavlovsk district. The highest frequency of erythrocytes with violations noted in Malokazinsk reservoir, which indicates greater degree of contamination compared to other ponds. The differences between the sexes in Malokazinsk reservoir has been observed, most violations detected in males that shows to their greater sensitivity to toxicants of the environment than the females. It has been shown more sensitivity of cytogenetic indices to the environment pollution in comparison with the fluctuating asymmetry meter. These studies are the part of biomonitoring and they reflect the environment conditions influence to living organisms in aquatic ecosystems in the areas of large mining and processing plants.

Keywords: microkernel, fluctuating asymmetry, Pavlovsk mining and processing plant, pond frog.

Оценка состояния среды в районе горнодобывающих предприятий и проведение мероприятий по снижению эффектов антропогенного воздействия на биосистемы является одним из направлений исследований в области биомониторинга и геоэкологии. Горно-обогатительные предприятия оказывают влияние на окружающую среду в целом и на водные ресурсы как основной компонент биосистем. Сброс неочищенных техногенных стоков на

поверхность почвы приводит к накоплению в окружающих водных объектах тяжелых металлов (медь, цинк, железо, марганец многие другие), которые обладают общетоксичными и мутагенными свойствами [12].

Традиционные способы оценки качества воды путем физико-химических анализов сложны и дорогостоящи. Кроме того, следует учитывать, что генотоксические вещества действуют на живые организмы не изолированно, а в разных сочетаниях и концентрациях компонентов. Поэтому решение сложной проблемы определения суммарного действия присутствующих в воде мутагенов и промутагенов на биоту целесообразно путем биоиндикации с использованием морфогенетического и цитогенетического подходов [17].

Одной из наиболее информативных характеристик развития организма является стабильность онтогенеза, которая обусловлена факторами внешней среды и генетически детерминирована. Оценить данный параметр можно по уровню флуктуирующей асимметрии, представляющей собой незначительные, ненаправленные отклонения от строгой симметрии [6]. Работы по определению флуктуирующей асимметрии, выполненные на разных объектах [5, 13, 20, 22], показали, что наиболее высокий уровень флуктуирующей асимметрии характерен для популяций, обитающих в условиях сильного загрязнения среды, наиболее низкий – для контрольных «чистых» популяций.

Другим показателем состояния организма является цитогенетический гомеостаз, который можно охарактеризовать с использованием микроядерного теста. В настоящее время микроядерный анализ широко используется для оценки уровня загрязненности окружающей среды мутагенами. Данный подход позволяет улавливать изменения в природных популяциях и прогнозировать их последствия [4]. К преимуществам микроядерного теста относятся быстрота, дешевизна, простота, независимость от кариотипа [11].

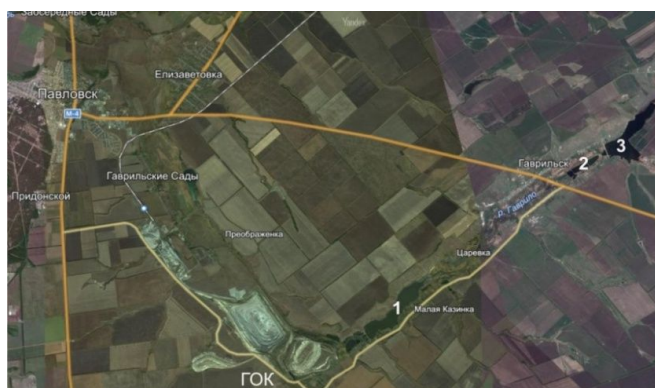
Перспективным объектом биоиндикационных исследований считаются лягушки [1, 9, 16, 19, 21], которые выступают связующим звеном между водными и наземными экосистемами и могут выступать индикаторами состояния соответствующей местности в целом.

В связи с вышеизложенным, целью исследования стала оценка гомеостаза развития прудовой лягушки (*Rana lessonae* Camerano) с использованием морфогенетического и цитогенетического подходов в районе крупного горнодобывающего предприятия (Павловского горно-обогатительного комбината).

### **Материалы и методы**

Исследования были выполнены в Павловском районе Воронежской области вблизи Павловского горно-обогатительного комбината в трех водоемах: Малоказинском

водохранилище, пруду в с. Гаврильск и пруду в с. Каменск. Все водоемы расположены вдоль реки Гаврило (рис. 1).



*Рис. 1. Схема расположения мест проведения исследований: 1 – Малоказинское водохранилище, 2 – пруд в с. Гаврильск, 3 – пруд в с. Каменск*

Павловский гранитный карьер расположен в Павловском районе Воронежской области (с. Шкурлат). В карьере ведутся работы по добыче гранитного сырья Шкурлатовского месторождения. Карьер представляет собой горнодобывающее предприятие по добыче блоков гранита с последующей их переработкой на щебень, распиловкой на плиты с частичной полировкой последних. Способ добычи гранитного сырья – скважинно-шпуровой с применением взрывных работ.

В структурно-тектоническом отношении Шкурлатовское месторождение расположено в пределах Павловско-Стрелицкого краевого поднятия докембрийского фундамента платформы, сложенного в основном мигматит-гранит-сиенитовым интрузивным комплексом раннепротерозойского возраста. Основными породообразующими минералами комплекса являются: роговая обманка, кварц, калиевый полевой шпат, плагиоклаз (олигоклаз), биотит, мусковит, присутствуют циркон, гранат, магнетит, сфен, апатит, турмалин и другие минералы [18].

Определение качества воды было проведено санитарно-эпидемиологической службой г. Павловска Воронежской области. Тяжелые металлы и плавающие примеси ни в одном из водоемов выявлены не были.

Оценку стабильности развития проводили по уровню флуктуирующей асимметрии согласно рекомендациям [7].

Цитогенетический анализ оценивали по количеству эритроцитов с микроядрами. Для изготовления препаратов крови лягушек декапитировали, разрезали кожу с брюшной стороны, осуществляли забор крови из сердца с помощью шприца. Каплю крови наносили на сухое чистое предметное стекло и готовили мазок. Затем препараты высушивали на воздухе несколько минут. Сухие препараты окрашивались раствором красителя Гимза 1:5 в течение

20 мин. Затем препараты накрывали покровными стеклами и просматривали на микроскопе «МИКМЕД-6». На каждом препарате просматривали не менее 1000 клеток.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ «Stadia». Процедура группировки данных и их обработка изложены в работе [10]. Сравнение особей из трех водоемов по уровню клеток с микроядрами осуществляли с использованием непараметрических X-критерия Ван-дер-Вардена и критерия Вилкоксона, по величине флуктуирующей асимметрии – по t-критерию Стьюдента.

### **Результаты исследований и их обсуждение**

Величина флуктуирующей асимметрии у прудовой лягушки (*Rana lessonae*), обитающей в водоемах Павловского района, представлена в таблице 1.

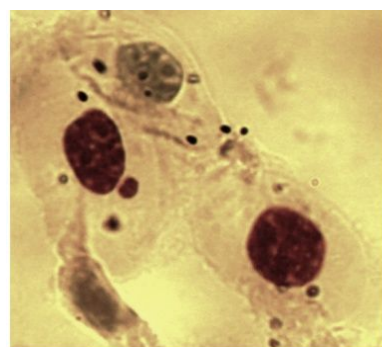
Таблица 1

Величина флуктуирующей асимметрии билатеральных морфологических признаков лягушки прудовой (*Rana lessonae* Camerano)

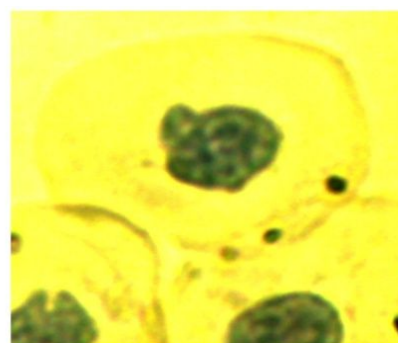
Водоем	самцы	самки
Малоказинское водохранилище	0,30±0,04	0,30±0,04
пруд с. Гаврильск	0,40±0,06	0,30±0,04
пруд с. Каменск	0,30±0,03	0,30±0,03

Согласно пятибалльной шкале оценки отклонений организма от условной нормы по величине интегрального показателя стабильности развития для земноводных Захарова В.М., качество среды в обследованных водоемах соответствует 1 баллу (условно нормальное).

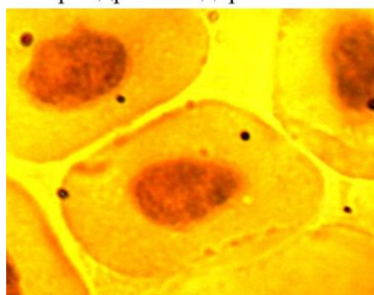
В результате проведенных исследований нами было выявлено, согласно классификации, предложенной Жулевой и Дубининой [4], 5 типов клеток с микроядрами: стандартного типа, прикрепленного типа, неоформленные в виде «палочек», неоформленные в виде клубочков и округлые образования большого размера (рис. 2).



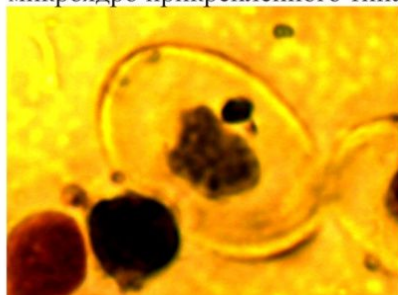
микроядро стандартного типа



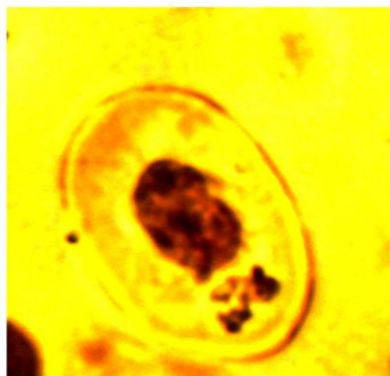
микроядро прикрепленного типа



микроядро неформленное  
в виде "палочки"



микроядро неформленное  
в виде клубочков



неформленный ядерный материал

*Рис. 2. Типы микроядер, выявляемые в крови прудовой лягушки (*Rana lessonae*), обитающей в водоемах Павловского района*

Анализ частоты встречаемости клеток с микроядрами выявил наибольшую частоту нарушений у лягушек, обитающих в Малоказинском водохранилище и водоеме с. Гаврильск, по сравнению с лягушками, обитающими в водоеме с. Каменск ( $P < 0,05$ ) (табл. 2).

Таблица 2

Частота встречаемости аберрантных клеток в крови прудовой лягушки (*Rana lessonae*), обитающей в водоемах Павловского района

Исследуемый водоем	Пол особи	Общее количество аберрантных клеток, ‰	Типы аберрантных клеток, ‰				
			Микроядра стандартного типа	Микроядра прикрепленного типа	Микроядра в виде «палочек»	Микроядра в виде «клубочков»	Неоформленный ядерный материал
Малоказинское водохранилище	самец	6,7±0,6**	4,7±0,5***	1,1±0,3	0,4±0,2	0,4±0,2	0,2±0,1
	самка	4,6±0,5	1,9±0,3	1,4±0,2	0,3±0,1	0,5±0,2	0,5±0,2
	общее	5,7±0,4	3,3±0,4 <sup>a</sup>	1,3±0,2	0,3±0,1	0,4±0,1	0,4±0,1
пруд с. Гаврильск	самец	4,7±0,7	2,2±0,5	1,5±0,4	0,4±0,1	1,2±0,8	0,3±0,1
	самка	6,3±0,8	2,7±0,3	1,9±0,5	0,6±0,2	0,5±0,2	0,4±0,2
	общее	5,5±0,6	2,5±0,3 <sup>a</sup>	1,7±0,3	0,3±0,1	0,8±0,4	0,4±0,1
пруд с. Каменск	самец	4,8±0,6	2,6±0,5***	1,1±0,4	0,4±0,2	0,5±0,2	0,3±0,1
	самка	4,7±0,5	1,1±0,4	1,7±0,3	0,3±0,1	0,4±0,1	0,5±0,1
	общее	4,8±0,4	2,2±0,4	1,4±0,3	0,4±0,2	0,4±0,1	0,4±0,1

Обозначения: \*\*\* – различия с самками, обитающими в том же водоеме, достоверны,  $P < 0,05$ , \*\* – различия с самками, обитающими в том же водоеме, достоверны,  $P < 0,01$ , а – различия с особями, обитающими в пруду с. Каменск, достоверны,  $P < 0,05$ .

Анализ частоты встречаемости эритроцитов со стандартными микроядрами совпадает с результатами, полученными при анализе общего числа нарушений. Из всех типов микроядер они являются преобладающими. По мнению Л.Ю. Жулевой и Н.П. Дубинина, наличие в клетках периферической крови озерной лягушки микроядер стандартного типа является естественным, тогда как наличие в клетках микроядер других видов является результатом цитогенетического нарушения, произошедшего в организме под действием загрязненности окружающей среды мутагенами [4]. В то же время рядом авторов установлено, что у прудовой лягушки в г. Нижнем Новгороде преобладают микроядра прикрепленного типа [14, 15]. Преобладание клеток с микроядрами прикрепленного вида в крови зеленых лягушек свидетельствует о нарушениях цитогенетического гомеостаза, что связано, по-видимому, с дефектами в структуре хромосом, вызванными мутагенными факторами окружающей среды и воздействием приоритетных загрязнителей водоемов на организм животных [2].

По частоте встречаемости эритроцитов с микроядрами прикрепленного типа, ядерного материала в виде палочек, клубочков, округлых образований большого размера различий между лягушками обследованных водоемов установлено не было. Образование первого типа микроядер обусловлено нарушениями в структуре хромосом, а остальных типов – отставание хромосом в мета- или анафазе митоза [4].

Были выявлены различия между полами у обследованных особей лягушек Малоказинского водохранилища (самцы –  $6,7 \pm 0,6$  ‰; самки –  $4,6 \pm 0,5$  ‰ (различия достоверны ( $P < 0,01$ )).

Стоит отметить, что максимальное число клеток с микроядрами наблюдалось у самцов лягушек, обитающих в Малоказинском водохранилище, по сравнению с самцами Гаврильского и Каменского водоемов ( $P < 0,05$ ), что свидетельствует об их большей чувствительности к генотоксикантам. Ранее различия между полами по частоте эритроцитов с микроядрами отмечались у прыткой ящерицы [3], перепела японского при промышленном разведении [8] и др.

Частоты встречаемости микроядер в виде палочек, клубочков и образований большого размера не отличаются между водоемами.

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. У особей лягушки прудовой (*Rana lessonae* Camerano), обитающих в водоемах Павловского района, уровень флуктуирующей асимметрии билатеральных морфологических признаков составил 0,3, что соответствует 1 баллу по пятибалльной шкале оценки отклонений организма от условной нормы по величине интегрального показателя стабильности развития для земноводных Захарова В.М. Это говорит об условной норме

состояния среды обитания [7]. Различия между полами установлены не были.

2. В крови лягушек, отловленных в трех водоемах Павловского района, выявлены эритроциты с микроядрами пяти типов: стандартного (преобладающий тип), прикрепленного, в виде палочек, в виде клубочков и неоформленный ядерный материал большого размера. Наибольшая частота эритроцитов с нарушениями отмечается в Малоказинском водохранилище, что свидетельствует о большей степени его загрязненности по сравнению с другими водоемами.

3. Установлены различия между полами в Малоказинском водохранилище: больше нарушений отмечено у самцов, что говорит об их большей чувствительности к токсикантам внешней среды, чем самок.

4. Показана большая чувствительность к загрязнению окружающей среды цитогенетических показателей по сравнению с флуктуирующей асимметрией.

5. Проведенные исследования являются элементом биомониторинга и отражают состояние среды обитания на живых организмах в водных экосистемах в районах крупных горнодобывающих предприятий.

*Исследование выполнено в рамках и при поддержке проекта РФФИ № 16-45-360284 р\_а «Мониторинг состояния биотехносферы урбанизированных территорий Воронежской области как фактора устойчивого развития региона».*

### Список литературы

1. Вершинин В.Л. Амфибии как биоиндикаторы состояния урбанизированных экосистем [Текст] / В.Л. Вершинин // Урбоэкосистемы. Проблемы и перспективы: материалы III международной научно-практической конференции (Ишим, 21–22 марта 2008 г.). – Ишим, 2008. – С. 21–25.
2. Гелашвили Д.Б. Экология Нижнего Новгорода: монография. [Текст] / Д.Б. Гелашвили, Е.В. Копосов, Л.А. Лаптев. – Н. Новгород: ННГАСУ, 2008. – 530 с.
3. Дробот Г.П. Использование гематологических показателей *Lacerta agilis* L. для оценки антропогенно нарушенных территорий [Текст] / Г.П. Дробот, О.С. Ремизова // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2012. – Т. 14, № 1-8. – С. 1-8.
4. Жулева Л.Ю. Использование микроядерного теста для оценки экологической обстановки в районах Астраханской области [Текст] / Л.Ю. Жулева, Н.П. Дубинин // Генетика. – 1994. – Т. 30, № 7. – С. 999–1004.
5. Замалетдинов Р.И. Экология земноводных в условиях большого города (на примере г. Казани): автореф. дис. ... канд. биол. наук. [Текст]. – Казань, 2003. – 24 с.



6. Захаров В.М. Онтогенез и популяция (стабильность развития и популяционная изменчивость) [Текст] / В.М. Захаров // Экология. – 2001. – № 3. – С. 164-168.
7. Здоровье среды: методика оценки / В.М. Захаров, А.С. Баранов, В.И. Борисов [и др.]. – М.: Центр экологической политики России, 2000. – 68 с.
8. Калаев В.Н., Игнатова И.В., Климова Н.В. Частота встречаемости эритроцитов с микроядрами в крови перепела японского (*Coturnixjaponica*) при разных способах окрашивания // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10-4. – С. 770-775.
9. Камкина И.Н. Проблемы адаптации амфибий в условиях повышенных техногенных нагрузок [Текст] / И.Н. Камкина // Биосфера и человечество: сборник материалов конференции молодых ученых памяти Н.В. Тимофеева-Ресовского (Екатеринбург, 24–28 апреля 2000 г.). – Екатеринбург, 2000. – С. 122–123.
10. Кулаичев А.П. Методы и средства комплексного анализа данных [Текст] / А.П. Кулаичев. – М.: ФОРУМ: ИНФА-М, 2006. – 512 с.
11. Микроядерный анализ в оценке цитогенетической нестабильности [Текст] / Н.Н. Ильинских, А.С. Ксенц, Е.Н. Ильинских [и др.]. – Томск: НИТГУ, 2011. – 312 с.
12. Мишурина О.А. Комплексные исследования и технологические решения по извлечению марганца из гидротехногенных ресурсов ГОКов Южного Урала [Текст] / О.А. Мишурина, Н.Л. Медяник // Горный информационно-аналитический бюллетень (научно-технический журнал). – 2009. – № 8. – С. 198-203.
13. Пескова Т.Ю. Флуктуирующая асимметрия озерной лягушки и зеленой жабы [Текст] / Т.Ю. Пескова, Т.И. Жукова, Т.С. Величко // Вопросы герпетологии: материалы IV съезда Герпетологического общества имени А. М. Никольского (Санкт-Петербург, 12–17 октября, 2009 г.). – СПб., 2011. – С. 219–223.
14. Романова Е.Б. Видовая специфика гематологических показателей зеленых лягушек урбанизированных территорий [Текст] / Е.Б. Романова, В.Ю. Николаев // Фундаментальные проблемы науки: сборник статей Международной научно-практической конференции (Уфа, 27–28 сентября 2013 г.). – Уфа, 2013. – Ч. 2. – С. 46-50.
15. Романова Е.Б. Оценка состояния популяций зеленых лягушек рода *Rana* по комплексу показателей гомеостаза [Текст] / Е.Б. Романова, О.В. Волкова, М.И. Тихонова // Вестник Нижегородского университета им. НИ Лобачевского. – 2011. – № 2. – С. 119-124.
16. Спирина Е.В. Амфибии как биоиндикационная тест-система для экологической оценки водной среды обитания: автореферат дис. ... канд. биол. наук. [Текст]. – Ульяновск, 2007. – 23 с.
17. Тимченко О.И., Сердюк А.М., Турос О.И. Гигиена окружающей среды: политика, практика, перспективы [Текст] / О.И. Тимченко, А.М. Сердюк, О.И. Турос. – Киев: Пресса

Украины, 2000. – 127 с.

18. Учебная полевая практика по общей геологии на Семилукском полигоне [Текст] / В.Ф. Лукьянов, В.Н. Бунеев, Г.В. Войцеховский [и др.]. – Воронеж: ИПЦ ВГУ, 2008. – 92 с.
19. Файзулин А.И. Земноводные как биоиндикаторы состояния окружающей среды в условиях среднего Поволжья: половозрастная структура популяций [Текст] / А.И. Файзулин // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. Специальный выпуск «Безопасность. Технологии. Управление». – 2008. – Вып. 9. – С. 271–274.
20. Файзулин А.И. Эколого-фаунистический анализ земноводных Среднего Поволжья и проблемы их охраны: автореферат дис. ... канд. биол. наук. [Текст]. – Тольятти, 2004. – 20 с.
21. Чередниченко О.Г. Оценка генетического статуса озерной лягушки (*Ranaridibunda*) казахстанской части Прикаспийского региона с помощью микроядерного теста [Текст] / О. Г. Чередниченко, А.Л. Пилюгина, Е.Г. Губицкая // Экологические и эволюционные механизмы структурно-функционального гомеостаза живых систем: Мат. XIV Международной научно-практической экологической конференции (Белгород, 4–8 октября 2016 г.). – Белгород: ИД «Белгород» НИУ «БелГУ», 2016. – С. 84-87.
22. Чубинишвили А.Т. Гомеостаз развития в популяциях озерной лягушки (*Ranaridibunda* Pall.), обитающих в условиях химического загрязнения в районе Средней Волги [Текст] / А.Т. Чубинишвили // Экология. – 1998. – № 1. – С. 71–74.