

УДК 504.45:575.224.46.044

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ СОИ ДЛЯ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ВОДОТОКОВ УРБАНИЗИРОВАННЫХ ТЕРРИТОРИЙ

Быковская Н.В., Шишлова М.А., Шишлова Т.М.

Филиал ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет» (Школа педагогики),
Уссурийск, e-mail: shishlova1@rambler.ru

Тяжёлые металлы считаются в настоящее время одними из приоритетных загрязнителей окружающей среды. Опасным проявлением биологической активности тяжелых металлов по отношению к живым организмам является генотоксичность. Специальные тест-системы могут определить скрытое генетическое влияние загрязнителей. Данное исследование содержит информацию об изучении зависимости генотоксической (рекомбиногенной и мутагенной) активности пресной воды водотоков г. Уссурийска Приморского края от степени её загрязнения тяжёлыми металлами, а именно свинцом (Pb), кадмием (Cd), цинком (Zn), никелем (Ni) и медью (Cu). Для оценки рекомбинантной и мутагенной активности воды была использована тест-система «Соматический мозаицизм сои», которая характеризует уровень загрязнения водотоков генотоксикантами. Данная тест-система определяет цитогенетические нарушения, такие как соматический кроссинговер, хромосомные делеции, генные (точковые) мутации, анеуплоидию. Исследования показали, что тестируемая вода содержит генотоксиканты, так как индуцирует цитогенетические нарушения. Установлена цитогенетическая (рекомбиногенная и мутагенная) активность воды из водотоков г. Уссурийска осенью 2018 г. и мутагенная активность весной 2018 г. Повышенное содержание свинца (Pb) и кадмия (Cd) в пробах воды приводит к возникновению одиночных пятен у светло-зелёных растений сои *Glycine max* (L.) в несколько раз по сравнению с контролем. Частота появления пятен в весенних и осенних пробах превышала контроль в 2–4 раза. Выявлена цитогенетическая активность в пробах воды, взятых в центре города. Она связана, возможно, с уровнем её загрязнения тяжёлыми металлами, которые являются мутагенами.

Ключевые слова: биотестирование, тяжёлые металлы, цитогенетическая активность воды, генетическая тест-система «соматический мозаицизм сои»

USE OF A VEGETABLE GENETIC SOYA TEST SYSTEMS FOR EVALUATING THE STATE OF WATERWATERS OF URBANIZED TERRITORIES

Bykovskaya N.V., Shishlova M.A., Shishlova T.M.

Branch of The Far Eastern Federal University (School of pedagogy), Ussuriysk,
e-mail: shishlova1@rambler.ru

Heavy metals are currently considered one of the priority environmental pollutants. A dangerous manifestation of the biological activity of heavy metals in relation to living organisms is genotoxicity. Special test systems can detect the latent genetic effects of pollutants. This study contains information on the study of the dependence of the genotoxic (recombinogenic and mutagenic) activity of fresh water in streams of the city of Ussuriysk in the Primorsky Territory on the degree of its contamination with heavy metals, namely lead (Pb), cadmium (Cd), zinc (Zn), nickel (Ni) and copper (Cu). To assess the recombinant and mutagenic activity of water, the «Somatic mosaicism of the soybean» test-system was used, which characterizes the level of contamination of watercourses with genotoxins. This test-system determines cytogenetic disorders, such as somatic crossing over, chromosomal deletions, gene (point) mutations, aneuploidy. Studies have shown that the tested water contains genotoxins, as it induces cytogenetic disorders. The cytogenetic (recombinogenic and mutagenic) activity of water from the watercourses of Ussuriysk in the fall of 2018 and the mutagenic activity in the spring of 2018 were established. The increased content of lead (Pb) and cadmium (Cd) in the water samples leads to the appearance of single spots in light green soy plants *Glycine max* (L.) several times in comparison with the control. The frequency of spots in spring and autumn samples exceeded the control 2–4 times. Cytogenetic activity was detected in water samples taken in the city center. It is possibly associated with its level of contamination with heavy metals, which are mutagens.

Keywords: biotesting, heavy metals, cytogenetic water activity, genetic test-system «somatic mosaicism of the soybean»

Показателем качества окружающей среды является степень чистоты поверхностных вод. В условиях активной антропогенной деятельности острой проблемой становится загрязнение природных пресных вод тяжёлыми металлами, такими как свинец (Pb), кадмий (Cd), цинк (Zn), никель (Ni), медь (Cu). Они могут поступать в природные воды извне и накапливаться за счёт внутриводоемных процессов. В формировании химического состава природных вод

становится доминирующим антропогенный фактор [1].

Для городов с многопрофильной промышленностью (г. Уссурийск относится к такому типу) характерно наличие в окружающей среде целого ряда тяжёлых металлов, способных оказывать комплексное действие на живой организм, при котором наблюдается суммирование эффектов [2].

Определить концентрацию и токсическое влияние тяжёлых металлов несложно,

тогда как генетическое воздействие можно определить только при помощи тест-систем.

Целью работы стало проведение оценки рекомбиногенной и мутагенной активности речной воды водотоков урбанизированной территории от степени ее загрязнения тяжёлыми металлами (Pb, Cd, Zn, Ni, Cu) с использованием растительной генетической тест-системы сои *Glycine max* (L.).

Материалы и методы исследования

Районом работ выбраны основные водотоки г. Уссурийска (Приморский край) – реки Раковка, Комаровка, Раздольная, которые имеют преимущественно дождевое питание. Пункты отбора проб включали различные районы водотоков (рис. 1). Верховья рек – это самые чистые участки (п. № 1 – верховье р. Комаровка, п. № 3 – верховье р. Раковка). Места интенсивного воздействия предприятий города – п. № 2 и 4 на р. Комаровка и р. Раковка соответственно. На р. Раздольная выбраны два пункта: п. № 5 – до г. Уссурийска (район с. Борисовка, расположенный до вхождения водотока в город) и п. № 6 – после очистных сооружений канализации «Уссурийск-водоканал», район, который характеризует качество речных вод после воздействия города на водоток.

Отбор проб речной воды проходил в весенний и осенний периоды 2018 г. Определение концентраций тяжёлых металлов проходило методом атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией.

Генетическая тест-система «Соматический мозаицизм сои» использовалась для цитогенетического исследования проб речной воды. Эта тест-система характеризуется быстротой анализа, простотой выполнения и пригодна для тестирования наличия различных веществ, находящихся в виде растворов или эмульсий, в газообразном состоянии. Она применяется для учета соматических мутаций в листьях сои *Glycine max* (L.), которая гетерозиготна по гену хлорофилльной недостаточности – $yellow_{11}$ (локализованному в ядерной ДНК), что позволяет дифференцированно регистрировать сразу несколько цитогенетических нарушений, таких как генные мутации (прямые и обратные), индуцированный соматический (митотический) кроссинговер, анеуплоидию и хромосомные aberrации [3]. Прорастая, семена дают расщепление на три фенотипических и генотипических класса: светло-зеленые растения ($Y_{11}Y_{11}$), темно-зеленые растения ($Y_{11}y_{11}$), желтые растения ($y_{11}y_{11}$).

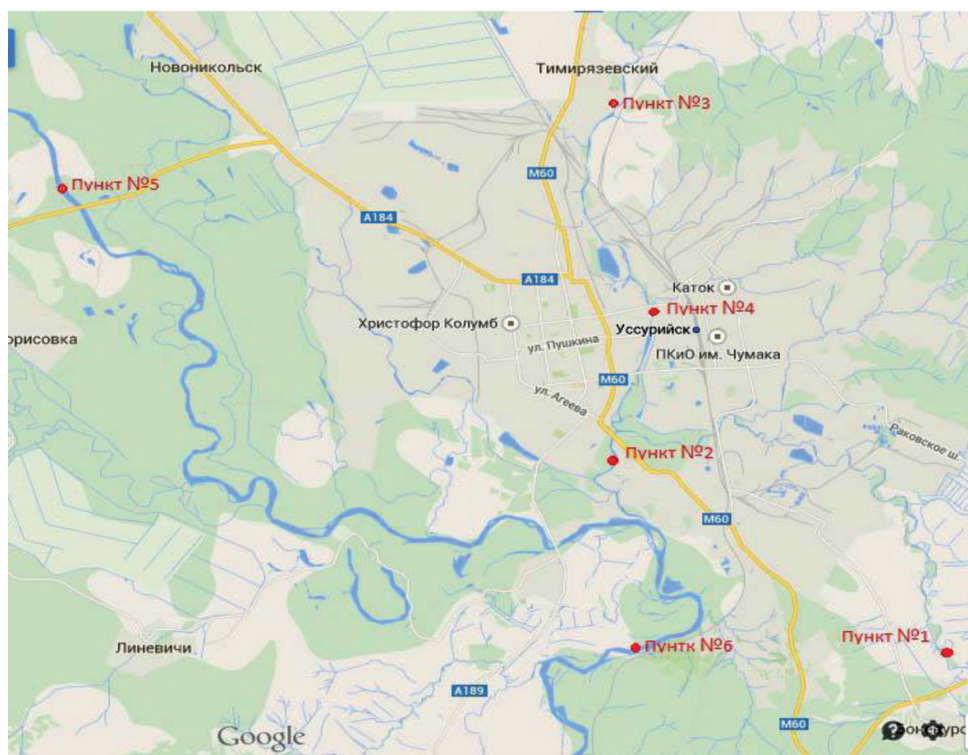


Рис. 1. Схема водотоков г. Уссурийска

Семена сои *Glycine max* (L.) замачивали в течение суток при комнатной температуре в пробах воды, собранных из пунктов № 1–6 водотоков г. Уссурийска, тогда как контрольные семена проходили обработку в дистиллированной воде. Далее семена высеивали, выращивали до раскрытия второго сложного листа. Учет пятен проводили на верхней поверхности двух простых листьев и первого сложного листа [4]. На светло-зеленых растениях образуются три типа пятен: темно-зеленые, желтые и двойные (одна половина пятна желтого, другая – темно-зеленого цвета), тогда как на темно-зеленых и желтых растениях появляются светло-зеленые пятна. Различные виды пятен свидетельствуют о различных типах генных нарушений. Комбинация пятен на листьях растений конкретных генотипов позволяет установить возможный механизм цитогенетических нарушений.

Результаты исследования и их обсуждение

При обсуждении результатов исследований использовали значения предельно до-

пустимых концентраций (ПДК) для водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового назначения [5]. Результаты химического анализа проб речной воды на содержание свинца (Pb), кадмия (Cd), цинка (Zn), никеля (Ni) и меди (Cu) представлены в табл. 1.

Исследование показало, что весенние пробы воды из п. № 1 (верховье р. Комаровки) и весенние пробы воды из п. № 3 (верховье р. Раковки) и из п. № 1 (верховье р. Комаровки), собранные осенью 2018 г., характеризуются самой низкой концентрацией контролируемых металлов.

Речная вода из пунктов, расположенных в центре города (п. № 2, п. № 4), содержала высокие концентрации свинца (Pb), кадмия (Cd), цинка (Zn), никеля (Ni), меди (Cu) в весенних и осенних пробах.

Осенью ($0,0379 \pm 0,0011$ мг/л) и весной ($0,0620 \pm 0,0112$ мг/л) 2018 г. в пробе из п. № 4 зафиксировано значительное увеличение содержания никеля. Осенние пробы воды из пунктов № 2, 3, 5, 6 содержали повышенные концентрации никеля по сравнению с весенними значениями (табл. 1).

Таблица 1

Концентрация металлов в речной воде водотоков г. Уссурийска (мг/л), n = 6

| ПДК, мг/л № пункта | Zn | Cu | Ni | Cd | Pb |
|--------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|--------------------------|
| | 1,0 | 0,1 | 0,1 | 0,01 | 0,1 |
| Весна, 2018 г. | | | | | |
| 1 | $\frac{0,0092}{0,003}$ | $\frac{0,0012}{0,0005}$ | $\frac{0,0012}{0,0004}$ | $\frac{0,000047}{0,00002}$ | $\frac{0,00200}{0,0011}$ |
| 2 | $\frac{0,0209}{0,007}$ | $\frac{0,0029}{0,0008}$ | $\frac{0,0167}{0,0050}$ | $\frac{0,000239}{0,00008}$ | $\frac{0,00418}{0,0015}$ |
| 3 | $\frac{0,0159}{0,006}$ | $\frac{0,0017}{0,0007}$ | $\frac{0,0116}{0,0035}$ | $\frac{0,000149}{0,00005}$ | $\frac{0,00287}{0,0010}$ |
| 4 | $\frac{0,0212}{0,007}$ | $\frac{0,0031}{0,0012}$ | $\frac{0,0379}{0,0011}$ | $\frac{0,000212}{0,00007}$ | $\frac{0,00346}{0,0012}$ |
| 5 | $\frac{0,0201}{0,007}$ | $\frac{0,0022}{0,0009}$ | $\frac{0,0021}{0,0003}$ | $\frac{0,000100}{0,00004}$ | $\frac{0,00152}{0,0005}$ |
| 6 | $\frac{0,0176}{0,006}$ | $\frac{0,0026}{0,0010}$ | $\frac{0,0021}{0,0006}$ | $\frac{0,000094}{0,00003}$ | $\frac{0,00144}{0,0005}$ |
| Осень, 2018 г. | | | | | |
| 1 | $\frac{0,0098}{0,003}$ | $\frac{0,0007}{0,0003}$ | $\frac{0,0011}{0,0002}$ | $\frac{0,000030}{0,00001}$ | $\frac{0,00135}{0,0005}$ |
| 2 | $\frac{0,0108}{0,004}$ | $\frac{0,0027}{0,0011}$ | $\frac{0,0252}{0,0008}$ | $\frac{0,000200}{0,00003}$ | $\frac{0,00315}{0,0002}$ |
| 3 | $\frac{0,0111}{0,004}$ | $\frac{0,0010}{0,0006}$ | $\frac{0,0021}{0,0006}$ | $\frac{0,000120}{0,00003}$ | $\frac{0,00250}{0,0002}$ |
| 4 | $\frac{0,0144}{0,005}$ | $\frac{0,0022}{0,0009}$ | $\frac{0,0620}{0,0112}$ | $\frac{0,000200}{0,00010}$ | $\frac{0,00278}{0,0002}$ |
| 5 | $\frac{0,0080}{0,003}$ | $\frac{0,0014}{0,0006}$ | $\frac{0,0024}{0,0007}$ | $\frac{0,000100}{0,00010}$ | $\frac{0,00140}{0,0002}$ |
| 6 | $\frac{0,0117}{0,004}$ | $\frac{0,0012}{0,0005}$ | $\frac{0,0025}{0,0008}$ | $\frac{0,000070}{0,00003}$ | $\frac{0,00130}{0,0002}$ |

Примечание: в числителе – среднее значение, в знаменателе – отклонение от среднего значения.

Пробы воды, взятые из п. № 1 (верховье р. Комаровки) и из п. № 3 (верховье р. Раковки) весной 2018 г., а также из п. № 1 (верховье р. Комаровки) осенью 2018 г., не обладали цитогенетической активностью (табл. 2, рис. 2).



Рис. 2. Расщепление по фенотипу

Весенние пробы воды из п. № 4 и осенние пробы из п. № 2, 3 и 5 вызывают увеличение частоты прямых мутаций в 2–3 раза, а пробы воды из пунктов № 4 и 6 – в 3,1–

3,7 раза по сравнению с контролем, что фенотипически проявлялось в виде светло-зелёных пятен у тёмно-зелёных растений сои [6].

Частота обратных мутаций, которая увеличивается под действием веществ, содержащихся в пробах воды из п. № 4. Фенотипически это проявляется в виде светло-зелёных пятен на листьях жёлтых растений. Были выявлены пятна без чётких границ у жёлтых растений, что объясняет их связь с изменениями хлоропластной ДНК (рис. 2).

Двойные пятна на листьях гетерозиготных светло-зелёных растений сои *Glycine max* (L.) являются показателем соматического кроссинговера. Была установлена индукция двойных пятен у светло-зелёных растений пробами воды, взятыми из пунктов № 2, 4, 5 осенью 2018 г.

Отметим, что осенние пробы воды, взятые из п. № 4, индуцировали все типы пятен у светло-зелёных растений гетерозиготной сои, вызывая трёхкратную индукцию одиночных пятен. Таким образом, эти пробы воды проявляют весь регистрируемый спектр нарушений (соматический кроссинговер, генные, хромосомные и геномные мутации) [7].

Таблица 2

Индукция соматического мозаицизма на листьях сои *Glycine max* (L.)

| № пункта | Эффект появления пятен | | | | | Механизм |
|----------------|---------------------------------|--------------|---------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| | Y _{II} y _{II} | | | Y _{II} Y _{II} | y _{II} y _{II} | |
| | тёмно-зелёные пятна | жёлтые пятна | двойные пятна | светло-зелёные пятна | светло-зелёные пятна | |
| Весна, 2018 г. | | | | | | |
| 1 | — | — | — | — | — | — |
| 2 | — | ± | — | ± | — | ТМ, АП, ХА |
| 3 | — | — | — | — | — | |
| 4 | ± | ± | — | — | — | АП, ХА |
| 5 | — | ± | — | — | — | ХА, АП |
| 6 | — | ± | — | — | — | ХА, АП |
| Осень, 2018 г. | | | | | | |
| 1 | — | — | — | — | — | — |
| 2 | ± | ± | ± | ± | — | СК, ХА, АП, ТМ |
| 3 | ± | ± | — | ± | — | ТМ, АП |
| 4 | + | + | ± | ± | ± | СК, ХА, АП, ТМ, хл. ДНК |
| 5 | ± | ± | + | — | — | СК, АП, ХА |
| 6 | + | ± | — | ± | — | ТМ, АП |

Примечание:

«+» – индукция более чем трёхкратная;

«±» – индукция слабая (двух-трёхкратная);

«–» – не наблюдается эффект;

АП – проявляется анеуплоидия;

СК – наблюдается соматический кроссинговер;

ТМ – проявляются точковые мутации;

ХА – наблюдаются хромосомные aberrации;

хл. ДНК – выявляются изменения в хлоропластной ДНК.

Осенние пробы воды, взятые из п. № 2, индуцировали все типы пятен, исключая светло-зелёные пятна у жёлтых растений. Были выявлены двойные пятна у светло-зелёных растений, которые доказывают возникновение соматического кроссинговера и одиночные пятна у светло-зелёных растений, которые могут возникать в результате соматического кроссинговера, хромосомных аберраций, геномных мутаций (анеуплоидии) и генных (точковых) мутаций (табл. 2). Предполагаемые механизмы подтверждаются также наличием светло-зелёных пятен у тёмно-зелёных растений сои.

Выводы

В результате цитогенетического исследования установлена мутагенная и рекомбиногенная активность воды из пунктов № 2, 4, 5, взятой в осенний период, и мутагенная активность из п. № 6. Слабая мутагенная активность речной воды наблюдалась в весенних пробах из пунктов № 2, 4, 5, а также в осенней пробе из № 3.

Частота появления пятен у растений сои, обработанных весенними пробами воды, превышала контроль в 2–3 раза, тогда как осенними пробами – в 2–4 раза.

В пунктах № 2 и 4 (в центре города) установлена цитогенетическая активность речной воды, связанная с локальным загрязнением рек тяжёлыми металлами, так как большинство из них являются мутагенами. Даже на уровне одной ПДК меди, никеля, цинка показали слабое мутагенное и рекомбиногенное действие на тест-системе сои *Glycine max* (L.). Таким образом, тестируемая вода рек урбанизированной территории, которая содержит генотоксиканты (тяжёлые металлы), индуцирует цитогенетические нарушения у растений гетерозиготной сои.

Список литературы

1. Хоменушко Т.И., Русак С.Н., Куриленко М.И. Оценка содержания тяжёлых металлов в поверхностных водах малых водных объектов севера России // Вода: химия и экология. 2019. № 1–2 (118). С. 9–14.
2. Khomenushko T.I., Rusak S.N., Kurilenko M.I. Assessment of heavy metals content in surface waters of small water bodies of northern Russia // Water: chemistry and ecology. 2019. № 1–2 (118). P. 9–14 (in Russian).
3. Быковская Н.В., Шишлова Т.М., Шишлова М.А. Цитогенетическая активность речной воды водотоков г. Уссурийска (Приморский край) // Проблемы региональной экологии. 2015. № 2. С. 107–110.
4. Bykovskaya N.V., Shishlova T.M., Shishlova M.A. Cytogenetic activity of river water of watercourses of Ussuriisk (Primorsky Territory) // Problems of regional ecology. 2015. № 2. P. 107–110 (in Russian).
5. Vig B.K. Soybean (*Glycine max* (L.) merill) as a short-term assay for study of environmental mutagens: A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program // Mutation Research. 1982. V. 99. P. 339–347.
6. Реутова Н.В. Мутагенный потенциал ряда тяжёлых металлов // Экологическая генетика. 2015. Т. 13. № 3. С. 70–75.
7. Reutova N.V. Mutagenic potential of a number of heavy metals // Ecological genetics. 2015. V. 13. № 3. P. 70–75 (in Russian).
8. Гигиенические требования к охране поверхностных вод: СанПиН 2.1.5.980-2000. – Введ. 01.01.2001. М.: Стандартинформ. 2001. 18 с.
9. Hygienic requirements for surface water protection: SanPiN 2.1.5.980-2000. 01.01.2001. M.: Standartinform. 2001. 18 p. (in Russian).
10. Биттуева М.М. Оценка эффективности растительного теста по учёту соматических мутаций в листьях сои *Glycine max* (L.) merill // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 6. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25810> (дата обращения: 20.03.2020).
11. Bittueva M.M. Evaluation of the effectiveness of a plant test taking into account somatic mutations in soybean leaves *Glycine max* (L.) merill // Modern problems of science and education. 2016. № 6. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25810> (дата обращения: 20.03.2020) (in Russian).
12. Реутова Н.В. Исследование мутагенного потенциала тяжёлых металлов с использованием сои (*Glycine max* (L.) merill) линии T219 // Известия Кабардино-Балкарского научного центра РАН. 2012. № 2 (46). С. 140–144.
13. Reutova N.V. Study of the mutagenic potential of heavy metals using soybean (*Glycine max* (L.) merill) line T219 // News of Kabardino-Balkan Scientific Center of RAS. 2012. № 2 (46). P. 140–144 (in Russian).