

Биомониторинг генотоксичности окружающей среды г. Ростова-на-Дону с использованием *Pylaisia polyantha*

Г.В.Омельченко, Т.В.Вардуни, Е.И.Шиманская, В.А.Чохели, А.А.Вьюхина

Для оценки генотоксичности окружающей среды урбанизированных экосистем целесообразно использовать показатели гено- и цитотоксичности экстракта пилезии многоцветковой. Гено- и цитотоксичность экстракта можно оценить по уровню aberrаций хромосом, а также по показателям митотического индекса в корневой меристеме гороха посевного, пророщенного на экстракте пилезии многоцветковой. При использовании показателей гено- и цитотоксичности в условиях урбанизированной экосистемы следует говорить о генотоксичности окружающей среды в случае статистически значимых отличий этих показателей от контроля.

Введение

Антропогенное воздействие на урбанизированные экосистемы приобретает все более масштабный характер, а токсические вещества, обладающие мутагенным эффектом и попадающие в окружающую среду, представляют собой реальную угрозу стабильности геномов живых организмов [1-4].

Разработка эффективных методов биомониторинга позволяет не только повысить объективность оценки генотоксичности окружающей среды, но и прогнозировать и моделировать развитие ситуации в урбанизированных экосистемах. Биотестирование с использованием растений получило широкое распространение [5-14]. Эпифитные мхи, к числу которых относится пилезия многоцветковая (*Pylaisia polyantha*), эффективно используются для оценки качества атмосферного воздуха, при этом, как правило, определяют содержание тяжелых металлов и радионуклидов в

пробах мха. Вид пилезия многоцветковая (*Pylaisia polyantha*) имеет продолжительный жизненный цикл, высокие аккумуляционные способности.

В результате аккумуляции мутагенных веществ, экстракт пилезии многоцветковой, собранной на различных площадках урбоэкосистемы, может демонстрировать свойства гено- и цитотоксичности.

В связи с этим, целью данного исследования было проведение биомониторинга урбанизированной экосистемы (г. Ростов-на-Дону) на основе показателей гено- и цитотоксичности экстракта пилезии многоцветковой.

Методы исследования

В многолетнем мониторинге была оценена способность экстракта пилезии многоцветковой (*Pylaisiapolyantha*), произрастающей на исследуемых площадках г. Ростова-на-Дону, индуцировать абберации хромосом в корневой меристеме гороха посевного (*Pisums ativum*), используемого в качестве модельного объекта. Исследования проводились на протяжении 3-х лет (2010-2012 гг.).

Пробы мха собирали с 10 площадок г. Ростова-на-Дону (на каждой площадке пробы мха собирали с коры 10 деревьев тополя дельтовидного) (рис.1).

Для приготовления экстракта пилезии многоцветковой (*Pylaisia polyantha*) к 10 г измельченного сырого веса мха добавляли 20 мл экстрагента и 0,5 часа интенсивно перемешивали на магнитной мешалке. Затем пробы фильтровали последовательным фильтрованием через серию фильтров с различным диаметром пор (последний фильтр –0,2мкм).

Всего было проанализировано 33 000 анафаз корневой меристемы гороха посевного (*Pisum sativum*).

Семена гороха (*Pisum sativum,L.*, сорт Комет) проращивали на дистиллированной воде, или на экстракте пилезии многоцветковой до достижения длины корешков 1,5-2 см. Фиксировали корневую меристему в ацетаталкогольном-фисаторе Кларка (смесь спирта и уксусной кислоты 3:1).

Материал хранился в холодильнике (при $t=4C^0$ не более семи дней). Для окрашивания корешки переносились в колбу с красителем и нагревались в кипящей бане 12 минут, после чего выдерживались еще 12 часов при комнатной температур, а затем помещались в раствор 45% уксусной кислоты. Приготовление давленных препаратов осуществлялось по стандартной методике (Гостимский, 1974). Учёт aberrаций хромосом в апексах корешков гороха проводили на стадии анафаз. В ходе анафазного анализа регистрировали следующие aberrации хромосом:

- одиночные хромосомные / хроматидные фрагменты;
- множественные фрагменты;
- хромосомные / хроматидные мосты;
- множественные aberrации
- отставания

Цитотоксичность экстракта пилезии многоцветковой оценивали по изменению митотической активности клеток корневой меристемы гороха посевного. Митотический индекс (МИ) определяют по формуле:

$$МИ = \frac{П+М+A+T}{П+М+A+T+И} 100\%$$

где П — количество клеток, находящихся на стадии профазы; М — количество клеток, находящихся на стадии метафазы; А — количество клеток, находящихся на стадии анафазы; Т — количество клеток, находящихся на стадии телофазы; И — неделящиеся клетки, находящиеся на стадии интерфазы (Алов, 1965).

Статистическую обработку данных проводили по критерию Стьюдента.

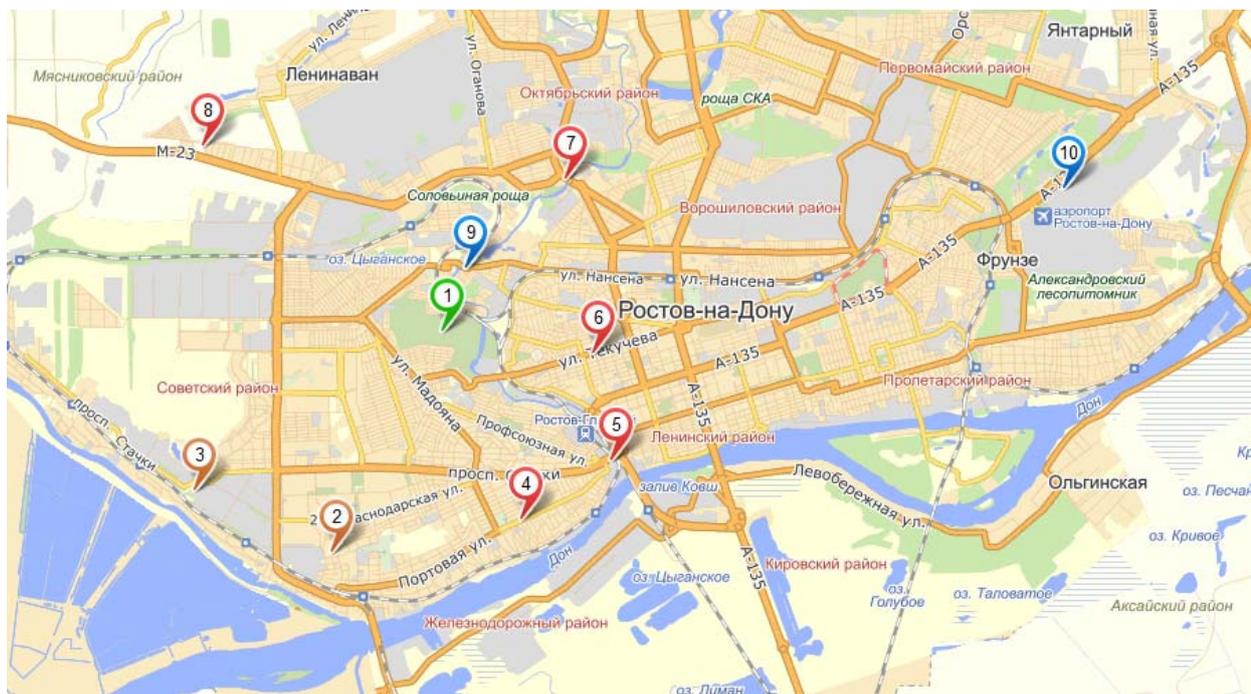


Рис.1. Карто-схема расположения площадок биомониторинга

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. Буденовский, пер. Доломановский/ул. Текучева и Мечникова; пл. 7 - ул. Вавилова; пл. 8 - ул. Таганрогское шоссе); **Парковая зона** (пл. 1 относительный контроль - Ботанический сад)

Результаты и их обсуждение

В таблицах 1-3 представлены результаты оценки гено- и цитотоксичности экстракта пилезии многоцветковой, собранной на различных площадках г. Ростова-на-Дону в 2010-2012 гг.

Таблица 1

Уровень aberrаций хромосом в корневой меристеме гороха посевного (*Pisum sativum L*), пророщенного на экстракте пилезии многоцветковой (*Pylaisia polyantha*) исследуемых площадок г. Ростова-на-Дону (2010 г.)

Площадка	Всего анафаз	Частота aberrантных анафаз(%)	Типы aberrаций хромосом*			
			(%)	A	B	C
фоновая	1000	0,7 ±0,26	15	35	20	30

1 (относительный контроль)	1000	1,3±0,36*	12,5	35,9	-	31,3
2	1000	2,0±0,44**	12,5	41,7	-	26,4
3	1000	2,4± 0,48**,+	12,0	21,9	27,8	29,3
4	1000	3,8±0,6****,+	15,39	38,46	46,15	-
5	1000	3,9±0,61****,+	18,75	25	31,25	25
6	1000	2,5±0,49**,+	25,6	25,6	27,3	13,7
7	1000	3,7±0,59****,+	10	20	50	20
8	1000	3,0±0,54****,+	22,7	19,3	32,2	25,8
9	1000	2,3±0,47**	12,5	25	25	37,5
10	1000	3,4±0,57****,+	17,1	25,2	30,1	22,7

*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;

А-хромосомные и хроматидные мосты, В-одиочные фрагменты, С-множественные фрагменты, D-отставания

Автотранспортная зона: (№№9 - Змиевский проезд, 10 – пр. Шолохова); **Промышленная зона:**(№№2-ТЭЦ; 3 – ТЭЦ 2, ОАО ГПЗ – 10); **Зоны, сочетающие промышленную и автотранспортную нагрузки**№№ 4 –ул.Портовая, 5 ул. Сиверса; 6 - пр.Буденовский, пер. Доломановский/ул. ТекучеваиМечникова; 7 - ул. Вавилова; 8 - ул. Таганрогское шоссе; **Парковая зона**(№ 1 относительный контроль - Ботанический сад)

Таблица 2

Уровень aberrаций хромосом в корневой меристеме гороха посевного (*Pisum sativum L.*), пророщенного на экстракте пилезии многоцветковой (*Pylaisia polyantha*) исследуемых площадок г. Ростов-на-Дону (2011 г.)

Площадка	Всего анафаз	Частота aberrантных анафаз(%)	Типы aberrаций хромосом*				
			(%)				
			А	В	С	Д	Е
фоновая	1000	0,7 ± 0,26	12	25	25	25	13
1 (относительный контроль)	1000	1,4 ± 0,37*	12,5	35,9	-	31,3	20,3
2	1000	2,1 ± 0,45**	12,5	41,7	-	26,4	19,4
3	1000	2,5 ± 0,49**,+	12,0	21,9	27,8	29,3	9,0
4	1000	3,8 ± 0,6***,++	15,39	38,46	46,15	-	-
5	1000	4,0 ± 0,62***,++	18,75	25	31,25	25	-
6	1000	2,7 ± 0,51**,+	25,6	25,6	27,3	13,7	7,8
7	1000	3,9 ± 0,61***,++	10	20	50	20	-
8	1000	3,0 ± 0,54***,+	15,1	30,5	10,9	23,5	20
9	1000	2,2 ± 0,46**	12,5	25	25	37,5	-
10	1000	3,4 ± 0,57***,++	17,1	25,2	30,1	22,7	4,9

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

А-хромосомные и хроматидные мосты, В-одиочные фрагменты, С-множественные фрагменты, D-отставания

Автотранспортная зона: (№№9 - Змиевский проезд, 10 – пр. Шолохова); **Промышленная зона:**(№№2-ТЭЦ; 3 – ТЭЦ2, ОАО ГПЗ – 10); **Зоны, сочетающие промышленную и автотранспортную нагрузки**№№4 –ул.Портовая, 5 ул. Сиверса; 6 - пр.Буденовский, пер. Доломановский/ул. ТекучеваиМечникова; 7 - ул. Вавилова; 8 - ул. Таганрогское шоссе; **Парковая зона**(№1 относительный контроль - Ботанический сад)

Таблица 3

Уровень aberrаций хромосом и величина митотического индекса в корневой меристеме гороха посевного (*Pisum sativum L*), пророщенного на экстракте пилезии многоцветковой (*Pyralisia polyantha*) исследуемых площадок г. Ростов-на-Дону 2012 г.)

Площадка	Всего анафаз	Частота aberrантных анафаз(%)	Типы aberrаций хромосом*				
			(%)				
			А	В	С	Д	Е
фоновая	1000	0,7 ±0,26	5	18	28	27	22
1 (относительный контроль)	1000	1,5±0,38**	17	30,1	7	20,5	25,4
2	1000	2,2±0,46**	15,7	47,2	22,1		15
3	1000	2,6±0,5***,+	38,9	18,8		28,2	14,1
4	1000	4,1±0,63***,++	28,4	32,8	26	5,3	6,5
5	1000	4,1±0,63***,++	40,9		39,1	20	
6	1000	2,8±0,52***,+	27,8	28,3	32,3		11,6
7	1000	3,9±0,61***,++	12,6	55	18,4	14	
8	1000	3,0±0,54***,+	52	48			

9	1000	2,4±0,48**	15	20	30		35
10	1000	3,6±0,59***,+	25	12	15	28	20

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

А-хромосомные и хроматидные мосты, В-одиочные фрагменты, С-множественные фрагменты, D-отставания

Автотранспортная зона: (№№9 - Змиевский проезд, 10 – пр. Шолохова); **Промышленная зона:**(№№2-ТЭЦ; 3 – ТЭЦ2, ОАО ГПЗ – 10); **Зоны, сочетающие промышленную и автотранспортную нагрузки** №№ 4 – ул. Портовая, 5 ул. Сиверса; 6 - пр. Буденовский, пер. Доломановский/ул. Текучева и Мечникова; 7 - ул. Вавилова; 8 - ул. Таганрогское шоссе; **Парковая зона**(№ 1 относительный контроль - Ботанический сад)

Экстракт пилезии многоцветковой исследуемых площадок г. Ростова-на-Дону индуцировал уровень аберраций хромосом, достоверно превышающий контрольные и фоновые значения. Наибольший процент аберраций хромосом на протяжении трех лет исследования индуцировал экстракт пилезии многоцветковой в Ленинском, Железнодорожном, Октябрьском районах. Минимальное превышение уровня аберраций хромосом по сравнению с точкой относительного контроля достигало 1,5 раз, максимальное – 3 раза. Превышение фоновых значений составило от 2,1 до 7 раз. Показатели уровня аберраций хромосом в различных точках на протяжении 3-х лет исследования оставались стабильными.

На рисунках 1-3 представлены спектры аберраций хромосом в корневой меристеме гороха посевного, пророщенного на экстракте пилезии многоцветковой (*Pylaisia polyantha*) исследуемых площадок г. Ростова-на-Дону в 2010-2012 гг.

Спектр aberrаций за 2010

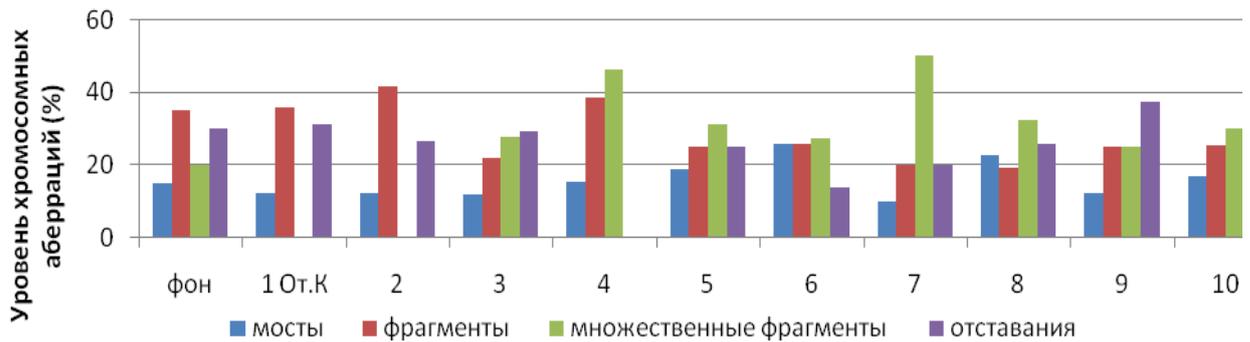


Рис.11. Спектр aberrаций хромосом в корневой меристеме гороха посевного, пророщенного на экстракте пилезии многоцветковой (*Pylaisiapolyantha*) (2010 г.)

Спектр aberrаций за 2011

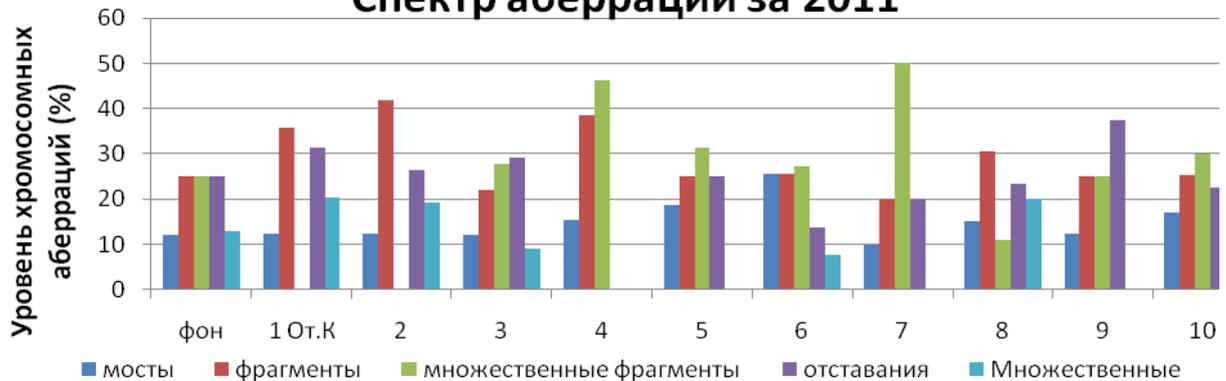


Рис.2. Спектр aberrаций хромосом в корневой меристеме гороха посевного, пророщенного на экстракте пилезии многоцветковой (*Pylaisiapolyantha*) (2011 г.)

Спектр aberrаций за 2012

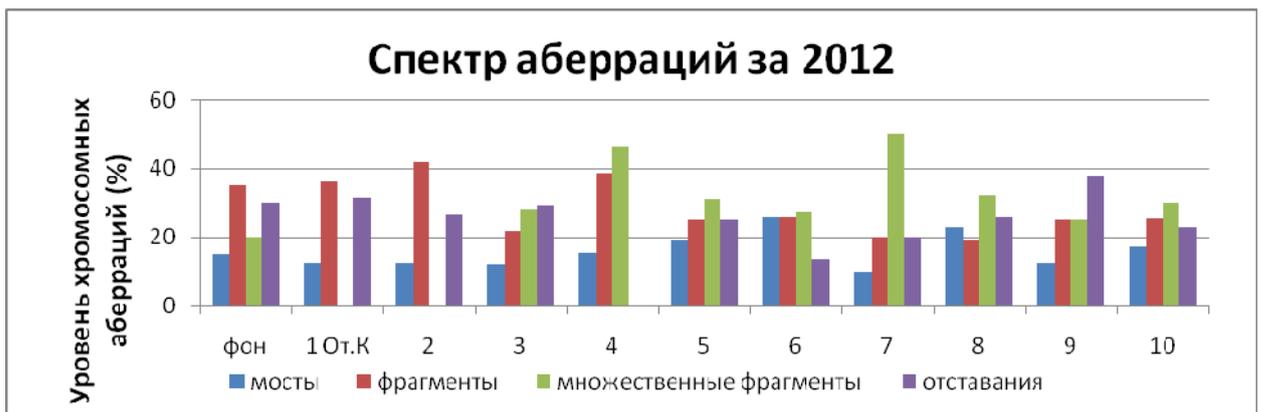
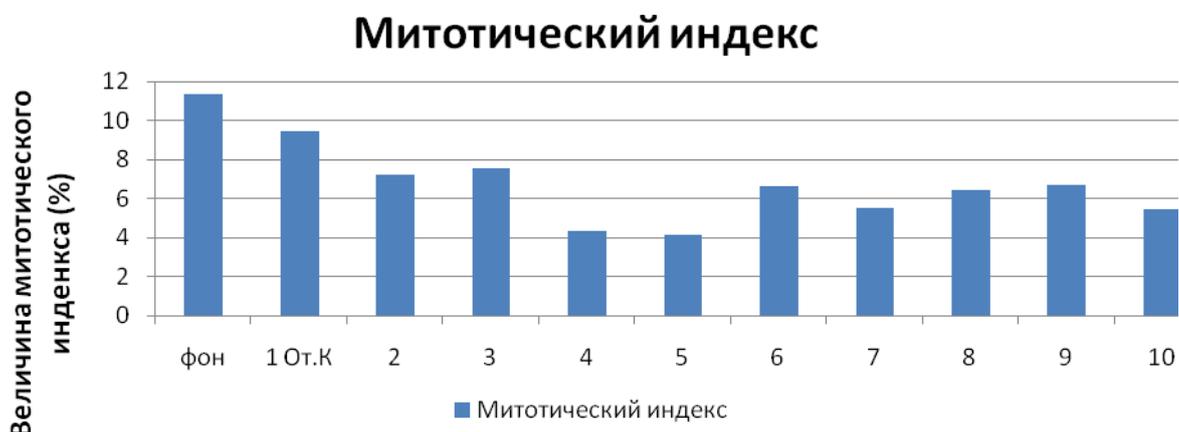


Рис.3. Спектр aberrаций хромосом в корневой меристеме гороха посевного, пророщенного на экстракте пилезии многоцветковой (*Pylaisiapolyantha*) (2012 г.)

Автотранспортная зона: (№№9 - Змиевский проезд, 10 – пр. Шолохова); **Промышленная зона:**(№№2-ТЭЦ; 3–ТЭЦ2, ОАО ГПЗ–10); **Зоны, сочетающие промышленную и автотранспортную нагрузки**№№4 –ул.Портовая, 5 ул. Сиверса; 6 - пр.Буденовский, пер. Доломановский/ул. ТекучеваиМечникова; 7 - ул. Вавилова; 8 - ул. Таганрогское шоссе; **Парковая зона**(№1 относительный контроль - Ботанический сад)

При анализе спектра aberrаций хромосом в корневой меристеме гороха посевного особое внимание было уделено районам г. Ростова-на-Дону, где пробы пилезии многоцветковой показали наибольшую степень генотоксичности. Так, в Ленинском районе в 2010-2011 гг. стабильно встречались множественные и одиночные фрагменты, а также отставания. В 2012 г. к этому списку добавились мосты, количество которых достоверно превышало количество всех других типов aberrаций хромосом. В Железнодорожном районе в 2010-2011 гг. наибольший процент aberrаций хромосом приходился на одиночные и множественные фрагменты, а в 2012 г. увеличилось количество мостов. В Октябрьском районе на протяжении 3-х лет стабильно встречались множественные и одиночные фрагменты, отставания и мосты. В 2012 г. увеличилось количество одиночных фрагментов.

Оценка цитотоксического эффекта экстракта пилезии многоцветковой проводилась в 2012 г. (рис. 4)



Относительная ошибка не превышала 7% для $P < 0,01$

Рис.15. Показатели митотического индекса в корневой меристеме гороха пророщенного на экстракте пилезии многоцветковой (*Pyralisia polyantha*) исследуемых площадок г. Ростов-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. Буденовский, пер. Доломановский/ул. Текучева и Мечникова; пл. 7 - ул. Вавилова; пл. 8 - ул. Таганрогское шоссе); Парковая зона (пл. 1 относительный контроль - Ботанический сад)

Снижение показателей митотического индекса в корневой меристеме гороха в опыте по сравнению с контролем говорит о наличие цитотоксического эффекта гомогената пилезии многоцветковой. Наибольшее угнетение митоза характерно для проб из Ленинского, Железнодорожного и Первомайского районов.

Выводы

Гено- и цитотоксический эффект пилезии многоцветковой, как результат аккумуляции мутагенных факторов из атмосферного воздуха и атмосферных осадков, является объективным показателем, отражающим генотоксическую опасность анализируемых площадок. Использование данного показателя при многолетнем биомониторинге позволяет получить важную информацию о мутагенной опасности атмосферного воздуха районов исследований, может осуществляться с любой периодичностью.

Максимальный цито- и генотоксический эффект экстракта пилезии многоцветковой зафиксирован в зонах г. Ростова-на-Дону, сочетающих промышленную и автотранспортную нагрузки.

Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (14.515.11.0055).

Литература

1. Капралова О.А. Влияние урбанизации на эколого-биологические свойства почв г.Ростова-на-Дону [Электронный ресурс] // Инженерный Вестник Дона. - 2011. №4. - Режим доступа: <http://www.ivdon.ru/magazine/archive/n4y2011/594> (доступ свободный) – Загл. с экрана. – Яз. рус.
2. Зерщикова М.А. Последствия загрязнения окружающей среды и их влияние на экономические показатели (методы сохранения и

- улучшения состояния окружающей среды) [Электронный ресурс] // Инженерный Вестник Дона. - 2011. № 1. - Режим доступа: <http://www.ivdon.ru/magazine/archive/n1y2011/326> (доступ свободный) – Загл. с экрана. – Яз. рус.
3. Manning, W. J., Feder, W. A., Biomonitoring air pollutants with plants [Текст] // Applied Science Publishers Ltd., London, 1980, pp 1-135.
 4. Mehran Hoodaji, Mitra Ataabadi and Payam Najafi. Biomonitoring of Airborne Heavy Metal Contamination [Электронный ресурс] // Air Pollution - Monitoring, Modelling, Health and Control, 21, March, 2012. Режим доступа: <http://www.intechopen.com/books/air-pollution-monitoring-modelling-health-and-control/biomonitoring-of-airborne-heavy-metal-contamination> (доступ свободный) – Загл. с экрана. – Яз. англ.
 5. Гуськов Е. П. Шкурат Т. П., Вардуни Т. В. Тополь как объект для мониторинга мутагенов в окружающей среде [Текст] // Цитология и генетика. 1993.- Т. 27, № 1. – С. 52- 55.
 6. Гуськов Е. П., Вардуни Т. В., Шкурат Т. П., Милютин Н. П., Мирзоян А.В. Свободно-радикальные процессы и уровень aberrаций хромосом в листьях древесных растений как тест-система на генотоксичность городской среды [Текст] // Экология. 2000.- №4. – С. 270-275.
 7. Буторина А.К., Калаев В.Н. Анализ чувствительности различных критериев цитогенетического мониторинга *Zebrina pendula Schnizl* [Текст] // Экология.- 2000.- N3.- С.206-210.
 8. Мануйлов И. М., Багдасарян А. С. Использование растительных тест—объектов для изучения влияния недифференцированных мутагенов [Текст] // Материалы межрегиональной научно—практической «Образование, здоровье и культура в начале XXI века». —Ставрополь, 2004.-С . 100—102.
 9. Неверова О. А., Николаевский В. С. Лихенометрический способ индикации загрязнения атмосферного воздуха урбанизированной

- среды [Текст] // Экология большого города. М.: Прима, 2002. – С. 178–181.
10. Неверова О. А., Колмогорова Е. Ю. (а). Ксерофитизация листьев древесных растений как показатель загрязнения атмосферного воздуха (на примере г. Кемерово) [Текст] // Лесной журн. (Изв. вузов). 2002. № 3. – С. 29–33.
 11. Королева Ю. В. Биоиндикация атмосферных выпадений тяжелых металлов на территории Калининградской области [Текст] // автореф. Дис., 2009. – С. 157.
 12. Белоусов М.В. Влияние тяжелых металлов на цитогенетическую изменчивость сосны обыкновенной. [Текст] // автореф. дис. канд. Воронеж, 2011.- С 24.
 13. Рыжакова Н.К., Рогова Н.С., Борисенко А.Л., Меркулов В.Г. Способ оценки загрязнения атмосферного воздуха тяжелыми металлами и другими химическими элементами с помощью эпифитных мхов. [Текст] // Патент на изобретение № 2463584. Бюл. №28.
 14. Шматова Л. М. Биоиндикация состояния лесных экосистем района опасных техногенных объектов [Текст] // автореферат, 2012. С. 23.