

УДК 504 : 581.5

ОЦЕНКА ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ФЕНОЛФОРМАЛЬДЕГИДСОДЕРЖАЩИХ СТОЧНЫХ ВОД GENOTOXICITY TEST OF PHENOLFORMALDEGIDCONTAINING WASTEWATER

Т.В. Баранова, Воронежский государственный университет, Университетская пл., 1, Воронеж, 394006, Россия, тел. +7 (4732) 51-88-03, e-mail : tanyavostric@rambler.ru

T.V. Baranova, Voronezh State University, University sq., 1, Voronezh, 394006, Russia, tel. +7 (4732) 51-88-03, e-mail : tanyavostric@rambler.ru

Проведено исследование генотоксичности фенолформальдегидсодержащих сточных вод мебельного комбината по цитогенетическим показателям березы повислой (*Betula pendula* Roth). Выявлено повышение числа патологий митоза и значения митотического индекса за счет увеличения количества клеток в стадии профазы, что можно рассматривать как свидетельство действия стрессоров. Отмечено состояние цитогенетической нестабильности и нестабильности генома в клетках корневой меристемы березы повислой на воздействие совокупности химических компонентов сточных вод.

Ключевые слова: сточные воды, генотоксичность, цитогенетические показатели, нестабильность генома, береза повислая.

The study was made about the genotoxicity of phenolformaldegidcontaining wastewater of the furniture factory on the cytogenetic parameters of birch (*Betula pendula* Roth). It has been exposed an increase in the number of mitotic abnormalities, and the mitotic index values by increasing the number of cells in prophase stage, which can be regarded as evidence of the stressors action. It has been noted the status of cytogenetic instability, and genomic instability in the root meristem cells of birch on the aggregate impact of the chemical components of wastewater.

Keywords: wastewater, genotoxicity, cytogenetic parameters, genomic instability, birch.

Вопросам применения сточных вод и образующихся при их нейтрализации осадков в последние годы уделяют все большее внимание. В крупных городах с развитой промышленностью и коммунальным хозяйством резко возрастает водопотребление, увеличиваются объемы сточных вод, следовательно, и количество образующихся при их очистке осадков. Мировое производство осадков сточных вод (ОСВ) оценивается в 20109 т в год [16]. Технология возврата ОСВ в природную среду в качестве дополнительного органического удобрения применяется в мировой практике. С целью утилизации в сельском хозяйстве используется

их значительная часть (до 40—80%) во Франции, США, Польше, Швейцарии и Германии. В отличие от других способов при подобной утилизации отходов промышленного производства не требуется больших затрат. Однако такие мероприятия следует проводить при тщательном изучении и соответствующем режиме. Вопросы использования отходов промышленного производства в качестве дополнительного органического удобрения освещались в работах многих авторов [1, 2, 8, 12, 14, 15]. Некоторые авторы рекомендуют ограничивать употребление осадков сточных вод для удобрения парков, газонов, лубяных культур, а

остальные культуры, за исключением овощных, обрабатывать ими только с разрешения санитарной инспекции и под контролем агрохимической службы. Под овощные культуры осадки не применяют [6].

Известно, что сточные воды деревообрабатывающих предприятий загрязнены токсичным мономером (формальдегидом ПДК=0,01 мг/м). Он содержится в свободном состоянии в отходах клеевых композиций на карбамидформальдегидной и фенолформальдегидной основах. Анализ работ Алипатовой [1, 2] показывает, что формальдегидсодержащие сточные воды мебельных комбинатов экологически безопасно применять для обеззараживания семян сельскохозяйственных культур. Алипатова [1] отмечала увеличение средней длины проростков, высоты и массы надземной части растений, средней длины и числа корней после обработки семян сельскохозяйственных культур осадками сточных вод мебельных и деревообрабатывающих предприятий. Н.В. Давидчук с соавт. [9, 10, 11] при исследовании влияния сточных вод на ростовые показатели использовали их различные разведения и обращали внимание на всхожесть семян, высоту стебля, длину корня. Однако более глубокому изучению действия сточных вод (на клеточном уровне), производимым ими цитогенетическим эффектам, вопросам изменения генетических структур и генотоксичности уделяется недостаточно внимания. Осадки сточных вод содержат разное количество тяжелых металлов, имеющих тенденцию к накоплению в организме и отрицательному действию на него [6].

Наличие в ОСВ более 80% загрязнений органического характера и большого количества бактерий, в т.ч. патогенных, делает их опасными в санитарно-гигиеническом отношении. Поэтому прежде чем рекомендовать ОСВ в качестве органического удобрения, необходимо его тщательно исследовать на все вредные ингредиенты (микробиологию, канцерогены, тяжелые металлы, поверхностно-активные вещества, нефтепродукты и т.д.), с тем чтобы постараться обезвредить их имеющимися доступными способами [12]. Кроме того, необходимо выяснить действие сточных вод на биологические показатели растений и затем, для рекомендации их к использованию в качестве удобрения, сделать прогноз о влиянии на здоровье человека, потребляющего продукцию, выращенную с применением такого удобрения. В связи с этим цель исследования состояла в оценке генотоксичности фенолформальдегидсодержащих сточных вод мебельного комбината по цитогенетическим показателям березы повислой (*Betula pendula* Roth).

В качестве объекта исследования выступали семена березы повислой (*Betula pendula* Roth), собранные в экологически чистом районе. Их замачивали в двух растворах: 1 — в верхней, жидкой части сточной воды, богатой танинами; 2 — в нижней, более тяжелой части сточной воды, содержащей тяжелые металлы. По данным кафедры общей химии ВГЛТА, их содержание в исследуемых сточных водах составляет (мг/л): свинец — 0,31; кобальт — 0,30; кадмий — 0,27; никель — 0,15; железо — 0,1; цинк — 0,06 (60 мкг/л); медь — 0,006 (6 мкг/л). Материалом для цитологического изучения служили корешки проростков семян. Микропрепараты были изготовлены по ранее описанной методике [5]. При исследовании препаратов учитывали общее количество просмотренных клеток на каждом препарате, количество делящихся клеток, находящихся в той или иной стадии митоза, количество патологических митозов (ПМ), количество клеток с остаточными ядрышками (ОЯ). Всего проанализировано свыше 30 тыс. клеток. В пик митотической активности определяли митотический индекс (МИ, %), долю клеток в стадии профазы, долю ПМ, количество клеток с ОЯ от общего числа делящихся клеток. ПМ классифицировали по И.А. Алову [2], с указанными модификациями. Статистическую обработку результатов проводили на ПЭВМ типа IBM PC/AT с использованием статистического пакета программ Stadia.

Критериями оценки генотоксичности выбраны следующие цитогенетические показатели: митотический индекс (МИ), количество ПМ и число клеток с ОЯ в корневой меристеме (частный случай ядрышковой активности). Главной характеристикой этой системы является митотическая активность (МА) — способность клеток к делению, уровень деления клеток. Количественным показателем МА считается митотический индекс (МИ) — отношение числа делящихся к общему количеству клеток. Деление клеток — митоз обычно происходит в меристематических тканях (меристематические — ткани, способные к делению) и имеет 4 стадии: профазу, метафазу, анафазу, телофазу. В норме клетки находятся разное время на каждой из них, поэтому существует определенное процентное соотношение между количеством (долями) клеток на фазах митоза. При воздействии стресса возможны два варианта отклонения от нормы: стимуляция и депрессия МА в зависимости от силы стрессора (химического, физического, климатического и т.д.). Стимуляция МА обычно проявляется при более слабых стрессовых воздействиях по сравнению с депрессией. Возможно проявление эффекта стимуляции МА при синергическом воздействии компонентов, когда значения каждого взятого в отдельности загрязнителя не превышают предельно допустимой концентрации (ПДК). Все это позволяет рассматривать стимуляцию МА достаточно чувствительным критерием. Поэтому МИ — информативная характеристика, значение которого зависит от числа клеток на различных стадиях митоза и времени прохождения клетками этих стадий. Поскольку МИ в определенное время суток у конкретного вида достаточно устойчивый показатель, его изменение может отражать мутагенное действие факторов среды на исследуемые объекты. Экспериментальным путем было показано, что эта характеристика может быть включена в шкалу критериев цитогенетического мониторинга [5]. Следовательно, ее можно использовать и для анализа влияния сточных вод на цитогенетические показатели. Наиболее надежным критерием является учет ПМ. Эта характеристика еще более чувствительна, чем МИ. Совокупность же используемых цитогенетических критериев помогает более полно отслеживать интегральный эффект действия внешних факторов на генетический аппарат клетки.

Кроме того, о постоянстве внутренней среды организма (стабильности гомеостаза) можно судить по совокупности цитогенетических показателей (критериев) при делении соматических клеток: митотической активности, интенсивности метаболизма, которая частично отражена в ядрышковой активности и числе клеток с остаточными ядрышками (ОЯ), количеству патологических митозов (ПМ), т.е. появлению отклонений от нормы (нарушений) в делящихся клетках. Большое значение имеет процентное соотношение клеток на некоторых стадиях митоза, по которому как раз можно определить стимулирующий или ингибирующий эффект, который производят стрессоры на организм — материнские растения и их семенное потомство. Поэтому для более точной характеристики МА рассчитывают МИ с учетом и без учета профазы. Особую роль здесь играет доля клеток в стадии профазы — отношение числа клеток, находящихся на этой стадии, к количеству делящихся клеток. Об активизации синтеза белка может свидетельствовать такой цитогенетический показатель, как число клеток с ОЯ. Их появление — компенсаторный механизм на действие стресса, указывающий на увеличение ядрышковой активности и повышение интенсивности метаболизма. Следствием увеличения ядрышковой активности является более интенсивный биосинтез белка.

Цитогенетические показатели проростков семян березы повислой в опытной и контрольной выборке представлены в табл. При обработке семян раствором №1 МИ (с учетом профазы — 9,1%) был выше, чем в контрольном варианте (7,7%), но статистически это не подтвердилось. Однако доля клеток в стадии профазы достоверно увеличилась по

сравнению с контролем (35,2%), но не на много (48,3%), что можно объяснить менее сильным стрессовым действием верхней части сточной воды, в отличие от осадка. О слабом стрессе также может свидетельствовать небольшое снижение ядрышковой активности, выраженное в уменьшении количества клеток с ОЯ (12,4%) (в контроле — 16,7%). Но при анализе уровня ПМ было выявлено его достоверное увеличение у семенного потомства березы повислой, обработанного раствором №1 (5,3%) по сравнению с контролем (1,7%). Эффект от воздействия верхней части сточной воды на клетки корневой меристемы семян березы можно оценить как идентичный влиянию экологической обстановки слабо загрязненного района. Однако и в этом случае при рассмотрении цитогенетических показателей (МИ, частота и спектр патологий) очевидно состояние нестабильности генома. Верхняя часть исследуемых сточных вод богата танинами, которые создают пленку на поверхности. Можно предположить, что именно танины оказывают стрессовое воздействие на семенное потомство березы, обработанное верхней частью сточных вод.

Сравнительная характеристика цитогенетических показателей в корневой меристеме проростков семян березы повислой						
Образец	МИ, %		Доля клеток в стадии профазы, %	ПМ, %	Число клеток с ОЯ, %	Доля вакуолизированных клеток, %
	С учетом профазы	Без учета профазы				
Контроль	7,7±0,5	5,0±0,5	35,2±2,3	1,7±0,4	16,7±1,9	19,6±2,2
Раствор №1	9,1±0,5	4,7±0,3	48,3±1,8**	5,3±1,1**	12,4±0,9	20,0±1,6
Раствор №2	9,3±0,6*	3,1±0,5*	67,3±3,9**	6,2±1,1**	7,9±1,8**	23,7±1,4*

* P<0,05; ** P<0,01.

Методом сравнительного анализа установлено достоверное повышение МИ (с учетом профазы — 9,3%, P<0,05) при одновременном увеличении доли клеток в стадии профазы (67,3%) у семенного потомства, обработанного раствором №2, т.е. осадочной частью сточной воды (в контроле — 7,7% и 35,2% соответственно). Также отмечается достоверное снижение МИ (без учета профаз — 3,1%, P<0,05) в этом варианте по сравнению с контрольным (5%). Подобный эффект был отмечен нами при исследовании действия антропогенных загрязнителей на семенное потомство березы повислой в промышленно загрязненном районе. Под воздействием внешних факторов происходила задержка клеток в стадии профазы, увеличивалась длительность митотического цикла, наступала депрессия митотической активности, о чем свидетельствует достоверное снижение МИ (без учета профаз). Увеличение числа клеток на стадии профазы, согласно И.А. Алову [3], можно рассматривать как патологию митоза, связанную с хромосомными абберациями, что говорит о серьезных повреж-

дениях генетического материала и неспособности клеток перейти на следующую стадию митоза. Замечено, что клетка реагирует на повреждение замедлением прохождения клеточного цикла и активацией синтеза специфических белков, т.е. процессами, увеличивающими возможность репарации. Во-первых, активируется транскрипция некоторых репарационных ферментов, во-вторых, остановка клеточного цикла обеспечивает клетке дополнительное время для репарации повреждений ДНК. Эти процессы предотвращают репликацию и расхождение поврежденных хромосом. Отмечено достоверное увеличение ПМ (6,2%, P<0,01) по сравнению с контрольным значением (1,7%) в клетках корневой меристемы этого опытного варианта наряду с достоверным снижением числа клеток с ОЯ (7,9% — в опыте, P<0,05, 16,7% — в контроле). Это говорит об уменьшении ядрышковой активности, нарушении гомеостаза, т.е. о генотоксичности испытуемого раствора. Снижение ядрышковой активности, по-видимому, можно также рассматривать как изменение характера генной экспрессии, сопровождающее состояние нестабильности генома в клетках. Значения других показателей (МИ, доля вакуолизированных клеток и уровень ПМ) свидетельствуют о цитогенетической нестабильности. Нестабильность — состояние генома, когда в клетках организма наблюдается повышенное количество спонтанных повреждений, высокая частота мутаций и темпов мутирования, повышение уровня амплификации генов и изменение характера генной экспрессии. На организменном уровне нестабильность генома проявляется увеличением риска опухолевой и других патологий [4]. Нестабильность генома, вызванная воздействием генотоксичных веществ, приводит к увеличению вероятности мутаций в определенных генах, контролирующих процесс репарации ДНК. Это резко увеличивает вероятность дальнейшей трансформации мутантных клеток в опухолевые [13]. Учитывая вышесказанное и значительное увеличение ПМ в опытных вариантах, можно говорить о повышении количества мутантных клеток в корневой меристеме проростков семян, обработанных сточными водами, что изменяет физиологические и биохимические показатели. Химические вещества из сточных вод, особенно тяжелые металлы, вероятнее всего, аккумулируются в самих растениях, их плодах, а главное — в человеческом организме при потреблении таких продуктов. Многие химические вещества являются мутагенами для человека. Все это приводит к изменениям цитогенетических, биохимических, биофизических, физиологических показателей у человека. В итоге в человеческом организме могут появляться мутантные клетки, т.е. клетки с цитогенетической нестабильностью и нестабильностью генома. Впоследствии они способны переродиться в злокачественные.

Таким образом, мы оцениваем фенолформальдегидсодержащие сточные воды данного деревообрабатывающего предприятия как генотоксичные отходы. Их нельзя рекомендовать к применению в качестве удобрения или стимулятора роста, поскольку очень велик риск цитогенетической нестабильности, что потенциально может привести к угрозе здоровью и жизни человека — онкопатологии. ■

Литература

- Алипатова О.В., Прокопова Л.В. Утилизация азотодержащих осадков сточных вод мебельных комбинатов в качестве удобрений // Современные технологические процессы получения материалов и изделий из древесины: Материалы Всерос. науч.-техн. конф. с междунар. участием (Воронеж, 17—19 сент. 2001 г.). Воронеж, 2001. — С. 243—246.
- Алипатова О.В. Эффективность использования сточных вод мебельных комбинатов в агроэкосистемах: Автореф. дисс. ... канд. с.-х. наук. Воронеж, 1998. 22 с.
- Алов И.А. Патология митоза // Вестник АМН СССР, 1965. № 11. — С. 58—66.
- Безлепки В.Г., Газиев А.И. Индуцированная нестабильность генома половых клеток животных по мини- и микросателлитным последовательностям // Радиационная биология. Радиозоология, 2001. — Т. 41. — № 5. — С. 475—488.
- Буторина А.К., Калаев В.Н. Анализ чувствительности различных критериев цитогенетического мониторинга // Экология, 2000. — № 3. — С. 206—210.
- Васильев В.А., Филипова Н.В. Справочник по органическим удобрениям / М.: Россельхозиздат, 1984. — 254 с.
- Вострикова Т.В., Буторина А.К. Цитогенетические реакции березы повислой на действие стрессовых факторов // Известия РАН. Серия биологическая, 2006. — №2. — С. 232—238.
- Гольдфарб Л.П., Туровский И.С., Белдева С.Д. Опыт утилизации осадков сточных вод мебельных комбинатов в качестве удобрения / М., 1983. — 58 с.

9. Давидчук Н.В., Еремеева Н.В. Сравнение ответной реакции растений *Brassica napus* L. на применение сточной воды // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. Тамбов, 2011. — Том 16. — Вып. 6. — С. 1583—1585.
10. Давидчук Н.В., Бородина Н.Н., Демидова В.П. Применение сточной воды для коррекции прорастания семян и морфогенеза проростков растений вида *Cerasus vulgaris* // Проблемы региональной экологии. 2007, №3. — С. 99—103.
11. Давидчук Н.В., Еремеева Н.В., Семенова О.В., Тришина Н.К., Васильева Ю.В. Рост гидрофитов и прорастание семян культурных растений в сточной воде // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. Тамбов, 2011. — Том 16. — Вып. 2. — С. 650—653.
12. Джувеликян Х.А. Экология и человек. Воронеж: ВГУ, 1999. — 264 с.
13. Мазурик В.К., Мороз Б.Б. Проблемы радиобиологии и белок р 53 // Радиационная биология. Радиоэкология, 2001. — Т. 41. — № 5. — С. 514—518.
14. Покровская С.Ф., Гладкова Л.И. Использование осадков сточных вод в сельском хозяйстве: Обзорная информация. М., 1977. — 44 с.
15. Цуриков А.Т., Казанджян П.К., Батищев И.Л. Промышленные отходы — известковые удобрения // Химия в сельском хозяйстве, 1987. — Т. 25. — №6. — С. 28—29.
16. Allowdi B.J., Jackson A.P. The behavior of heavy metals in sewage amended soils // The sci. of total environm., 1991. — Vol. 100. — P. 151—176.