

**В.О. Іваниця, Н.Ю. Васильєва, Г.В. Лісютін, А.Є. Бухтіяров,
Т.В. Гудзенко**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: 8 (0482) 68 79 64,
e-mail: v_ivanit@te.net.ua

ТОКСИЧНА І МУТАГЕННА АКТИВНІСТЬ ЗАБРУДНЕННЯ АКВАТОРІЇ ОСТРОВА ЗМІЙНИЙ*

*Виявлено, що полютанти в пробах морської води, відібраних в акваторії острова Зміїний у ході проведення двох комплексних експедиційних робіт в 2008 р., викликали неоднозначну реакцію у тест-бактерій *Salmonella typhimurium* TA100 та показали як стимулюючу, так і токсичну дію. Встановлено, що рівень мутагенної активності хімічного забруднення води по сезонах року варіював і перевищував фоновий до 7,7 рази улітку й до 9,2 рази восени.*

К л ю ч о в і с л о в а: острів Зміїний, морська вода, хімічне забруднення, тест-бактерії, токсичність, мутагенність.

Вивчення екологічного стану акваторії острова Зміїний становить інтерес у зв'язку з унікальним місцем його розташування на шляху гідрофронті ріки Дунай, що несе забруднюючі речовини з 18 європейських країн [9]. В останні роки на прибережні води острова зросло антропогенне навантаження внаслідок розбудови інфраструктури й початком його використання в рекреаційних цілях. Одним із проявів погіршення екологічної ситуації є акумуляція в навколишньому середовищі хімічних сполук з мутагенними властивостями. На тлі інтенсивної евтрофікації токсиканти сприяють збільшенню частоти й накопиченню індукованих мутацій, що призводить до зміни чисельності мікроорганізмів, структури мікробних ценозів і еколого-фізіологічних властивостей бактерій [3].

Виявлення мутагенної й токсичної дії полютантів дозволяє оцінити рівень їхньої біологічної небезпеки для подальшої розробки заходів, спрямованих на поліпшення екологічної обстановки.

Мешканцями будь-якої екосистеми є бактерії, що беруть участь у трансформації полютантів. Реакція мікроорганізмів на присутність у водному середовищі антропогенних забруднюючих речовин дає можливість оцінити мутагенну й токсичну активність ксенобіотиків у морській воді без визначення складу забруднювачів [1].

Метою роботи було визначення токсичної й мутагенної активності забруднюючих речовин акваторії острова Зміїний із використанням мікробної системи *Salmonella typhimurium* у тесті Еймса.

* Робота виконана в рамках тем № ЗМ/321-2008, ДЗ/300-2008, Д/Б 422, що фінансується Міністерством освіти і науки України



Матеріали і методи

Для проведення досліджень акваторії острова Зміїний проби морської води відбиралися на 12 прибережних станціях (рис. 1) з поверхневого шару (0–50 см) у серпні й жовтні 2008 р. відповідно до загальноприйнятих методик.

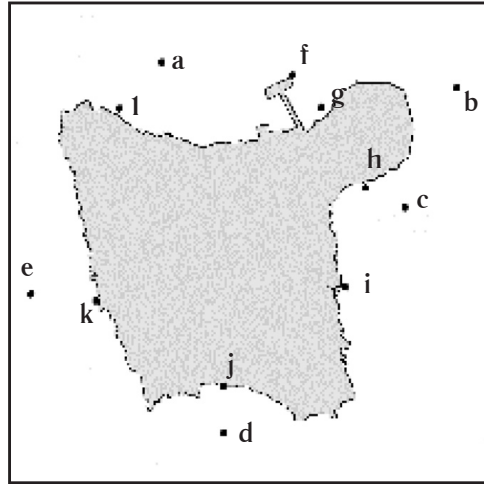


Рис. 1. Карта-схема відбору проб у прибережних водах острова Зміїний

Fig. 1. Water sampling scheme in the coastal waters of the Zmiinyi island

Для оцінки токсичності й мутагенної активності проб морської води застосовували метод обліку генних мутацій — тест Еймса [7]. Для цього використовували тест-штам бактерій *Salmonella typhimurium* TA100, що ревертують від ауксотрофності до прототрофності по гістидину в результаті мутацій типу заміни пар основ. Культивування тест-організму здійснювали в рідкому живильному середовищі з введенням досліджуваної проби морської води (дослід) і штучної морської води (контроль).

У колбу поміщали 9 мл досліджуваного матеріалу й стерилізували його при 1 атм (121 °С), після чого додавали 0,1 мл 18 добової культури *S. typhimurium* TA100 (у титрі $5 \cdot 10^8$ КУО/мл), культивованої в МПБ при 37 °С, 1 мл мінерального середовища М9 і по 0,1 мл розчинів 0,011% L-біотина і 0,012% D-гістидина. Середнє значення токсичної й мутагенної активності води станцій визначали по 5 повторностям. Культури вирощували на гойдалці протягом 3,5 годин при 120 об/хв при 37 °С. Після інкубації проводили посів тест-об'єкту на щільні поживні середовища.

Для визначення токсичності проби морської води проводили поверхневий посів 0,1 мл досліджуваного матеріалу на повноцінне середовище (МПА) і підраховували кількість життєздатних клітин по чисельності колоній, що вирости. Для визначення мутагенної активності 0,1 мл проби, до якої додавали “м'який агар” (0,6% агару, 0,5% NaCl) і розчин біотину, заливали другим шаром на щільне селективне живильне середовище — бактеріальний агар (БА).

Мутагенний ефект, з обліком можливої токсичної дії, розраховували за формулою: $K_m = (A_{\text{БА}}/A_{\text{МПА}}) \cdot 100\%$, де K_m — концентрація мутацій; $A_{\text{БА}}$ — кількість клітин на БА; $A_{\text{МПА}}$ — кількість клітин на МПА.

Відносну концентрацію мутацій клітин сальмонели визначали за формулою: $K_{\text{відн}} = K_{\text{п}}/K_{\text{м}}$, де $K_{\text{відн}}$ – відносна концентрація мутацій; $K_{\text{п}}$ – концентрація мутацій дослідженої проби; $K_{\text{м}}$ – концентрація мутацій у контролі [2].

Доказом мутагенної дії забруднювачів морської води, вважається більш ніж дворазове збільшення чисельності бактерій-ревертантів у досліді, у порівнянні з контролем [7].

Статистичну обробку результатів проводили згідно стандартних методик [4] з використанням програми “SPSS 9.0 для Windows”.

Результати та їх обговорення

У ході проведення двох комплексних експедицій в 2008 р. були відібрані проби морської води в прибережній частині острова Зміїний і вивчена токсична й мутагенна активність полютантів. Результати визначення токсичної дії аналізованих проб на тест-бактерії *Salmonella typhimurium* TA100 представлені в таблиці 1.

Таблиця 1
Вплив морської води досліджуваних станцій на життєздатність клітин *Salmonella typhimurium* TA100

Table 1
Influence of marine water from the investigated stations on *Salmonella typhimurium* TA100 cell viability

Станція	Літо		Осінь	
	Кількість клітин ($\times 10^7$) в мл $M \pm \Delta_{0,05}$ (n=5)	%	Кількість клітин ($\times 10^7$) в мл $M \pm \Delta_{0,05}$ (n=5)	%
Контроль	625,2 \pm 48,5	100	835,2 \pm 57,3	100
a	841,6 \pm 79,1**	135	-***	-
b	156,8 \pm 19,6**	25	-	-
c	142,4 \pm 13,5**	23	-	-
d	627,2 \pm 26,5	100	-	-
e	371,2 \pm 30,8**	59	-	-
f	648,0 \pm 112,6	104	1085,2 \pm 47,4**	129,9
g	1496,0 \pm 80,7**	239	994,0 \pm 109,7*	119,1
h	2360,0 \pm 433,2**	377	305,0 \pm 53,2**	36,5
i	662,4 \pm 109,8	106	58,2 \pm 5,6**	7,0
j	1019,2 \pm 106,2**	163	2000,0 \pm 224,0**	239,5
k	291,2 \pm 24,1**	47	6821,2 \pm 567,9**	816,7
l	812,8 \pm 302,6	130	830,4 \pm 33,0	99,4

Примітка: * – $P < 0,01$; ** – $P < 0,001$; *** – дослідження не проводили.



Речовини, що забруднюють морську воду, викликали неоднозначну реакцію та здійснювали як токсичну, так і стимулюючу дію. Представлені дані можуть бути згруповані у два ряди, розташовані по обидва боки від значень контролю.

До першої групи відноситься група проб, що сприяла збільшенню чисельності тест-бактерій щодо контролю при $P < 0,001$. Так, стимулююча дія відзначена для проб, отриманих зі станцій **a, g, h, j** у літній період і **f, g, j, k** в осінній період.

Виділяється також група проб (**b, c, e, k**) у літній і (**h, i**) в осінній період спостережень, під впливом яких відзначене зниження числа життєздатних клітин тест-бактерій. Вірогідність розходження між показниками чисельності клітин цієї групи й контролем вища за 99,9 %. У межах зазначеної групи статистично вірогідно ($P < 0,001$) виділені три підгрупи, що відрізняються між собою за токсичною дією. Група А (потужний токсичний ефект полютантів морської води, виявлений улітку на станціях **b, c** і восени – **i**), група Б (помірна токсична дія влітку – **k** і восени – **h**) і група В (слабка токсична дія влітку – **e**). Навколо показника контролю також групуються дані, розходження між якими не виявляється навіть при $P < 0,1$ улітку (**d, f, i**) і восени (**l**).

Речовини, що забруднюють морську воду в проведених дослідженнях, індукували мутації до прототрофності у використовуваного тест-мікроорганізму (табл. 2).

Таблиця 2

Мутагенна дія забруднення морської води на *Salmonella typhimurium* TA100

Table 2

Mutagenic action of marine water contamination on *Salmonella typhimurium* TA100

Станція	Літо		Осінь	
	Концентрація мутацій, %	Концентрація мутацій по відношенню до контролю	Концентрація мутацій, %	Концентрація мутацій по відношенню до контролю
Контроль	1,38	1,00	1,46	1,00
a	1,09	0,79	-****	-
b	5,10	3,71	-	-
c	7,72**	5,62	-	-
d	2,33***	1,69	-	-
e	6,20***	4,50	-	-
f	0,71*	0,52	0,41***	0,28
g	3,25***	2,36	1,93***	1,32
h	1,17***	0,85	0,92**	0,63
i	1,39	1,01	13,4**	9,17
j	0,35***	0,26	1,82***	1,25
k	1,65***	1,20	0,16	0,11
l	0,32**	0,23	0,36***	0,25

Примітка: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$; **** – дослідження не проводили.



Проби морської води, отримані зі станцій **f, j, l** влітку й **f, h, l** – восени, не викликали мутагенної дії. Для інших проб був відзначений мутагенний ефект, що статистично вірогідно ($P < 0,01$) перевищував показники контролю. Виключення склали проби **a, b, i**, отримані влітку, й **k** – восени, для яких перевищення щодо контролю виявилось статистично не достовірним при $P < 0,10$. Серед оброблених проб значною мутагенністю володіли проби **c, e** влітку й **i** – восени. Для проб **g, d, k**, відібраних улітку, й **g, j** – восени – характерно зниження мутагенного ефекту. Значне зниження чисельності колоній-ревертантів у досліді відносно контролю може бути пов'язано із загальною токсичною дією проби морської води й не обов'язково вказує на наявність антимутагенної дії.

Виявлена стимулююча дія досліджуваних проб може бути пояснена посиленням ферментативної активності тест-бактерій в результаті формування крапкових мутацій під впливом забруднювачів морської води [6].

Отже, проведені дослідження не виявили кореляцію між величинами токсичної й мутагенної дії й вмістом у пробах морської води акваторії о. Зміїний важких металів (Сг, Со, Ni, Cd, Pb, Cu, Hg) і загальним рівнем рідких вуглеводнів і окремих фракцій (мастил і смолистих сполук) як улітку, так і восени. Виключення склали наявність кореляційних зв'язків між токсичною дією проб морської води на тест-об'єкти й вмістом міді влітку ($r=0,834$) і смолистими сполуками восени ($r=0,757$) при $P < 0,05$.

Проведений у ході досліджень хімічний аналіз проб морської води виявив, що концентрація в них токсичних металів мінімальна і не перевищувала значення ГДК протягом усіх сезонів року, за виключенням міді, вміст якої стабільно відмічався на рівні 6 ГДК. Розподіл рідких вуглеводнів у прибережних водах острова Зміїний восени був значно вищим, ніж у літній період спостережень і досягав 51 мг/л [5]. З літературних даних відомо, що для вивченої акваторії Чорного моря притаманні високі концентрації міді $> 3,0$ – $13,4$ мкг/л, що перевищує значення ГДК до 3 разів та може бути пов'язано як із геологічною активністю, так і впливом ріки Дунай [8].

Встановлено виражений нелінійний характер залежності між величинами мутагенного ефекту й вмістом хрому ($r=0,820$), мастил ($r=0,713$) улітку й свинцю ($r=0,698$) восени при $P < 0,05$.

Проведені дослідження у серпні й жовтні 2008 р. показали, що токсикологічна ситуація акваторії острова Зміїний піддана динамічним змінам, що обумовлено впливом різних факторів: спрямованістю течій, джерелами забруднень, гідролого-гідрохімічними показниками морської води, теригенним стоком, зміною властивостей і вмістом поліютантів, які спільно здійснюють негативну дію.

У жовтні 1992 р. у пробах води гирла Дунаю (зона гідрофронту, навпроти гирла Швидке) виявлена мутагенна дія поліютантів, що перевищує спонтанний рівень мутацій у 5 разів [3]. Отже, присутність сполук із мутагенною активністю в пробах води вказує на антропогенне навантаження на досліджуваний регіон.

Таким чином, уперше проведені дослідження виявили високі значення токсичної й мутагенної активності поліютантів у пробах морської води, отриманих на станціях **c, e** влітку й **i** – восени. Проведення подальших досліджень прибережних вод острова Зміїний необхідно направити у бік вивчення внеску поліютантів різної хімічної природи в генотоксичну ситуацію дослідженої акваторії.



ЛІТЕРАТУРА

1. Бутаев А.М., Костров Б.П., Исцув А.Р. и др. Токсико-генетическое состояние природных вод Дагестана // Вестник Дагестанского научного центра РАН. — 2002. — № 12. — С. 42-49.
2. Васильева Т.В., Панченко Н.Н., Васильева Н.Ю. Методика комплексной оценки токсичности и мутагенности в бактериальной и водорослевой тест-системах // Интеллектуальные информационно-аналитические системы и комплексы. — Киев: Ин-т кибернетики им. В.М. Глушко НАН Украины, 2000. — С. 78-84.
3. Иваница В.А., Худченко Г.В., Панченко Н.Н., Бухтияров А.Е., Мединец В.И. Микробиологические исследования прибрежной части Черного моря в районе дельты Дуная и дельты Днепра. Исследования экосистемы Черного моря // Сб. науч. труд. Укр. науч. цент. экол. моря. — Одесса: ИРЭН, 1994. — С. 54-67.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
5. Лисютин Г.В., Бухтияров А.Е., Білоіваненко С.О., Пономарьова Л.П., Гудзенко Т.В., Іваниця В.О. Нафтове забруднення і гетеротрофна мікробіота акваторії острова Зміїний // Мікробіологія і біотехнологія. — 2009. — Т. 5. — № 1. — С. 88-94.
6. Рапопорт И.А. Химические мутагены, опасные для человека // Проблемы медицинской генетики. — М.: Медицина, 1970. — С. 249-287.
7. Ames B.N., Lee F.D., Durston W. E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1973. — Vol. 70. — № 3. — P. 782-786.
8. Black Sea transboundary diagnostic analysis. UNDP BSERP. — 2007. — 228 p. — Режим доступа до журн.: <http://www.sesame-ip.eu/scientist/documents>
9. Kataoka H., Hayatsu T., Hietsch G. et al. Identification of mutagenic heterocyclic amines (IQ, Trp-P-1 and AaC) in the water of the Danube river // Mutat Res. — 2000. — Vol. 466. — № 1. — P. 27-35.

В.А. Иваница, Н.Ю. Васильева, Г.В. Лисютин, А.Е. Бухтияров, Т.В. Гудзенко

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
тел.: 8 (0482) 68 79 64, e-mail: v_ivanit@te.net.ua

ТОКСИЧЕСКАЯ И МУТАГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ЗАГРЯЗНЕНИЯ АКВАТОРИИ ОСТРОВА ЗМЕИНЫЙ

Реферат

Обнаружено, что поллютанты в пробах морской воды, отобранных в акватории острова Змеиный в ходе проведения двух комплексных экспедиционных работ в 2008 г., вызывали неоднозначную реакцию у тест-бактерий *Salmonella typhimurium* TA100 и показали как стимулирующее, так и токсическое действие. Установлено, что уровень мутагенной активности химического загрязнения воды по сезонам года варьировал и превышал фоновый до 7,7 раза летом и до 9,2 раза осенью.

К л ю ч е в ы е с л о в а: остров Змеиный, морская вода, химическое загрязнение, тест-бактерии, токсичность, мутагенность.



**V.O. Ivanytsya, N.Yu. Vasileva, G.V. Lisyutin, A.Y. Bukhtiyarov,
T.V. Gudzenko**

Odesa National I.I. Mechnykov University, Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082,
Ukraine, tel.: 8 (0482) 68 79 64, e-mail: v_ivanit@te.net.ua

TOXIC AND MUTAGENIC ACTIVITY OF CONTAMINATION OF THE ZMIINY ISLAND AQUATORIUM

Summary

Pollutants of marine water samples selected in the Zmiiny island aquatorium during two complex expeditions in 2008 caused an ambiguous reaction of the test-bacteria *Salmonella typhimurium* TA100 and showed both stimulant and toxic actions. The level of mutagenic activity of chemical contamination of water in different seasons varied and exceeded the background levels up to 7,7 times in summer and up to 9,2 times in autumn.

К e y w o r d s: the Zmiiny island, marine water, chemical contamination, test-bacteria, toxicity, mutagenicity.

