

0-732834

УДК 631.504.53.575.224

На правах рукописи

БАТЦЭЦЭГ ЧОЙДАШ

ГЕНОТОКСИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ УРБОТЕХНОГЕННЫХ
ПОЧВ МОНГОЛИИ И ТАТАРСТАНА

03.00.07 – микробиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ч.Батцэцэг

КАЗАНЬ – 2002

Работа выполнена на кафедре микробиологии Казанского государственного университета им. В.И. Ульянова - Ленина

Научный руководитель: доктор биологических наук,
профессор Ильинская О.Н

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор Семенов В.В

доктор биологических наук,
профессор Куприянова-Ашина Ф.Г

Ведущее учреждение: Институт экологии и генетики
микроорганизмов УрОРАН

Защита диссертации состоится 14 ноября 2002 г. в 14³⁰ часов на заседании Диссертационного Совета Д212.081.13. при Казанском государственном университете им. В.И. Ульянова – Ленина, 420008 г. Казань, ул. Кремлевская, 18

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского государственного университета

Автореферат разослан 8 октября 2002 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доцент

АскарOVA

АскарOVA А.Н

Актуальность проблемы. Соединения, обладающие способностью вызывать отдаленные эффекты, в частности, генотоксиканты, представляют особую опасность для здоровья человека. Химическое загрязнение почв, вод, пищевых цепей и воздушной среды практически постоянно.

Возникновение и накопление нежелательных мутационных изменений в соматических клетках можно считать первым этапом возможного канцерогенеза, в то время как мутации в половых клетках могут вызвать наследственные изменения, врожденные уродства, повысить число спонтанных аборт и уровень детской смертности. В связи с этим значительное количество химических соединений, предлагаемых к внедрению в практику, либо уже поступивших в окружающую среду, исследуются на мутагенность в серии биотестов [Худолей, 1999; Ashby, Paton, 1993; Tennant, Ashby, 1991].

Однако в естественных условиях на живой организм чаще действуют не индивидуальные соединения, а целый комплекс веществ. При этом индивидуальные соединения в естественных средах, таких как вода, почва, воздух, влияя друг на друга, модифицируют мутагенный потенциал отдельных составляющих, зачастую усиливая его. Известно немало примеров проявления мутагенных и канцерогенных свойств как отдельных химических соединений, так и образцов природных комплексов в нетоксичных дозах, что свидетельствует о более опасных, а именно, затрагивающих наследственность, эффектах. Осознание правомочности и необходимости комплексного подхода к оценке генотоксичности в последние годы получает все более широкое распространение и практическую реализацию [Журков, 1986; Куринный, 1992; Watanable et al., 2000].

Во всем мире проводятся исследования, обосновывающие необходимость введения дополнительного анализа генотоксичности в программу экологической оценки природных комплексов. В частности, предварительная оценка мутагенности невозделанных почв проводится в Пенсильвании (США) [Donnelly et al., 1988], сравнительное изучение необработанных почв и почвы, подготовленной для сельскохозяйственных целей, принято в окрестностях Тегерана (Иран) [Zia' ee, Sabouni, 1992]. Исследования почв 5-ти географически различных областей Японии, проводившиеся в 1996-1997г показали наличие мутагенного эффекта

органических вытяжек 11 образцов почв [Watanable et al., 2000]. Изучение почв Германии не выявило отсутствие корреляции между повышением мутагенности и содержанием полиароматических углеводородов в образцах исследуемых проб [Wesp et al., 2000]. Таким образом, актуально и несомненно важно оценивать не только существующую на сегодняшний день токсичность, но и отдаленные последствия использования химикалий.

Цель и задачи исследований. Целью настоящей работы явилось сравнительное определение генотоксического потенциала антропогенно загрязненных почв Монголии и Татарстана и выявление связи его величины с интенсивностью метаболизма микроорганизмов почвенного сообщества.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Определить токсические свойства водных и органических экстрактов почвенных образцов Монголии и Татарстана по отношению к тестерным микроорганизмам.

2. В образцах городских почв Монголии и Татарстана исследовать возможность индукции прямых повреждений бактериальной ДНК.

3. Оценить генотоксический эффект образцов почв в микробных тест-системах, регистрирующих генные мутации вызванные комплексом природных почвенных мутагенов прямого и непрямого действия.

4. Охарактеризовать динамические изменения состава микробного биоценоза и мутагенности образцов почв в модельных условиях стресса (искусственной засухи и индукции анабиоза), сопоставив их с динамикой физиологической активности почвенного сообщества.

5. Выявить возможные корреляционные зависимости между исследованными химическими и биологическими показателями, отражающими свойства определенного почвенного образца, и обосновать необходимость введения дополнительного параметра генотоксичности для полной характеристики почв.

Научная новизна. Впервые исследован суммарный генотоксический потенциал образцов почв Монголии и Татарстана, подвергшихся антропогенным воздействиям на территории крупных городов. Установлено, что как водные, так и органические экстракты почв г.Улан-Батора и г.Казани обладают генотоксическим эффектом.

Впервые изучены динамические изменения состава микробного биоценоза и мутагенности образцов почв г.Улан-Батора и г.Казани в условиях засухи и

индуцированного микро-~~организмами~~ регуляторами роста (факторами ~~группы~~) и модельного анабиоза.

Показано отсутствие корреляционной зависимости между содержанием органического вещества, токсичностью и мутагенностью почвенных образцов обоих городов.

Оценка мутагенной активности почвы, представленная в данной работе, является первым шагом в системе мониторинга состояния урбанизированных почв крупных городов.

Практическая значимость. Полученные результаты вносят значительный вклад в оценку уровня мутагенного загрязнения различных участков почв г.Улан-Батора и г.Казани. Выявлена связь между основными источниками загрязнения почв и ее мутагенным потенциалом. Для г.Улан-Батора генотоксическая активность максимальна в почвах на территории рынка и центральной части города, а для г.Казани - в почвах на территории рынка и вблизи городской автострады. Полученные данные позволяют прежде всего связать величину мутагенного потенциала почвы с интенсивностью движения автотранспорта.

Результаты работы переданы в управление охраняемых территорий обоих городов и могут являться научной основой для различных мероприятий по охране почв в экосистеме г.Улан-Батора и г.Казани.

Данная работа может стать основой дальнейших исследований почв г.Улан-Батора и г.Казани по показателям генотоксичности, адекватно и значимо отражающим динамику вредных воздействий урбанизированных почв на геном живых организмов.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на региональных и международных конференциях: итоговых научных конференциях Казанского Государственного Университета в 2001 и 2002гг., Первом съезде Микробиологического общества регионов Поволжья (Саратов, 2000г.), Первой конференции Научно-образовательного Центра КГУ «Материалы и технологии XXI века» (Казань, 2000г.), XVII съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Казань, 2001г.), 39-ой международной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2001), Международном съезде стран азиатского региона «Экологические проблемы стран Монголии и Японии» (Токио, 2002г.), а также на семинарах кафедры микробиологии и научно-

исследовательской лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов Института Биологии Казанского Государственного Университета.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 научных работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела экспериментальных исследований и обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 121 страницах машинописного текста, включает 21 таблиц, 20 рисунков. Библиография содержит 168 наименований, из них 67 российских и 101 зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы. Первая группа исследуемых образцов почв отобрана в городе Улан-Батор (Монголия), в августе 2000г: 1-территория рынка строительного материала, 2-жилой квартал, 3-почва на пищевом рынке «Shonkhor», 4-почва вдоль городской автострады, 5-ил городских очистных сооружений, 6-почва на территории авторынка, 7-пригородная зона, 8-центральная часть города, 9-почва на рынке «Bumbugur».

Вторая группа почв отобрана в городе Казани (Татарстан, Россия), в августе 2001г: 1-почва вдоль городской автострады, 2-центральная часть города, 3-почва на территории колхозного рынка, 4-пригородная зона, 5-ил городских очистных сооружений, 6-почва на территории авторынка.

В тестах на токсичность и мутагенность исследовали водные и эфирные вытяжки отобранных проб.

Таблица 1

Характеристика тестерных штаммов

Штаммы	Генотип	Источник
<i>Salmonella typhimurium</i> TA 100	<i>hisG46 rfa uvrB bio</i> pKm101	Институт по БИХС, г. Купавна
<i>Escherichia coli</i> wp 2 <i>rec A</i> <i>pol A</i> <i>uvr A</i>	<i>trp</i> ⁻ E дикий тип <i>trp</i> ⁻ 65 <i>rec A</i> <i>trp</i> ⁻ 65 <i>sul malB polA</i> <i>trp</i> ⁻ 65 <i>sul uvr A 155</i>	ГосНИИ Генетики, г.Москва

Изучение генотоксических свойств проводили на штаммах микроорганизмов, генотипы которых представлены в таблице 1.

Лиофилизированные микросомные (S9) фракции печени крыс и плаценты человека предоставлены институтом экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН г.Перми. Использовали химический аналог индукторов анабиоза бактерий - факторов d, *Pseudomonas carboxydoflava* и *Bacillus cereus* - C₆-алкилоксибензол (гексилрезорцин, М.в.=196, Sigma).

Химические методы. Общее количество органических компонентов было определено в CCl₄- экстрактах путем регистрации спектров поглощения (Т,%) в области 2900-3000 см⁻¹ (Specord, 75IR, Carl Zeiss, Jena, BRD), которое характеризует присутствие -CH₂-CH₂- и CH₃-CH₂- групп. Расчет содержания органического вещества проводили в условных единицах оптической плотности по формуле: Допт. = 1/lg Т%.

Количественное содержание гистидина в образцах почвы определяли по методу, разработанному Ильинской и др. [2001]. Минимальная обнаруживаемая данным методом концентрация гистидина составляет 7 мкг/мл. Доза гистидина, необходимая для удвоения ревертантов, равна 232 мкг/мл [Nylund, Einisto, 1993].

Методика обнаружения алкилрезорцинов основана на их способности взаимодействовать с диазотиевой солью 1,3 - диметоксибензидина с образованием окрашенных в красный цвет продуктов реакции. В реакции применяли коммерческий реагент Fast Blue B salt (FBB) [Мулюкин и др., 1996].

Микробиологические методы. Для выявления, изучения и учета численности различных почвенных микроорганизмов использовали стандартные методы посева из почвенной суспензии на специфические плотные и в жидкие питательные среды [Мишустин, Емцев, 1987; Бабьева, Зенова, 1989].

Методы биотестирования. Токсическое действие водных и органических почвенных вытяжек исследовали по отношению к тестерным микроорганизмам: *S. typhimurium* и *E.coli*.

Для выявления прямых повреждений ДНК использовали тест, основанный на избирательной ингибиции роста штаммов *E.coli: rec A, pol A, uvr A*, дефектных по определенным генам, участвующим в репарации, в сравнении с ростом штамма дикого типа wp2 [Абилев, Порошенко, 1986].

Мутагенное действие почв оценивали в тесте Эймса по регистрации частоты реверсий ауксотрофных по гистидину штаммов *Salmonella typhimurium* TA 100 к прототрофности в вариантах с метаболической активацией микросомами печени крыс и без нее. Мутагенную активность учитывали по кратности превышения числа индуцированных ревертантов над спонтанным фоном мутирования [Maron, Ames, 1983].

Математическая обработка результатов.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили согласно общепринятым методам [Плохинский, 1978]. Результаты считали статистически достоверными при среднеквадратичном отклонении $\sigma \leq 15\%$. В качестве критерия достоверности использовали критерий Стьюдента, принимая $P \leq 0.05$ за достаточный уровень значимости. Все расчеты проводили в стандартной компьютерной программе "Microsoft-Excel 2000".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Токсичность почвенных образцов Монголии и Татарстана по отношению к *Salmonella typhimurium*

Сравнительная оценка токсичности водных и органических экстрактов почв Монголии и Татарстана (рис.1, 2) свидетельствует, что водные экстракты почв автострады, центра города, рынка и пригорода Монголии обладают большей токсичностью, чем соответствующие пробы в Татарстане. Напротив, почва на территории авторынка и ил очистных сооружений Казани имеют больший токсический эффект, чем аналогичные образцы из Монголии. Как видно из рис.2, органические экстракты почв автотрассы и авторынка Казани более токсичны, чем у образцов из Улан-Батора. Среди всех тестированных образцов Улан-Батора наиболее токсичными являются почва центральной части города и почва на территории пищевого рынка.

Среди водных экстрактов почв г.Казани наибольшая токсичность была характерна для территории авторынка (рис.1). Органические экстракты почв проявили значительный токсический эффект вдоль городской автострады, центральной части города Казани и на территории колхозного рынка, из которых максимальную токсичность показал образец а.

Токсический эффект органических экстрактов более выражен по сравнению с водными вытяжками.

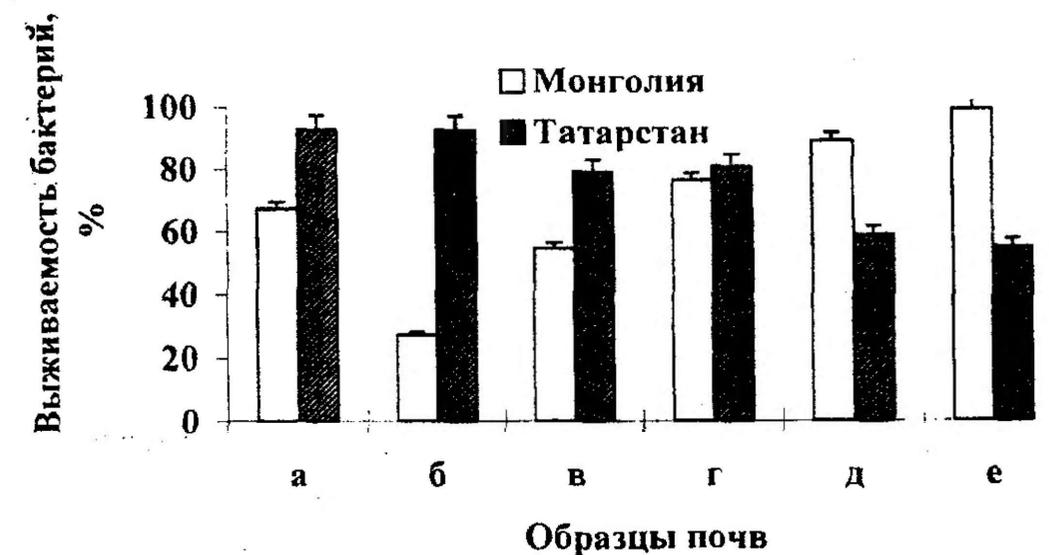


Рис.1 Сравнительная оценка токсичности водных экстрактов почв Монголии и Татарстана по отношению *Salmonella typhimurium* TA 100. За 100% принята выживаемость бактерий в присутствии растворителя. Образцы почв: а - почва вдоль автострады, б - центр города, в - рынок, г - пригородная зона, д - ил городских очистных сооружений, е - почва на территории авторынка.

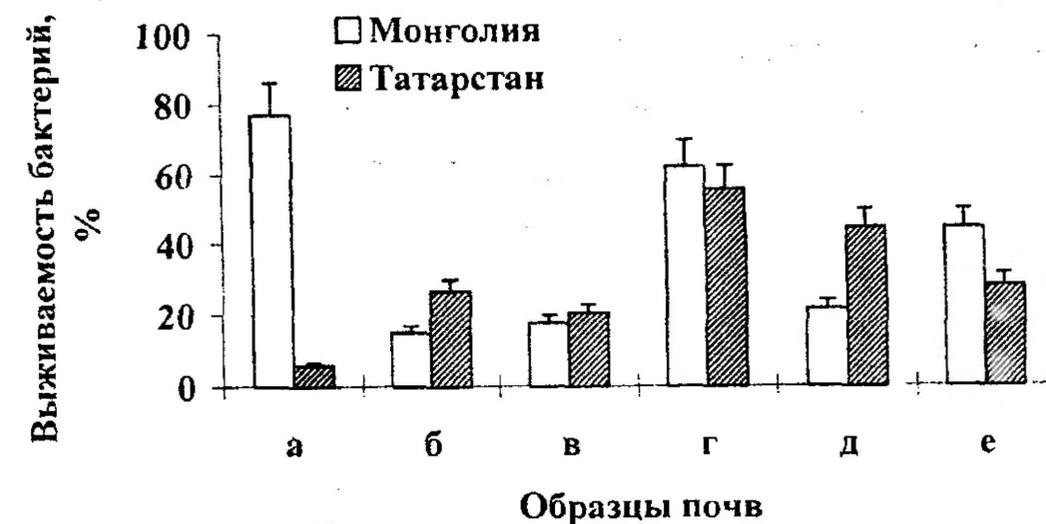


Рис.2 Сравнительная оценка токсичности органических экстрактов почв Монголии и Татарстана по отношению *Salmonella typhimurium* TA 100. За 100% принята выживаемость бактерий в присутствии растворителя (CCl₄). Образцы почв: а - почва вдоль автострады, б - центр города, в - рынок, г - пригородная зона, д - ил городских очистных сооружений, е - почва на территории авторынка.

2. ДНК-повреждающий эффект образцов городских почв Монголии и Татарстана

Экспериментально установлено, что почвы Монголии проявили по ДНК-повреждающей активности больший эффект, чем почвы Татарстана. Результаты исследований водных экстрактов почв Монголии показывают, что ДНК-повреждающая активность зарегистрирована у образцов почв рынка и ила очистных сооружений на штаммах *E.coli rec⁻* и *uvr⁻*, мутантным по генам пострепликативной и эксцизионной репарации. Генотоксичность образцов почвы рынка, ила очистных сооружений и центральной части г.Улан-Батора была обнаружена на штамме *E.coli pol⁻*, дефектном по ДНК-полимеразе. Результаты тестирования водных вытяжек почв Казани показали, что наибольшая ДНК-повреждающая активность характерна для почвы вдоль автотрассы. Все водные экстракты, за исключением почв пригорода, обладали генотоксичностью. Большинство генотоксических эффектов было установлено на штамме *uvr⁻* (табл.2). Из данных, представленных в табл.3, видно, что вытяжки почвы в CCl_4 содержат, вероятно, больше токсических веществ, чем водные экстракты. Все образцы г.Улан-Батора, за исключением ила очистных сооружений, обладали ДНК повреждающей активностью. В пробах почв автотрассы и ила очистных сооружений г.Казани генотоксическая активность выявлена на штамме *E.coli*, мутантном по ДНК-полимеразе I. Экстракт образца почв автотрассы ингибировал рост штаммов *rec⁻*, экстракт образца почв с территории рынка ингибировал рост мутантных штаммов *uvr⁻*.

Полученные данные позволяют заключить, что почвы центра города и рынка г.Улан-Батора проявили генотоксическую активность во всех вариантах тестов. Образцы почв автотрассы, пригорода и авторынка г.Улан-Батора не содержат каких-либо водорастворимых веществ с прямым ДНК-повреждающим действием, но содержат растворимые в органических растворителях вещества, которые могут придавать почве генотоксические эффекты. В иле очистных сооружений не содержится токсических веществ, переходящих при экстракции в органическую фазу, но содержатся водорастворимые токсиканты. Из 6 проб почв Татарстана 3 (почва автострады, рынка и ил очистных сооружений) обладали ДНК повреждающей активностью в водных и органических вариантах тестов.

Таблица 2

Сравнительная оценка зон ингибиции роста (мм) мутантных штаммов *Escherichia coli* под воздействием водных экстрактов почв Монголии и Татарстана

Образец	Вариант опыта	<i>wp2</i>	<i>rec⁻</i>	<i>pol⁻</i>	<i>uvr⁻</i>
автотрасса	Мон	0,2	0,15	0,65	0,45
	Тат	0	1*	1*	0,9
центр города	Мон	0,2	0,15	1,6*	0,05
	Тат	0,1	0,7	0,75	1,5*
рынок	Мон	2,5	25*	7,5*	2,5
	Тат	0,2	0,6	0	2,25*
пригород	Мон	0,2	0,15	1,6	0,05
	Тат	0,1	0,2	0,6	0,85
очист.соор.	Мон	7,5	60*	15*	75*
	Тат	0,35	0,35	0,9	2,1*
авторынок	Мон	0,55	1,1	0,7	0,3
	Тат	0,4	0,65	0,7	1,25*

* - Значительно отличается от зоны ингибиции роста *E.coli wp2*

Таблица 3

Сравнительная оценка зон ингибиции роста (мм) мутантных штаммов *Escherichia coli* под воздействием органических экстрактов почв Монголии и Татарстана

Образец	Вариант опыта	<i>wp2</i>	<i>rec⁻</i>	<i>pol⁻</i>	<i>uvr⁻</i>
автотрасса	Мон	4,5	4,25	5,5	9*
	Тат	1,9	3*	3,2*	2,9
центр города	Мон	5,5	5,5	6,5*	11,6*
	Тат	2,25	3	3	2,75
рынок	Мон	5,5	4,75	5,5	8,5*
	Тат	2,25	3,1	1,5	4,25*
пригород	Мон	3,75	4,5	5,5*	5,5*
	Тат	3	3,5	4	3,5
очист.соор.	Мон	6	4,5	2,75	6,5
	Тат	1,3	2,3	4*	1,9
авторынок	Мон	5,25	6,75	4,5	8,5*
	Тат	3	4,5	3,5	4

* - Значительно отличается от зоны ингибиции роста *E.coli wp2*

3. Мутагенная активность образцов почв Монголии и Татарстана в микробных тест-системах

Обнаружено, что водные вытяжки почв автотрассы, рынка, пригорода, ила очистных сооружений Татарстана не требовали метаболической активации для регистрации мутагенности. Аналогичные пробы Монголии были вообще не мутагенны, однако при метаболической активации у образцов почв автотрассы, рынка и ила очистных сооружений г.Улан-Батор мутагенность проявлялась, хотя и меньшая по величине, чем у тех же образцов в г.Казани (рис.3). Результаты по изучению генетической активности органических экстрактов почв Монголии и Татарстана свидетельствуют, что все образцы, за исключением ила очистных сооружений, не проявляли генотоксичность при метаболической активации (рис.4).

Ил очистных сооружений обоих городов обладал мутагенностью, при этом сила мутагенности образца из Казани выше, чем аналогичного образца из Улан-Батора.

4. Динамические изменения состава микробного биоценоза образцов городских почв Монголии и Татарстана в модельных условиях

Микробные сообщества почв города, кроме природных экологических ниш, осваивают новые микрзоны антропогенного происхождения, не свойственные данной почвенно-растительной зоне. Это дает основание изучать микробные сообщества городских почв как особые, специфические-урботехногенные, тем более, что почва служит основным местом стока урбаногенных веществ, в частности и мутагенных [Скворцова и др., 1989]. Преобразование и обезвреживание этих веществ зависит от состояния микробных сообществ почв.

Экспериментальные данные позволяют сделать заключение, что численность микроорганизмов в исследуемых почвах неодинакова. Показано, что Монгольские почвы в целом беднее по составу и численности микроорганизмов, чем почвы Татарстана. Установлено, что в почвах городских территории Улан-Батора и Казани доминируют отдельные популяции, например среди бактерий – представители р. *Bacillus*, среди микроскопических грибов - р. *Mucor*.

В модельных условиях, имитирующих засуху, число колониеобразующих единиц бактерий сокращается примерно 30%.

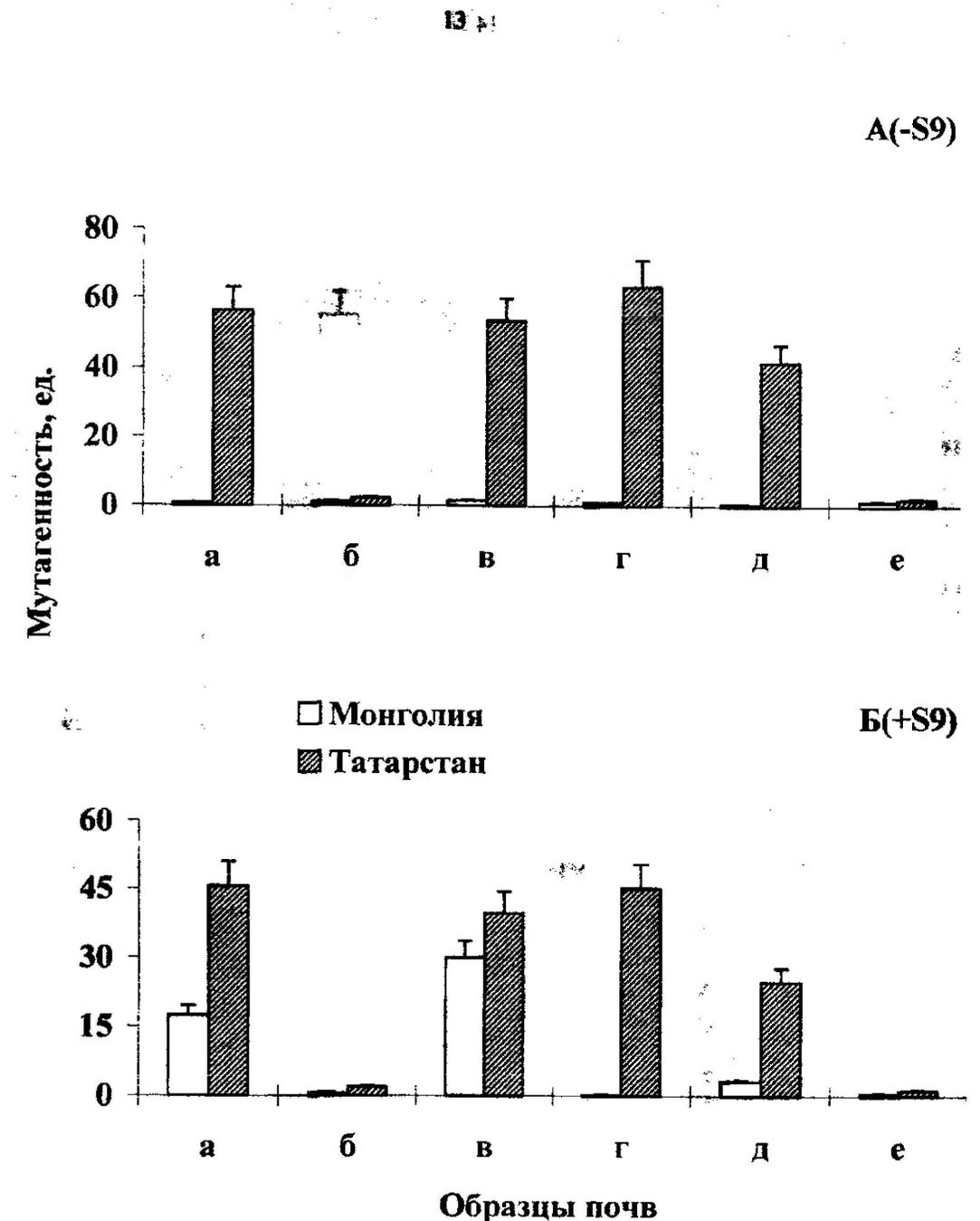


Рис.3 Сравнительная оценка мутагенности водных экстрактов почв Монголии и Татарстана. Мутагенность выражали в превышении числа ревертантов над спонтанным фоном (число раз, единицы). Панель А - эксперимент без метаболической активации, панель Б - с метаболической активацией. Образцы почв: а - почва вдоль автострады, б - центр города, в - рынок, г - пригородная зона, д - ил городских очистных сооружений, е - почва на территории авторынка.

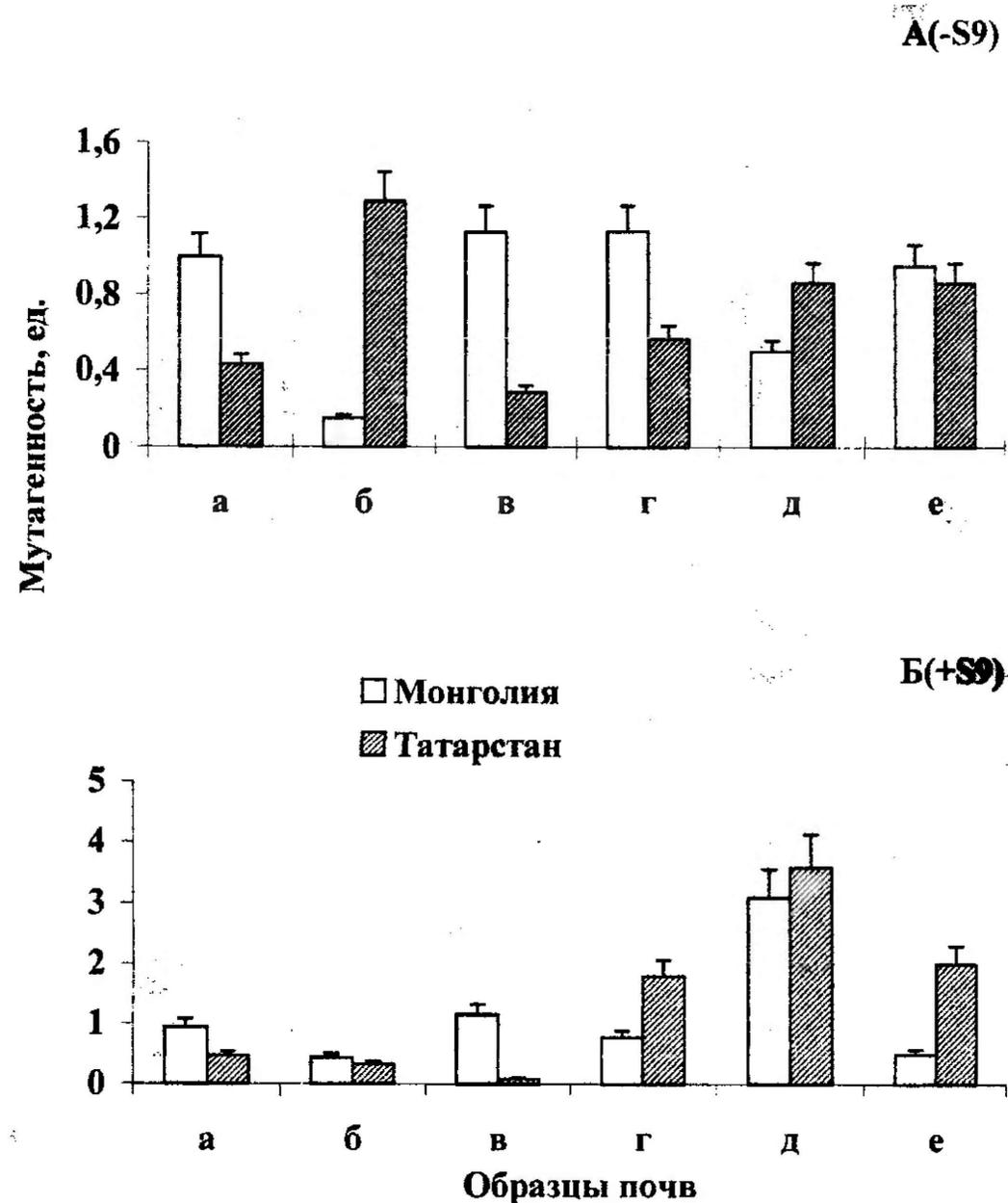


Рис.4 Сравнительная оценка мутагенности органических экстрактов почв Монголии и Татарстана. Мутагенность выражали в превышении числа ревертантов над спонтанным фоном (число раз, единицы). Панель А - эксперимент без метаболической активации, панель Б - с метаболической активацией. Образцы почв: а - почва вдоль автострады, б - центр города, в - рынок, г - пригородная зона, д - ил городских очистных сооружений, е - почва на территории авторынка.

Актиномицеты после высушивания вообще не прорастают, исчезает и большинство грибов. Введение в почву индуктора анабиотического состояния бактерий - гексилрезорцина (мг/г) также в значительной мере снижало число вегетативных форм микроорганизмов.

5. Изменение мутагенной активности образцов городских почв Монголии и Татарстана в модельных условиях

Учитывая, что значение генотоксического потенциала почв - понятие динамическое, мы провели ряд модельных экспериментов, имитирующих условия недельной засухи и условия, в которых микробное сообщество подвергалось действию регуляторных факторов d_1 , известных как индукторы анабиотического состояния микроорганизмов [Осипов и др., 1985]. В почвах Татарстана после засухи не зафиксировано сильных изменений величины генотоксической активности как в условиях с метаболической активацией, так и без нее. В целом можно отметить тенденцию к снижению мутагенности почв (табл.4 и 6, графа II).

Однако объяснить этот факт простым разложением термически неустойчивых генотоксикантов невозможно, поскольку для ряда почв Монголии (образцы 3, 4, 6 в табл.5) было показано, что, напротив, именно после высушивания в данных почвах мутагенная активность резко

Таблица 4

Изменение генотоксических свойств почв Татарстана в модельных условиях (высушивание)

Образцы почв	Отношение числа индуцированных ревертантов к спонтанному			
	-S9		+S9	
	I*	II**	I	II
1	56,3	0,72	45,5	1,27
2	2,25	1,08	1,9	0,83
3	53,4	1,32	39,6	2,16
4	63,5	7,88	45	3,63
5	41,6	21,92	24,7	3,72
6	1,96	5,28	1,16	3,43

*I- в естественных условиях

**II- в модельных условиях (после 7 дней при 37°C)

Образцы почв: 1 - почва вдоль автострады, 2 - центр города 3 - колхозный рынок, 4 - пригородная зона, 5 - ил городских очистных сооружений, 6 - почва на территории авторынка.

возрастает, особенно в экспериментах с метаболической активацией.

В почве химические реакции протекают настолько разнообразно и разнонаправленно, что предсказать образование особо опасных генотоксикантов на базе предварительного анализа содержания отдельных химических веществ не представляется возможным. Нами установлено, что модификация физиологического состояния почвенной микрофлоры играет важную роль в изменении мутагенной активности почв. Для почв Татарстана переход микроорганизмов в неактивное состояние не вызвал значительных изменений генотоксичности образцов (табл.6, графа III), в то время как для почв Монголии (образцы 1 и 3) наблюдали заметное повышение генотоксического потенциала при действии факторов d₁, снижающих метаболическую активность микроорганизмов (табл.7).

Полученные результаты свидетельствуют, что в условиях снижения метаболической активности почвенной микрофлоры генотоксический потенциал почв может не только сохраняться, но даже возрастать.

Таблица 5

Изменение генотоксических свойств почв Монголии в модельных условиях (высушивание)

Образцы почв	Отношение числа индуцированных ревертантов к спонтанному			
	-S9		+S9	
	I*	II**	I	II
1	1,59	1,18	1,47	0,85
2	1,65	1,13	2,12	0,94
3	1,5	151,5	30	143,2
4	0,74	188,3	17,4	157,7
5	0,6	4,05	3,13	3,33
6	1,46	130,3	0,59	96,5
7	0,9	0,32	0,31	0,5
8	1,1	1,16	0,59	0,92
9	0,6	0,78	0,69	0,67

*I- в естественных условиях

**II- в модельных условиях (после 7 дней при 37°C)

Образцы почв: 1 - территория рынка строительного материала, 2 - жилой квартал, 3 - почва на рынке "Shonkhor", 4 - почва вдоль автострады, 5 - ил городских очистных сооружений, 6 - почва на территории авторынга, 7 - пригородная зона, 8 - центр города, 9 - почва на рынке "Bumbugur"

Таблица 6

Изменение генотоксических свойств почв Татарстана после действия d₁-факторов

Почвы	Отношение числа индуцированных ревертантов к спонтанному							
	I*		II**		III***			
					Гексилрезорцин		Метилрезорцин	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
2	2,25 (-)	1,9 (-)	1,08 (-)	0,83 (-)	0,73 (-)	0,78 (-)	0,32 (-)	1,13 (-)
4	63,5 (++)	45 (++)	7,88 (+)	3,63 (+)	0,88 (-)	1,15 (-)	1,06 (-)	1,45 (-)

*I- в естественных условиях

**II- в модельных условиях (после высушивания)

***III- в модельных условиях (обработка с d₁-факторами 10мкг/мл в течение 7 дней).

(-) мутагенная активность не выявлена; (+) слабая мутагенная активность; (++) средняя мутагенная активность. Образцы почв: 2 - центр города, 4 - пригородная зона.

Таблица 7

Изменение генотоксических свойств почв Монголии после действия d₁-факторов

Почвы	Отношение числа индуцированных ревертантов к спонтанному							
	I*		II**		III***			
					Гексилрезорцин		Метилрезорцин	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
1	1,59 (-)	1,47 (-)	1,18 (-)	0,85 (-)	14,7 (++)	3,64 (+)	120,5 (+++)	169,9 (+++)
3	1,5 (-)	30 (++)	151,5 (+++)	143,2 (+++)	347,7 (+++)	283,2 (+++)	188,8 (+++)	236 (+++)

*I- в естественных условиях

**II- в модельных условиях (после высушивания)

***III- в модельных условиях (обработка с d₁-факторами 10мкг/мл в течение 7 дней).

(-) мутагенная активность не выявлена; (+) слабая мутагенная активность; (++) средняя мутагенная активность; (+++) сильная мутагенная активность. Образцы почв: 1 - территория рынка строительного материала, 3 - почва на рынке "Shonkhor"

Модельные условия засухи, в принципе оказывающие сходное влияние на микрофлору почв, могут вызвать как некоторое снижение мутагенного потенциала (как показано для почв Татарстана, табл. 6), так и его увеличение (как установлено для почв Монголии, табл.7) в зависимости от вида почв.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании предложенного Добровольским [1997] деления функциональных зон города на группы: жилая зона, промышленная зона, природный комплекс, мы распределили результаты исследований генотоксичности образцов почв г.Казани и г.Улан-Батора по группам: 1 - почвы около автострады, 2 - илы муниципальных очистных сооружений, 3 - почвы территории жилой зоны. В отдельную группу 4 мы выделили почвы территории рынков.

Генотоксическое состояние почв группы 1

Самым интенсивным источником загрязнения почв в городе является автотранспорт, на который приходится 49% от общего объема загрязнений [Капанова, 1992]. Выхлопные газы автомобилей содержат около 200 компонентов (углекислый и угарный газ, окислы азота, альдегиды, тяжелые металлы, бензапирен, сажа и др.). Показано, что около 20% выбросов автотранспорта оседает в непосредственной близости от автодорог.

К этой группе почв относятся образцы 4 и 6 г.Улан-Батора и пробы 1 и 6 г.Казани. По статистике, в г.Казани насчитывается 580 тыс, а в г.Улан-Баторе около 36 тыс. автомобильных средств.

Наши данные подтверждают, что почвы около автострады обладают токсичностью (рис.1, 2), они проявили максимальный токсический эффект. (выживаемость бактерий 5,9%). Водные вытяжки почв автострады г.Казани проявили также мутагенную активность с метаболической активацией и без нее (рис.3). Для почв автострады г.Улан-Батора в опытах с метаболической активацией зарегистрирован мутагенный эффект средней силы (рис.3, 4). Все образцы, почв в районах связанных с автотранспортом как в Казани, так и Улан-Баторе, обладали ДНК-повреждающей активностью (табл 2, 3). Мы показали, что содержание органики в них довольно высокое, особенно в почвах г.Казани (рис.5).

В связи с изложенным результаты исследований позволяют нам утверждать, что один из ведущих факторов мутагенного загрязнения почв - это автотранспорт.

Генотоксическое состояние образцов группы 2

Одним из основных источников загрязнения почв признаны выбросы промышленных отходов.

6. Химический анализ образцов почв Монголии и Татарстана

6.1. Сравнительные данные содержания общего органического вещества по количеству $-CH_2-CH_2-$, и CH_3-CH_2- групп в почвенных экстрактах Монголии и Татарстана показывают, что в иле очистных сооружений обоих городов содержание органического вещества максимально. В почвах автотрассы, рынка и авторынка Татарстана содержание органики выше, чем в аналогичных пробах Монголии. Содержание $-CH_2-CH_2-$, и CH_3-CH_2- групп в центрах обоих городов практически одинаковое (рис.5).

6.2. В иле очистных сооружений г.Казани содержание свободного гистидина было около 50 мкг/мл, так же, как и в активном иле очистных сооружений г.Улан-Батора. Остальные исследуемые почвы содержат гистидин в количествах меньше чем 7 мкг/мл. Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что мутагенность почвенных экстрактов обоих городов, зарегистрированная в тесте Эймса, не является артефактом, поскольку все пробы содержали гистидин в количествах меньших, чем это необходимо для удвоения числа ревертантов.



Рис.5 Содержание органических компонентов в почвенных экстрактах Монголии и Татарстана. Образцы почв: а - почва вдоль автострады, б - центр города, в - рынок, г - пригородная зона, д - ил городских очистных сооружений, е - почва на территории авторынка.

Сегодня в г.Казани, за исключением нескольких локальных (например, для завода Органического синтеза), как и в г.Улан-Баторе, работает одно городское базовое очистное сооружение. Образец 5 г.Улан-Батора - ил городских очистных сооружений - находится в промышленной зоне, в р. Khan-Uul, мимо течет река Тула. Образец 5 г.Казани - ил городских очистных сооружений, куда поступают бытовые и большинство промышленных стоков.

Установлено, что из всех исследуемых образцов в илах очистных сооружений обоих городов содержится наибольшее количество органических компонентов (рис.5). Илы очистных сооружений обоих городов проявляют и токсический, и ДНК-повреждающий эффекты (рис.1, 2 и табл.2, 3). Водные вытяжки ила очистных сооружений г.Казани проявили мутагенную активность без метаболической активации. С метаболической активацией илы очистных сооружений обоих городов обладали мутагенностью для всех исследуемых вариантов растворителей (рис.3, 4).

Таким образом, промышленные отходы г.Казани и г.Улан-Батора обладают генотоксичностью и служат важным источником загрязнения почв.

Генотоксическое состояние почв группы 3

Основным элементом структуры города являются проспекты, улицы. Результаты исследования почв центра обоих города показывают большую токсичность. Все образцы, кроме водной вытяжки пригородной зоны г.Казани, демонстрируют отсутствие мутагенности как водных, так и органических экстрактов (рис.3, 4). В центре г.Улан-Батора содержание органического вещества велико, возможно, поэтому органические вытяжки этого участка максимально ингибировали рост *E.coli* *wp2* в тесте на повреждение ДНК (табл.3). Генотоксическая активность почв у.Khangain-21 и центра города Улан-Батора выше, чем в других участках города, что зависит от санитарно-гигиенического состояния этих участков, числа населения и автодвижения. Именно около у.Khangain-21 находится автостоянка автомобилей грузовых перевозок.

Для образцов жилой зоны г.Казани показана самая низкая генотоксичность среди исследованных почв.

Генотоксическое состояние почв группы 4

Рынок - это один из пунктов уплотнения населения и автотранспорта города. Результаты наших исследований доказали, что по генотоксическому

состоянию рынок "Shonkhor" г.Улан-Батора и Колхозный рынок г.Казани являются самыми опасными местами среди всех исследуемых почв.

Значительный токсический и ДНК-повреждающий эффекты установлены для почв рынка "Shonkhor", рынка строительного материала г.Улан-Батора и почв на территории Колхозного рынка г.Казани. Водные вытяжки этих почв проявили мутагенность средней силы (рис.3). Это означает, что не только промышленность, но и бытовые загрязнения вносят вклад в генотоксический потенциал почв.

Изучение корреляционной зависимости между химическими и биологическими показателями исследуемых почв.

Нами проведены исследования по выявлению возможности корреляции между тремя параметрами - содержанием органических веществ, токсичностью и мутагенностью (с метаболической активацией и без нее) для исследуемых почв Монголии и Татарстана.

Расчет коэффициента корреляции этих параметров показал, что между показателями не обнаружено практически никаких корреляционных зависимостей, что свидетельствует о необходимости проведения тестов на токсичность и мутагенность, результаты которых не могут быть предсказаны на основе данных химического анализа (табл.8).

Таблица 8

Коэффициент корреляции генотоксических, токсических и аналитических показателей, характеризующих почвы Монголии и Татарстана

Показатель	Токсичность		Мутагенность			
			-S9		+S9	
	Мон	Тат	Мон	Тат	Мон	Тат
Органические вещества	-0,32977	0,220599	-0,45208	0,05413	0,72537	0,72152
Токсичность	-	-	0,45371	0,22057	-0,3723	0,67059

ВЫВОДЫ

1. Водные и органические вытяжки образцов почв столиц Монголии и Татарстана обладают токсическим эффектом, зарегистрированным по ингибированию роста бактерий. Величина эффекта для Улан-Батора максимальна в почвах центральной части города, а для Казани - в почвах вблизи мощной городской автострады.

2. Как водные, так и органические экстракты почв Улан-Батора и Казани проявляют ДНК-повреждающее действие на штаммах *E. coli*, дефектных по различным типам репарации. Величина эффекта наиболее выражен в почвах территорий, связанных с автотранспортом, а также в илах городских очистных сооружений.

3. На территории исследованных городов органические экстракты почв проявляли мутагенность лишь после метаболической активации микросомной фракцией печени крыс. Индукция генных мутаций водными вытяжками почв была гораздо выше. Для ряда образцов почв Татарстана (автострада, территория рынка) количество индуцированных ревертантов *S.typhimurium TA100* в 45-60 раз превышало спонтанный фон мутирования. В целом почвы Казани по сравнению с почвами Улан-Батора более мутагенны.

4. В условиях модельного стресса, вызванного искусственной засухой или индукцией анабиотического состояния бактерий введением в почву микробного ауторегулятора (гексилрезорцинол), наблюдали уменьшение численности колониеобразующих микроорганизмов и изменение соотношения морфотипов доминирующих видов бактерий. При этом изменился и мутагенный потенциал почвы, что может быть обусловлено как физико-химическими (испарение летучих веществ, взаимодействие с ауторегулятором), так и биологическими (снижение метаболической активности микрофлоры) факторами.

5. Математическая обработка результатов не выявила корреляционных зависимостей между содержанием органического вещества, токсичностью и мутагенностью почвенных образцов, что свидетельствует о необходимости экспериментального определения такого важного показателя состояния почв, как генотоксичность.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Чойдаш Батцэцэг., Иванченко О.Б. Роль цитохром – Р 450 зависимой монооксигеназной системы в трансформации мутагенного потенциала / Ферменты микроорганизмов XII юбилейная конференция. - Казань, - 2001. - С.145
2. Schmidt M.A., Choidash Battsetseg., Karamova N.S., Ilinskaya O.N. Estimation of mutagenic activity of synthetic phosphororganic compounds in

microbial test-system / Abst.1st sci. conf. SEC of KSU "Materials and Technology XXI", Kazan Uni-press, -P. 85-86

3. Чойдаш Батцэцэг., Иванченко О.Б., Карамова Н.С., Ильинская О.Н. Оценка суммарной мутагенной активности почв Улан-Батора // МонГУ. Науч.жур. - Улан-Батор, - 2001. N13. - С.116-123

4. Choidash Battsetseg., Ilinskaya O.N., Ivanchenko O.B., Karamova N.S. The Estimation of DNA-damaging activity of soil samples // Nat.Un.of Mon. Sci.journal. -Ulaanbaatar, - 2001. N13. - P.105-113

5. Карамова Н.С., Иванченко О.Б., Ильинская О.Н., Чойдаш Батцэцэг. Значение физиологического состояния бактерий на возникновение мутаций / XVIII съезд физиологического общества имени И.П.Павлова. -Казань, - 2001. - С.618

6. Чойдаш Батцэцэг., Ильинская О.Н. Улаанбаатар хотын зарим газрын хорсний хоруу чанарын судалгаа (Исследование генетической токсичности некоторых почв города Улан-Батора) / МонГУ. Науч.жур. - Улан-Батор, - 2001.N13. - С.113-116

7. Чойдаш Батцэцэг., Ильинская О.Н. Генотоксический потенциал образцов почв Монголии, подвергшихся антропогенному воздействию / Матер.39 междунар. студ. конфер."Студент и научно-технический прогресс", Биология, часть 2. - Новосибирск, - 2001. Изд.НГУ. - С.80

8. Ильинская О.Н., Колпаков А.И., Зеленихин П.В., Круглова З.Ф., Чойдаш Батцэцэг., Эль-Регистан Г.И. Влияние аутоиндукторов анабиотического состояния бактерий на геном микробной клетки // Микробиология. – 2002. Т.71, N2. - С.164-168

9. Choidash Battsetseg., Ilinskaya O.N., Ivanchenko O.B Evaluation of soil samples mutagenicity from Mongolia in Ames test // Ecology and iife. International journal. Issue 6. 2nd edition. Novgorod State University. - 2002. - P.32

10. Иванченко О.Б., Чойдаш Батцэцэг., Карамова Н.С., Ильинская О.Н. Генотоксичность как показатель экологического состояния почв // Вестник Татарского отделения РЭА. – 2002. N5

11. Choidash Battsetseg., Ilinskaya O.N, Ivanchenko O.B., Karamova N.S. Genotoxic effects of natural soil samples of Ulaanbaatar area // Mat. 2nd int. conf. "Ecological problems of Mongolia and Japan", - 2001, Tokio, Japan (in print)