

УДК 574.24/577.334

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ПОСЛЕДСТВИЯ СЛАБЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ ВОДНОЙ СРЕДЫ

О.П. Мелехова, Г.В. Коссова, С.М. Падалка, Е.Н. Калистратова

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Работа посвящена проблеме нормирования качества водной среды. Приведены данные, полученные авторским запатентованным методом определения качества воды на эмбриональных биотестах на основе метаболического критерия – уровня свободнорадикальных реакций. Показано, что малые дозы воздействий – концентрации солей тяжелых металлов, считающиеся допустимыми, – являются критичными для эмбрионов и личинок гидробионтов; хроническое воздействие дозы поллютантов на порядок ниже ПДК резко нарушает метаболический гомеостаз и вызывает аномалии развития и гибель; слабые дозы также заметно снижают жизнеспособность взрослых гидробионтов. Обсуждается вопрос о необходимости пересмотра принятых уровней ПДК с учетом биологических эффектов малых доз.

Ключевые слова: свободные радикалы, эмбриональные биотесты, биологический контроль среды.

Введение. Современная техногенная среда становится все более химически агрессивной. Нормирование качества водной среды в настоящее время производится на основе санитарно-гигиенических нормативов определения предельно допустимых концентраций (ПДК) химических веществ.

Эта система нормирования имеет ряд недостатков, связанных с характерными реакциями живого на внешние воздействия. Любые средовые факторы действуют на организмы интегрально. Кроме того, необходимо учитывать кумулятивные эффекты: накопление действующего вещества в отдельных организмах, в окружающей среде, а также по пищевым цепям. Некоторые поллютанты могут усиливать, ослаблять или качественно изменять действие других. Наконец, существенным недостатком нормирования среды по отдельным физико-химическим показателям является то, что не учитываются обнаруженные в последние десятилетия парадоксальные эффекты малых и сверхмалых доз физических и химических воздействий [1, 5]. Экспериментально показано, что область малых доз лежит, как правило, на два порядка ниже летальной дозы (LD_{50}) для данного объекта [1]. Однако для каждого воздействия и для каждого вида организмов LD_{50} индивидуаль-

на. При этом существующие стандарты загрязнений, как правило, учитывают состояние взрослых организмов, не рассматривая наиболее чувствительные ранние фазы жизненных циклов. В условиях техногенного воздействия на природные экосистемы снижение численности популяций водных животных происходит в значительной мере за счет эмбриональной и личиночной смертности.

Цель исследования. Обсуждение проблемы нормирования качества воды и пересмотра принятых уровней ПДК с учетом биологических эффектов малых доз. Необходимо принять во внимание, что реальная ситуация в техногенно измененных природных экосистемах – это хроническое воздействие на биоту обширного спектра поллютантов в малых дозах.

Материалы и методы. Нами разработаны и запатентованы методы эмбриомониторинга и биотестирования по метаболическому критерию – уровню свободнорадикальных (СР) реакций [8, 9]. По изменениям уровня свободнорадикальных реакций возможно измерить окислительный стресс – нарушения клеточного окислительно-восстановительного гомеостаза, характеризующие начальный этап многих патологических состояний. Клеточный гомеостаз поддерживается относи-

тельным равновесием прооксидантных и антиоксидантных систем клетки. Это равновесие определяет устойчивость или чувствительность клетки к повреждениям и возможности адаптации. В качестве биотестов применяются взрослые пресноводные и морские гидробионты, а также их личинки и эмбрионы в критических (особо чувствительных) стадиях развития. В работе приводятся данные о результатах биотестирования микроэлементов (меди, лития и др.) в летальных, предельно допустимых и витальных концентрациях. Эти элементы в микроскопических дозах необходимы организмам животных, их влияние на живые организмы разнообразно, однако превышение физиологически необходимых концентраций является причиной возникновения многих заболеваний человека и снижения жизнеспособности популяций животных.

Токсическое действие испытываемых веществ определяли по метаболическому критерию экспрессно – в течение 90 мин при помещении объекта в загрязненную (испытываемую) среду. Величина отклонения измеряемого показателя (уровня СР-реакций) от контроля сильно различается при действии разных токсикантов. Эти различия характеризуют степень повреждения. Однако динамика ответа метаболической системы на внешние воздействия обычно носит сложный фазовый характер. Химические вещества могут быть либо ингибиторами, либо промоторами окислительных свободнорадикальных реакций. Наши многочисленные эксперименты на различных биотестах свидетельствуют о том, что абсолютная величина отклонения уровня метаболических СР-реакций от контроля в первые часы воздействия имеет диагностическое значение и в тех случаях, когда достигает более 30–40 %, коррелирует с началом патологических процессов в организме. В приведенных примерах значительные сдвиги показателя уровня окислительного метаболизма – СР-реакций – в первые 90 мин адаптации к загрязненной среде соответствуют гибели большей части зародышей через 2 сут.

Уровень свободнорадикальных процессов регистрировался методом привитой ради-

кальной сополимеризации (ПС) [2, 3] с применением радиоактивного индикатора. Поэтому результаты выражены в единицах радиоактивности опытного и контрольного образцов [3, 8].

Инкубировали зародыши в присутствии токсикантов различной природы в концентрациях, близких к предельно допустимым для рыбохозяйственных водоемов.

Полученные данные подвергали статистическому анализу с применением компьютерных программ обработки статистических данных Statistica 6 (USA, Statsoft. Inc.).

Результаты и обсуждение. В табл. 1 обобщены результаты экспрессного биотестирования качества воды по метаболическому критерию на гастрюлах амфибий. Гастрюляция является критической (особо чувствительной) фазой эмбриогенеза, так как в это время детерминируется осевой зачаток позвоночных.

Применение чувствительных эмбриональных тестов показало, что концентрации солей меди и лития, считающиеся допустимыми, оказывают явное токсическое действие на ранние стадии развития гидробионтов [4].

Опыты по биотестированию загрязнения воды ионами меди на морских и пресноводных гидробионтах проводили на Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова МГУ.

В качестве биотестов применены колонии морского гидроидного полипа *Obelia loveni* (табл. 2), личинки *Nereis virens* (табл. 3), а также взрослые особи пресноводного брюхоногого моллюска *Lymnea stagnalis* L. (табл. 4). Концентрации раствора CuCl_2 в морской воде составляли от 12,5 до 50 мкг/л (фоновые значения концентрации ионов меди для Белого моря – 7–9 мкг/л). Для опытов с пресноводными моллюсками были выбраны концентрации CuCl_2 – 0,1 и 1,0 мкг/л. Таким образом, мы тестировали растворы заведомо витальных концентраций. Для того чтобы проверить, являются ли метаболические изменения, экспрессно регистрируемые нами, началом каких-либо патологических процессов, мы в каждом случае вели более длительные наблюдения, что отражено в последней графе каждой таблицы.

Таблица 1

**Определение эмбриотоксичности различных химических соединений
по метаболическому критерию (объект – гастролы шпорцевой лягушки)**

Испытываемое вещество	Концентрация		Удельная радиоактивность, имп./мин·шт.	Удельная радиоактивность**, %	Заключение по экспрессному биотестированию	Гибель/уродство, % (суммарно за 2 сут)
	мг/л	доли от ПДК*				
Вода	–	–	141	–	Нетоксично	
Медный купорос	0,04	10 ПДК	234	66	Токсично	Гибель – 100 %
	0,004	ПДК	201	43	Токсично	Гибель – 60 %
	0,0004	0,1 ПДК	176	25	Низкая токсичность	Гибель – 20 %
Хлористый литий	1,5	10 ПДК	325	130	Низкая токсичность	Гибель – 100 %
	0,15	ПДК	238	69	Низкая токсичность	Гибель – 100 %
	0,015	0,1 ПДК	296	110	Низкая токсичность	Гибель – 50 %, замедленное и аномальное развитие – 50 %

Примечания: * Используются значения ПДК, принятые для рыбоводных водоемов.

** Удельная радиоактивность вычисляются по формуле $\frac{\text{опыт} - \text{контроль}}{\text{контроль}} \times 100\%$.

Таблица 2

Биотестирование хлорида меди (объект – гидродный полип *Obelia loveni*)

Концентрация раствора CuCl ₂ , мг/л	Метод радикальной полимеризации			Кол-во дегенерировавших полипов, %
	Срок инкубации с ¹⁴ C-АА, ч	Радиоактивность пробы, dpm/мг ± σ	Δ, %	
Контроль (растворитель) – чистая морская вода	7	89,1±18,2	–	18
12,5	7	50,8±4,8	-43	Нет данных
25	7	44,4±7,2	-50	41
50	7	52,7±6,5	-40,8	Около 50

Таблица 3

Биотестирование хлорида меди
(объект – личинки (нектохеты) многощетинкового червя *Nereis virens*)

Концентрация раствора CuCl_2 , мкг/л	Метод радикальной полимеризации			Состояние личинок через 48 ч
	Срок инкубации с ^{14}C -АА, ч	Радиоактивность пробы, $\text{dpm}/\text{mg} \pm \sigma$	Δ , %	
Опыт 1. Средняя нектохета: критическая стадия				
Контроль (растворитель) – чистая морская вода	18	58,5±4,2	–	Двигательная активность имеется у 100 %
25	18	45,2±10,6	-21,7	Нарушение двигательной активности у 80 % особей
50	18	40,8±17,9	-30	Нарушение двигательной активности у 100 % особей
Опыт 2. Поздняя нектохета				
Контроль	9	83,0±27,3		
12,5	9	63,6±28,7	-23,4	Размеры, как в контроле
25	9	125,9±49,2	50,17	Размеры меньше, чем в контроле
50	9	181,05±49,7	118	Размеры меньше, чем в контроле

Таблица 4

Биотестирование хлорида меди при суточном воздействии
на пресноводного брюхоногого моллюска *Lymnaea stagnalis L.*

Концентрация раствора CuCl_2 , мкг/л	Метод радикальной полимеризации			Состояние прудовиков при хроническом воздействии (в течение 53 сут)
	Срок инкубации с ^{14}C -АА (индикатором)	Радиоактивность пробы, $\text{dpm}/\text{mg} \pm \sigma$	Δ , %	
Контроль	8 ч с ^{14}C -АА	214,2±31,5	–	
1	24 ч в растворе, в т.ч. с АА – 8 ч	90,8±22,8	-58	Выживаемость на 30 % ниже контроля, плодовитость на 42 % ниже контроля
0,1	24 ч в растворе, в т.ч. с АА – 8 ч	249,2±57,7	Недостоверно	Различия с контролем недостоверны

Таким образом, применение метода ПС на чувствительных к чистоте воды морских объектах позволяет регистрировать изменения уровня окислительного метаболизма в ответ на весьма кратковременное (7 ч) содержание тест-объектов в присутствии низких (всего в 1,5–3 раза выше фоновых) для Белого моря концентраций ионов меди: 12,5–25,0 мкг/л. Известно, что такие металлы, как медь, усиливают образование активных форм кислорода и вторичных свободных радикалов, что ведет к развитию перекисного окисления липидов мембран, повреждению ДНК, изменению гомеостаза кальция, денатурации белков. Некоторые авторы считают, что важной мишенью тяжелых металлов в клетке является глутатион – представитель защитной антиоксидантной системы [6]. Малые дозы воздействия, по-видимому, активизируют защиту, а продолжительное действие – истощает защитные механизмы, что приводит к росту уровня СР. Чувствительными тест-объектами оказались колонии гидроидного полипа *Obelia* и личинки *Nereis virens*. На обоих объектах удалось показать также наличие морфофункциональных изменений, наступающих в более поздние сроки (повышение процента дегенерировавших гидрантов у *Obelia*, нарушение двигательной функции и замедление роста у личинок *Nereis*). Характерно также то, что при хроническом воздействии (120 сут) на моллюсков *Lymnaea stagnalis* витальной концентрации распространяемого компонента сточных вод – трифенилоловохлорида – второе поколение – молодь, развившаяся в слаботоксичной среде, – имело значительно нарушенные морфологические и метаболические показатели и почти полностью погибло при повышении температуры воды (контрольная группа полностью выжила).

Также мы исследовали на эмбрионах (нейрулах) шпорцевой лягушки концентрационные эффекты сульфата меди на уровень СР-реакций. Получена дозовая кривая с отчетливыми максимумами в области малых (10^{-5} – 10^{-7} мг/л) и средних (0,1–1 мг/л) доз, разделенных «мертвой зоной», в которой эффект не обнаруживается. Такие бимодальные дозовые кривые характерны для «парадок-

сальных эффектов малых доз», которые интенсивно исследуются в настоящее время. Для этих эффектов характерна также сенсбилизация объектов к последующим воздействиям.

На личинках бесхвостых амфибий *Xenopus laevis* D. проведено биотестирование слабых концентраций пестицида ДДТ. Показано, что при хроническом воздействии ДДТ в концентрации 0,03 мг/л (что составляет 0,01 от медианной летальной концентрации) наблюдается изменение двигательной активности и меланофорных адаптивных реакций. Таким образом, признаки снижения жизнеспособности у личинок земноводных заметны при хроническом воздействии концентраций пестицидов ниже считающихся предельно допустимыми.

В наших опытах с воздействием малых доз ДДТ (0,1–0,01 ПДК) на гастролы того же вида амфибий в течение 2 сут наблюдали гибель 100 % эмбрионов. При этом в первые 90 мин содержания в загрязненной ДДТ среде уровень индикаторных СР-реакций резко (на 80 %) превышал контрольный [7].

Заключение. Малые и сверхмалые дозы поллютантов, считающиеся допустимыми, весьма критичны для развивающихся гидробионтов. Постоянное присутствие поллютантов даже в слабых концентрациях снижает жизнеспособность взрослых гидробионтов и приводит к гибели эмбрионов, что нарушает экологическое равновесие.

Таким образом, экологические последствия частых или постоянных загрязнений природных водоемов могут быть обусловлены снижением численности популяций гидробионтов за счет эмбриональной и личиночной смертности и сенсбилизации взрослых особей к последующим внешним воздействиям.

Полученные данные явно указывают на необходимость включения в систему нормирования качества воды наряду с аналитическими физико-химическими также методы биологического контроля, в т.ч. эмбриомониторинг.

тивных веществ и низкоинтенсивных физических факторов // Химическая физика. 2003. Т. 22, № 2. С. 106–114.

2. Козлов Ю. П. Привитая сополимеризация как метод исследования свободных радикалов в биологических системах. М. : Изд-во МГУ, 1970. 63 с.

3. Мелехова О. П. Свободнорадикальные процессы в эмбриогенезе // Онтогенез. 1976. Т. 7, № 2. С. 131–140.

4. Мелехова О. П. Свободнорадикальные процессы в эпигеномной регуляции развития. М. : Наука, 2010. 324 с.

5. Мелехова О. П., Егорова Е. И. Биологический контроль окружающей среды. Биоиндикация и биотестирование. М. : Academia, 2008. 288 с.

6. Морские организмы – мониторы загрязнения вод. Биохимические механизмы адаптации

к действию тяжелых металлов / Н. К. Христофорова [и др.] // Методы оценки состояния природной среды. Владивосток : ДВНЦ СССР, 1987. С. 141–152.

7. Реакции пигментной системы личинок земноводных на малые концентрации некоторых пестицидов / Л. Д. Воронова [и др.] // Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем. Л. : Гидрометеиздат, 1983. Т. IV. С. 77–90.

8. Способ биоиндикации загрязнения водной среды : а. с. / О. П. Мелехова [и др.]. № 1546904 – 1988.

9. Способ определения эмбриотоксичности химических соединений и их комплексов : пат. / О. П. Мелехова, Г. В. Коссова. № 2073868. 20.02.1997.

ECOLOGICAL EFFECTS OF THE SLIGHTLY POLLUTED WATER ENVIRONMENTS

O.P. Melekhova, G.V. Kossova, S.M. Padalka, E.N. Kalistratova

Moscow State University

This study relates to the problem of introducing the quality standards of the water environments. The subject data were acquired using the author's method (patented) of analyzing the water quality through the response, of the biological embryo tests (hydrobionts), evaluated with a metabolic criterion – the level of free-radical reactions. Thereby, the contents in the water of heavy metal salts commonly regarded tolerable were found to have the critical effect on the hydrobiont embryos larvae. Long-term dwelling in the waters polluted even an order of magnitude below the standard MPC are shown to greatly violate metabolic homeostasis, and, hence, cause anomalous development and early death. These low doses also appeared reducing the adult hydrobionts vitality. The current legal MPC levels of the small pollutant are discussed as to be urgently reconsidered by taking into account their detrimental biological effects.

Keywords: free radicals, embryo tests, low doses, embryotoxicity, biological control.