

На правах рукописи

АМОСОВА Антонина Александровна

ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ
СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ЛУК РЕПЧАТЫЙ
В УСЛОВИЯХ МОДИФИЦИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА АКТИВНОГО ИЛА

03. 00. 16 - экология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Самара – 2004

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования “Самарский государственный университет”

Научный руководитель:

Доктор биологических наук,
заслуженный деятель Науки РФ профессор Попченко Виктор Иванович

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук Сюков Валерий Владимирович

Доктор биологических наук, профессор Усманов Искандер Юсуфович

Ведущая организация: Воронежский государственный университет

Защита состоится 16 ноября 2004 года в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного Совета К 212.218.02 при Самарском государственном университете по адресу: 443011, г. Самара, ул. Академика Павлова, 1, зал заседаний.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Самарского государственного университета

Автореферат разослан « 15 » октября 2004г.

Ученый секретарь
диссертационного Совета

Ведясова О.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Тяжелые металлы и их соли на сегодняшний день относят к числу наиболее распространенных загрязнителей, поступающих в биоценозы вместе с промышленными отходами, однако, несмотря на свою опасность, воздействие тяжелых металлов на живые организмы изучено недостаточно. Необходимо комплексное исследование механизмов биологического действия солей тяжелых металлов, позволяющее построить ряды токсичности и мутагенности как для катионов, так и для анионов. Не решена проблема поиска факторов, позволяющих снизить последствия «металлического стресса» для отдельных биоценозов и экосистемы в целом. Не исследована специфическая способность поликультуры активного ила компенсировать токсичное и мутагенное воздействие соединений тяжелых металлов на живые организмы. Все это обуславливает актуальность проблемы.

Связь темы диссертации с плановыми исследованиями.

Представленная работа связана с планом основных научно-исследовательских работ кафедры зоологии, генетики и общей экологии СамГУ по теме НИР "Деятельность экологических систем и механизмы их регуляции".

Цель работы и задачи исследования. Целью работы явилось изучение токсичности, цитотоксичности и мутагенности нитратов, сульфатов и хлоридов марганца, никеля, хрома и кадмия для лука репчатого (*Allium cepa*), а также исследование способности активного ила модифицировать силу воздействия данных солей тяжелых металлов. В задачи исследования входило: 1) определение токсичности и цитотоксичности двухвалентного марганца, никеля, кадмия и трехвалентного хрома для лука репчатого; 2) изучение способности двухвалентного марганца, никеля, кадмия и трехвалентного хрома индуцировать хромосомные aberrации в клетках корневой меристемы лука репчатого; 3) исследование влияния анионов (Cl^{-1} , SO_4^{-2} , NO_3^{-2}) солей исследуемых тяжелых металлов на ростовые процессы, пролиферативную активность и хромосомный аппарат корневой меристемы лука репчатого; 4) определение способности поликультуры активного ила изменять токсичные, цитотоксичные и мутагенные свойства солей тяжелых металлов; 5) оценка модифицирующих свойств активного ила в условиях водной и почвенной культур; 6) выявление основных тенденций аккумуляции ионов марганца, хрома, никеля и кадмия микроорганизмами активного ила.

Научная новизна. Автором впервые проведен сравнительный анализ способности катионов (Mn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{3+}) и анионов (Cl^{-1} , SO_4^{-2} , NO_3^{-2}) солей металлов ингибировать рост корешков, изменять пролиферативную активность корневой меристемы, а также вызывать появление хромосомных aberrаций в клетках корневой меристемы лука репчатого *Allium cepa*. Впервые определена способность активного ила модифицировать негативное влияние солей тяжелых металлов на лук репчатый, выявлены основные тенденции в

аккумуляции различных солей тяжелых металлов микроорганизмами активного ила.

Теоретическое значение работы. Полученные результаты конкретизируют представление о механизмах негативного воздействия солей тяжелых металлов на живые организмы и способах снижения этого действия. Материалы, отраженные в диссертации, могут быть использованы в области прикладной экологии и растениеводства.

Практическое значение работы. Материалы диссертации, сформулированные в ней научные положения и выводы могут найти применение при решении проблем рекультивации почв, подвергшихся техногенному загрязнению. Они могут служить для целенаправленного использования избыточного активного ила, скапливающегося на станциях биологической очистки сточных вод.

Реализация результатов исследований.

Результаты проведенных по диссертации исследований используются в учебном процессе в Самарском государственном техническом университете на кафедре химической технологии и промышленной экологии.

Апробация работы. Основные результаты проведенных исследований доложены на VIII Всероссийском Конгрессе серии «Экология и здоровье человека» по теме: «Актуальные проблемы экологии человека» (Самара, 2002 г); Областной научной конференции Самарского союза молодых ученых «Молодые ученые – науке и производству» (Самара, 2002 г); Двадцать восьмой научной конференции молодых ученых и специалистов СамГУ (Самара, 2003 г); Межкафедральном коллоквиуме биологического факультета СамГУ (Самара, 2004 г).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 работ.

Декларация личного участия автора. Автором в период 2000-2003 год лично проведены все экспериментальные исследования. Подготовка растительных образцов для цитогенетического анализа, анателофазный анализ препаратов, определение массовой концентрации ионов металлов фотометрическим методом, математическая обработка цифровых данных, написание текста диссертации осуществлены автором самостоятельно.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Нитраты, хлориды и сульфаты двухвалентного марганца, кадмия, никеля и трехвалентного хрома оказывают токсическое и цитотоксическое действие на лук репчатый *Allium cepa* L. С увеличением концентрации возрастает токсичность и цитотоксичность исследуемых солей тяжелых металлов, причем определяют токсичность катионы.

2. Катионы солей тяжелых металлов различаются по токсичности и цитотоксичности. В низких концентрациях солей тяжелых металлов (от 0,001 мг/мл до 0,1 мг/мл) токсичность и цитотоксичность исследуемых катионов убывает в следующем ряду: $Cd^{2+} > Mn^{2+} \geq Cr^{3+} > Ni^{2+}$, в высоких концентрациях 1 мг/мл и 10 мг/мл убывающий ряд выглядит таким образом: $Mn^{2+} > Cr^{3+} > Ni^{2+} > Cd^{2+}$. Анионы достоверно не влияют на ростовые процессы, пролифера-

тивную активность и хромосомный аппарат клеток корневой меристемы *Allium* *sepa* L.

3. Исследуемые соли тяжелых металлов являются мутагенами для *Allium* *sepa* L., причем на развитие мутагенного ответа достоверно влияют и анионы и катионы. Для нитратов способность индуцировать хромосомные aberrации убывает в следующем ряду: $Ni^{2+} > Cd^{2+} > Cr^{3+} > Mn^{2+}$; для сульфатов - $Ni^{2+} > Cd^{2+} = Cr^{3+} = Mn^{2+}$; для хлоридов - $Cr^{3+} > Ni^{2+} > Cd^{2+} > Mn^{2+}$.

4. Внесение поликультуры активного ила в растворы исследуемых солей тяжелых металлов достоверно снижает их токсичность, цитотоксичность и мутагенность по отношению к луку репчатому; способность активного ила понижать токсичность солей тяжелых металлов проявляется как в водной, так и в почвенной культурах. Модифицирующее действие активного ила на биологическую активность солей тяжелых металлов связано с аккумуляцией активным илом катионов солей тяжелых металлов. Способность активного ила к поглощению катионов тяжелых металлов убывает в следующем ряду: $Cr^{3+} > Ni^{2+} \geq Cd^{2+} > Mn^{2+}$.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 149 страницах и состоит из введения, 5 глав, выводов, списка литературы и 12 приложений. Работа иллюстрирована 44 рисунками и содержит 12 таблиц. Библиография включает 222 литературных наименования.

1. БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ (обзор литературы)

На основании анализа научной литературы (222 источника) рассмотрена биологическая активность тяжелых металлов и их соединений. Освещены особенности токсичного и генотоксичного воздействия ионов тяжелых металлов на структуру клетки и всего организма в целом, и основные механизмы выработки адаптационного ответа. Рассмотрены механические, химические и биологические способы восстановления техногеннозагрязненных территорий с повышенным содержанием тяжелых металлов. Дана подробная характеристика активного ила как поликультуры микроорганизмов, способной к деструкции и аккумуляции органических и неорганических соединений.

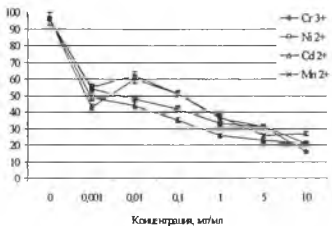
2. УСЛОВИЯ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служил лук репчатый *Allium* *sepa* L., рекомендованный ВОЗ как стандартный объект исследования для анализа токсичности и генотоксичности веществ, и поликультура активного ила биологических очистных сооружений ОАО «Куйбышевского НПЗ» г. Самары, предложенная в качестве тест-системы для модификации негативного воздействия исследуемых солей тяжелых металлов. Анализировалась токсичность, цитотоксичность и мутагенность двухвалентного марганца, никеля, кадмия и трехвалентного хрома, относящихся к числу наиболее распространенных ксенобиотиков из-за широкого использования в металлургической промышленности, производстве аккумуляторов и т.д. Токсичность исследуемых со-

единений оценивалась по ингибированию ростовых процессов и общему количеству погибших семян. Исследование мутагенности тяжелых металлов проводилось методом анателофазного анализа (Руководство..., 1989). Способность ионов тяжелых металлов проникать в клетку анализировалась с помощью методики определения плазмолитической активности химических веществ (Викторов, 1991). Определение биологической активности солей тяжелых металлов в присутствии активного ила проводилось по вышеприведенным методикам. Оценку токсичности солей тяжелых металлов в условиях почвенной культуры проводили с помощью методик определения зольности и количества несвязанной воды (Практикум..., 1989). Способность активного ила аккумулировать ионы тяжелых металлов анализировалась фотометрическим методом (Методика..., 1996). Математическая обработка данных проводилась с использованием полного двухфакторного дисперсионного анализа и стандартных методов оценки достоверности различий между опытом и контролем (Плохинский, 1970).

3. ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ И МУТАГЕННОСТИ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Проведенные исследования показали, что все исследуемые соли тяжелых металлов ингибируют прорастание семян лука репчатого, что говорит об их высокой токсичности. Полный двухфакторный дисперсионный анализ показал, что развитие токсического ответа достоверно зависит ($P < 0,01$) только от природы катиона и его концентрации. Как видно из рис.1 все катионы металлов ингибируют прорастание



семян примерно одинаково. Математическая обработка полученных результатов показала, что токсичность достоверно уменьшается в следующем ряду $Cd^{2+} > Mn^{2+} > Cr^{3+} > Ni^{2+}$ ($P < 0,01$), в то время как анионы исследуемых солей достоверно не влияют на токсичность.

Рис.1. Влияние катионов солей тяжелых металлов на всхожесть семян лука репчатого, %

Морфометрический анализ влияния солей тяжелых металлов на ростовые процессы корешков лука в опыте был всегда меньше, чем в контроле, что указывает на явное ингибирование роста (рис.2).

Двухфакторный дисперсионный анализ выявил достоверность влияния катионов тестируемых солей ($P < 0,01$), анионы также не оказывали существенного воздействия. Ряд фитотоксичности, построенный по результатам данного эксперимента $Cd^{2+} > Mn^{2+} > Cr^{3+} > Ni^{2+}$ совпадает с выше предложенным рядом. Различия в токсичности исследуемых тяжелых металлов, в первую очередь, обусловлены различиями в их химическом строении. Ярко выраженная биологическая активность кадмия во многом объясняется наибольшим размером атома и наименьшим значением электроотрицательности (Рабинович, 1978), что определяет свойство кадмия образовывать непрочные

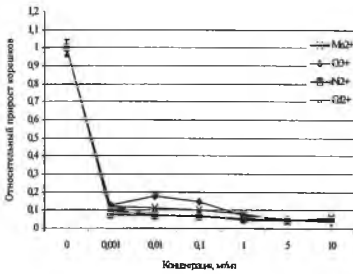


Рис.2. Влияние катионов солей тяжелых металлов на рост корешков лука репчатого

катионов и отсутствие влияния анионов, что позволило построить следующий убывающий ряд: $Cr^{3+} > Ni^{2+} > Cd^{2+} > Mn^{2+}$. Свойство ионов хрома проникать в клетку быстрее других ионов тяжелых металлов, очевидно, обусловлено тем, что водные растворы солей хрома имеют $pH=3,2-3,5$, а в кислых средах ионы d-элементов находятся в виде гидратированных ионов, легко проникающих в клетку. Водные растворы солей кадмия, марганца и никеля имеют $pH=5,7-6,2$, при котором ионы d-элементов находятся в виде основных солей или гидроксокомплексов (Жолнин, 2000).

Анализ влияния солей тяжелых металлов на пролиферативную активность в корневой меристеме *Allium* сера L. выявил, что с увеличением концентрации возрастает цитостатичность исследуемых соединений, которая выражается в ингибировании митотической активности (рис.3). Проведенный двухфакторный дисперсионный анализ показал, что анионы солей не

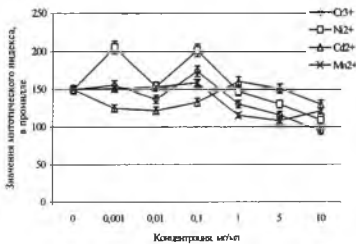


Рис.3. Влияние катионов солей тяжелых металлов на пролиферативную активность клеток корневой меристемы лука репчатого

лишь в концентрациях 0,001 - 0,1 мг/мл, в то время как в концентрациях 1 и 10 мг/мл кадмий, проявляющий максимальную общую токсичность ингибирует клеточное деление в наименьшей степени, а катионы марганца и хрома, гораздо слабее ингибирующие рост корешков лука, проявляют высокую цитотоксичность. Некоторые авторы объясняют этот факт тем, что наблюдаемый рост корешков, экспонированных с солями тяжелых металлов, очевид-

но комплексы, вследствие слабой связи внешних электронов с ядром, и сохранять высокую химическую активность.

Косвенным показателем токсичности и скорости проникновения вещества в клетку *Allium* сера L. является плазмолиз. Исследование плазмолитической активности показало, что все исследуемые соли во

всех концентрациях вызывают появление плазмолиза. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил достоверное влияние

на пролиферативную активность ($P < 0,01$), в то время как воздействие катионов достоверно. Ряды цитотоксичности для солей металлов в низких и высоких концентрациях различаются и выглядят следующим образом: $Cd^{2+} > Mn^{2+} \geq Cr^{3+} > Ni^{2+}$ (для концентраций 0,001 - 0,1 мг/мл) и $Mn^{2+} > Cr^{3+} > Ni^{2+} > Cd^{2+}$ (для концентраций 1 и 10 мг/мл). Оценка ци-

тотоксичности и общей токсичности солей тяжелых металлов показала, что ряды, составленные по результатам исследования совпадают между собой

но, является следствием растяжения клеток зоны элонгации, которые менее чувствительны к действию ионов тяжелых металлов, нежели клетки меристемы (Довгалюк и др., 2000а). Проведенный эксперимент показал способность солей никеля в минимальных концентрациях повышать митотическую активность в клетках лука по сравнению с контролем. По мнению одних авторов, тяжелые металлы в зависимости от концентрации и дозы вещества способны оказывать стимуляцию и терапевтические эффекты на организм (Жолнин, 2000). По мнению других, причиной этого феномена может быть не интенсификация клеточного деления, а постепенное замедление прохождения митоза по сравнению с контролем (Довгалюк и др., 2000б). Для выяснения этих предположений была рассчитана относительная продолжительность фаз митоза в делящихся клетках и проведено их сравнение с контролем. Дисперсионный двухфакторный анализ выявил, что исследуемые анионы не влияют на продолжительность фаз митоза, в то время как влияние катионов достоверно ($P < 0,01$).

По результатам цитологического исследования можно сказать, что на стадии профазы небольшую задержку деления клеток вызывает воздействие солей хрома в концентрациях 0,001 мг/мл, 0,1 мг/мл и 5 мг/мл, относительная продолжительность профазы в опыте на 3-5 % больше контрольной. На стадии метафазы клеточное деление блокируется воздействием: солей никеля (в концентрациях 0,1 мг/мл, 1 мг/мл и 5 мг/мл), солей кадмия (0,001 - 0,1 мг/мл), солей марганца (0,1 - 10 мг/мл). Относительная продолжительность метафазы в опыте с вышеназванными солями возрастает на 5-9 % по сравнению с контролем. На стадии анафазы деление клетки задерживает воздействие: солей никеля (в концентрациях 0,01 мг/мл и 10 мг/мл), солей кадмия (0,001 мг/мл, 5 мг/мл и 10 мг/мл). В стадию телофазы вступают только те клетки, которым удалось миновать блоки на стадии метафазы и анафазы, в связи с этим наблюдается уменьшение числа клеток, находящихся в стадии телофазы. По сравнению с контрольным опытом, в котором средняя продолжительность телофазы митоза составила 8 %, в клетках А. сера, обработанных солями тяжелых металлов, продолжительность телофазы уменьшилась до 6-3 %.

Способность ионов тяжелых металлов задерживать клеточное деление в первую очередь указывает на то, что тестируемые соединения могут специфично поражать микротрубочки и актиновые филаменты клеток. Данные исследования совпадают с результатами исследований других авторов на клетках табака и лука (Schwarzerova и др., 2002).

Высокая цитотоксичность многих соединений коррелирует с их мутагенностью, поэтому мы проанализировали тестируемые соли на способность индуцировать хромосомные aberrации в корневой меристеме *Allium* сера L. Статистический анализ показал, что в исследуемых концентрациях 0,001 и 0,01 мг/мл водные растворы солей тяжелых металлов достоверно проявляют мутагенную активность по сравнению с контролем (рис.4). Было обнаружено, что изучаемые соли индуцируют все типы хромосомных aberrаций:

«хромосомные и хроматидные мосты», хромосомные разрывы, отстаивания хромосомом.

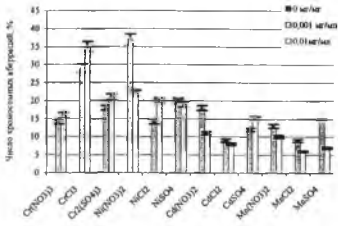


Рис. 4. Мутагенная активность солей тяжелых металлов, проявляющаяся в клетках корневой меристемы лука репчатого

Проведенный полный двухфакторный анализ показал, что на способность индуцировать хромосомные аномалии в корневой меристеме *Allium* сера достоверно влияют и катионы, и анионы солей тяжелых металлов. Сравнение солей тяжелых металлов по мутагенности для корневой меристемы *Allium* сера показало, что для разных анионов наблюдается падение ($P < 0,01$) генотоксичности в следующих рядах: для нитратов $Ni^{2+} > Cd^{2+} > Cr^{3+} > Mn^{2+}$; для сульфатов $Ni^{2+} > Cd^{2+} = Cr^{3+} = Mn^{2+}$; для хлоридов - $Cr^{3+} > Ni^{2+} > Cd^{2+} > Mn^{2+}$.

Сравнение анионов исследуемых солей по мутагенности для каждого типа катиона показало следующие достоверные ($P < 0,01$) ряды генотоксичности: для Ni^{2+} ; Cd^{2+} ; Mn^{2+} нитраты > сульфаты > хлориды; для Cr^{3+} - хлориды > сульфаты > нитраты.

Полученные нами результаты говорят о необходимости учитывать при оценке мутагенности и других солей тяжелых металлов типы анионов, которые существенно влияют и на клеточный метаболизм и на хромосомный аппарат.

4. АНАЛИЗ СПОСОБНОСТИ АКТИВНОГО ИЛА МОДИФИЦИРОВАТЬ ВОЗДЕЙСТВИЕ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Исследование токсичности солей тяжелых металлов в присутствии активного ила показало, что соли тяжелых металлов сохраняют свою токсичность ($P < 0,01$). Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что в присутствии активного ила воздействие анионов исследуемых солей является более достоверным, чем воздействие катионов, в то же время математическая обработка результатов выявила прямую зависимость токсичности тестируемых соединений от их концентрации ($P < 0,01$). Сравнительный анализ токсичности солей тяжелых металлов в присутствии активного ила позволил построить ряд фитотоксичности, в котором максимальную токсичность проявляют нитраты кадмия, марганца, хрома и никеля, а минимальную – сульфаты этих металлов (для всех исследуемых концентраций). Сравнение полученных результатов с экспериментами, в которых использовались водные растворы солей тяжелых металлов, показало, что токсичность солей тяжелых металлов для семян *Allium* сера L. значительно уменьшается при добавлении суспензии активного ила. Анализируя токсичность смеси для *Allium* сера L. мы обнаружили, что снижается их ингибирующее действие не только на прорастание семян, но и на ростовые процессы. Для этого использовали такой параметр, как относительный прирост корешков после шестидневной

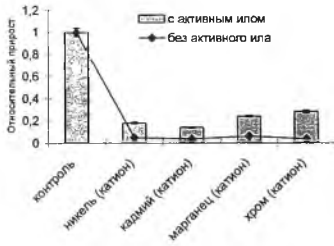


Рис. 5. Токсичность катионов солей тяжелых металлов в чистом виде и в присутствии активного ила в концентрации 10 мг/мл

стенки микроорганизмов и накапливаться там (Франк, 2003).

Исследование цитотоксичности солей тяжелых металлов в присутствии активного ила показало, что смеси исследуемых растворов достоверно ($P < 0,01$) ингибируют пролиферативную активность в клетках корневой меристемы лука. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил прямую зависимость цитотоксичности солей тяжелых металлов от их концентрации, в то время как воздействие катионов и анионов тестируемых солей оказалось в меньшей степени достоверным. Сравнение цитотоксичности солей тяжелых металлов в чистом виде и при добавлении активного ила, обнаружило достоверное ($P < 0,01$) снижение негативного влияния тяжелых металлов на клеточное деление в присутствии активного ила.

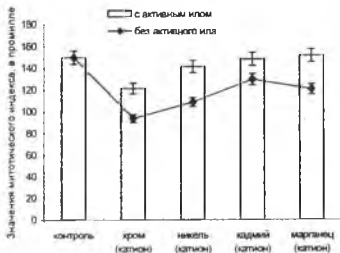


Рис.6. Цитотоксичность катионов солей тяжелых металлов в чистом виде и в присутствии активного ила в концентрации 10 мг/мл

сnižается в минимальной степени.

Для выяснения механизма действия активного ила в снижении цитотоксичности солей тяжелых металлов, были выявлены стадии митоза, чувст-

экспозиции семян *Allium cepa* L. (рис. 5). Проведенный морфометрический анализ роста корней семян лука показал, что различия между значениями относительного прироста корешков в опыте и контроле достоверны ($P < 0,01$). Установлено, что наиболее сильно активный ил снижает токсичность солей никеля и кадмия, значительно уменьшая, очевидно, их химическую активность. Возможными причинами данного явления могут служить способность ионов никеля образовывать устойчивые комплексы с органической составляющей активного ила и свойство ионов кадмия проникать сквозь клеточные

стенки микроорганизмов и накапливаться там (Франк, 2003). Исследование цитотоксичности солей тяжелых металлов в присутствии активного ила показало, что смеси исследуемых растворов достоверно ($P < 0,01$) ингибируют пролиферативную активность в клетках корневой меристемы лука. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил прямую зависимость цитотоксичности солей тяжелых металлов от их концентрации, в то время как воздействие катионов и анионов тестируемых солей оказалось в меньшей степени достоверным. Сравнение цитотоксичности солей тяжелых металлов в чистом виде и при добавлении активного ила, обнаружило достоверное ($P < 0,01$) снижение негативного влияния тяжелых металлов на клеточное деление в присутствии активного ила.

На рис. 6 представлены результаты исследования цитотоксичности исследуемых солей тяжелых металлов в смеси с активным илом, где соли использовались в самой высокой из исследованных концентраций.

Сильнее всего воздействие активного ила снижает цитотоксическое влияние солей кадмия (значения митотического индекса увеличиваются на 20 - 60 промилле). В меньшей степени подавляется ингибирующее влияние солей марганца (значения митотического индекса увеличиваются на 30 - 40 промилле). Цитотоксичность солей хрома и никеля снижается в минимальной степени.

Для выяснения механизма действия активного ила в снижении цитотоксичности солей тяжелых металлов, были выявлены стадии митоза, чувст-

вительные к совместному воздействию солей тяжелых металлов и активного ила.

Для этого рассчитали относительную продолжительность фаз митоза в корневой меристеме лука, семена которого проросли в растворах солей тяжелых металлов в смеси с активным илом. Анализ «типов» блоков на различных стадиях митотического цикла в клетках корневой меристемы, обработанных солями тяжелых металлов в концентрациях 0,001 – 1 мг/мл в смеси с активным илом, показал, что на стадии профазы задержку клеточного деления вызывает только воздействие солей никеля в концентрациях 0,001; 0,1; 1 и 10 мг/мл. На стадии метафазы «блоков» деления выявлено не было, в то время в анафазе была зарегистрирована небольшая задержка деления после воздействия солей: хрома (в концентрациях от 0,001 мг/мл до 10 мг/мл); марганца (от 0,001 мг/мл до 10 мг/мл); кадмия (0,001 мг/мл, 0,01 мг/мл и 1 мг/мл); никеля (0,1 мг/мл). На стадии телофазы был зарегистрирован «блок» деления после воздействия солей марганца, увеличивших длительность фазы в опыте на 2%.

Способность тяжелых металлов вмешиваться в процессы клеточного деления во многом объясняется их свойством связываться с белками и нуклеиновыми кислотами, нарушая прохождение митоза. Довгалюк А.И. (2000а), описывает в своей работе анеугенные эффекты солей кадмия и никеля, отмечая, что воздействие этих металлов на клетки апикальной меристемы корней *Allium sera* L. индуцирует самые различные нарушения прохождения митотического деления. Анализ мутагенности тяжелых металлов для лука в присутствии активного ила показал, что и катионы и анионы солей тяжелых металлов достоверно сохраняют свою мутагенную активность (рис.7). Анализ хромосомных aberrаций в клетках корневой меристемы семян *A. sera*, проращенных в солях тяжелых металлов в присутствии активного ила показал, что наблюдаются все типы хромосомных aberrаций, имеющих цитологическое выражение в виде разрывов, оставших хромосом,

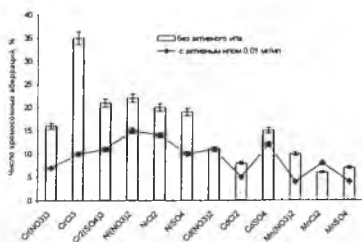


Рис.7. Мутагенная активность солей тяжелых металлов в чистом виде и в присутствии активного ила в концентрации 0,01 мг/мл

хромосомных и хроматидных «мостов». Сравнение тяжелых металлов по способности индуцировать хромосомные aberrации для каждого типа анионов позволило построить достоверные ряды генотоксичности: для нитратов - $Ni^{2+} > Cr^{3+} > Cd^{2+} > Mn^{2+}$; для сульфатов $Ni^{2+} = Cr^{3+} > Cd^{2+} > Mn^{2+}$; для хлоридов - $Cr^{3+} > Ni^{2+} > Cd^{2+} > Mn^{2+}$. Как видно из представленных результатов, ряды мутагенности незначительно изменились для нитратов и сульфатов и остались неизменными для хлоридов.

Оценка способности активного ила

снижать мутагенность водных растворов солей тяжелых металлов показала достоверное уменьшение мутагенности тестируемых соединений (рис.7). Число хромосомных aberrаций, индуцируемых солями тяжелых металлов в чистом виде, достоверно уменьшается при добавлении активного ила. Количество aberrаций в клетках *Allium* сера L., обработанных солями хрома совместно с активным илом уменьшается на 12-15 %, при обработке солями никеля совместно с активным илом, количество aberrаций уменьшается на 6-7 %. Влияние активного ила на клетки, обработанные солями марганца и кадмия, снижает общее число aberrаций на 3-5 %.

Известно, что микроорганизмы обычно более резистентны к токсичному действию тяжелых металлов и их соединений (Илялетдинов, 1984) и некоторые из них способны концентрировать тяжелые металлы в больших количествах (Петухова, 2003). Активный ил способен аккумулировать ионы тяжелых металлов из растворов, в результате чего реальная концентрация тяжелых металлов в растворе меняется (Форстер, 1990).

Определение конечной концентрации ионов тяжелых металлов, содержащихся в активном иле, показало, что в присутствии активного ила концентрация ионов всех представленных тяжелых металлов в растворе достоверно снижается в несколько раз (табл. 1).

Таблица 1

Конечное содержание ионов тяжелых металлов в активном иле, после 6-дневного контакта с солями тяжелых металлов, мг/мл

Вещества	Исходные концентрации солей тяжелых металлов		
	0,1 мг/мл	1 мг/мл	10 мг/мл
NiCl ₂	0,0355	0,0422	1,06
Ni(NO ₃) ₂	0,03416	0,02751	1,2425
NiSO ₄	0,00825	0,015	2,5625
CdCl ₂	0,00055	0,07	3,4
Cd(NO ₃) ₂	0,0263	0,004	1,86
CdSO ₄	0,007	0,044	3,34
CrCl ₃	0,0015	0,0148	0,2433
Cr(NO ₃) ₃	0,0013	0,02	0,147
Cr ₂ (SO ₄) ₃	0,0018	0,0345	0,186
MnCl ₂	0,0489	0,521	6,14
Mn(NO ₃) ₂	0,0835	0,88	6,83
MnSO ₄	0,08	0,657	7,58

Анализ степени поглощения тяжелых металлов, выявил, что в максимальной степени активный ил аккумулирует ионы хрома (степень очистки раствора от ионов металла составляет 99-97 %). Видимо, кислая среда растворов солей хрома (pH = 3,2 – 3,5) позволяет атому хрома высвободиться из системы ковалентных связей и переходить в состояние акваионов [Cr(OH)₆]³⁺, которые способны прочно связываться с органической и микробиологической составляющей активного ила. Ионы никеля, марганца и кад-

мья меньше аккумулируются активным илом, степень очистки растворов тяжелых металлов от ионов никеля составляет 76-96 %, от ионов кадмия – 75-90 %, от ионов марганца 12-41 % (рис.8). Очевидно, основные соли, нерастворимые гидроксиды и гидроксокомплексы, образующиеся в растворах тяжелых металлов при $\text{pH} = 5 - 7$ (Жолнин, 2000а), обладают низкой химической активностью и вступают во взаимодействие с активным илом в меньшей степени. В то время как водные растворы солей кадмия, марганца и никеля имеют $\text{pH} = 5,7 - 6,2$, а, как известно, при повышении pH гидратированные ионы многих d-элементов вследствие большого заряда обладают высоким поляризующим влиянием на молекулы воды и образуют прочные ковалентные связи с OH^- . Процесс заканчивается либо образованием основных солей $[\text{M}(\text{OH})_m]^{(m-n)+}$ либо гидроксокомплексов $[\text{M}(\text{OH})_m]^{(n-m)-}$ (Жолнин, 2000а), проходящих через клеточную стенку более медленно.

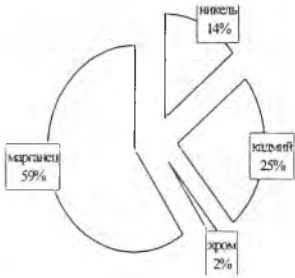


Рис.8. Количество металлов, оставшееся в растворе после аккумуляции активным илом (при исходной концентрации 10 мг/мл)

Интересно, что ионы хрома одинаково аккумулируются активным илом вне зависимости от исходной концентрации. Максимальное поглощение ионов никеля и кадмия происходит в средней концентрации 1 мг/мл, очевидно, в концентрации 10 мг/мл никель и кадмий оказывают сильное токсическое воздействие, что приводит к угнетению жизнедеятельности активного ила. В то время как поглощение марганца происходит лучше в концентрациях 0,1 и 10 мг/мл, чем в концентрации 1 мг/мл. Одной из причин

такой зависимости может служить тот факт, что воздействие максимальной концентрации 10 мг/мл вызывает частичное отмирание биоценоза активного ила. «Мертвые» микроорганизмы образуют крупные агломераты с органическим веществом активного ила, вследствие чего уменьшается свободная активная поверхность, что создает условия для биосорбции ионов марганца на отмерших микроорганизмах. Кроме всего вышесказанного, часть тяжелых металлов, находящихся в растворе, переходит в органическое вещество активного ила. Органическая составляющая активного ила богата соединениями с функциональными группами, действующими как металлсвязывающие участки (полисахариды, белки, нуклеиновые кислоты), они образуют прочные комплексы с ионами металлов, снижая их химическую активность и перевода в связанное состояние (Карюхина, 1995; Чурбанова, 1987).

Существующие химические методы не позволяют выявить количества исследуемых тяжелых металлов в смеси с активным илом в концентрациях 0,001 и 0,01 мг/мл, однако резкое уменьшение количества тяжелых металлов

в более высоких концентрациях говорит о том, что в низких концентрациях, исследованных в данной работе, остаются следовые количества металлов.

Исследование биологической активности самого токсичного из исследуемых металлов (кадмия), в условиях почвенной культуры, подтвердило полученные ранее результаты лабораторных экспериментов. При сопоставлении результатов по воздействию солей кадмия на всхожесть семян и рост корешков лука репчатого в водной и почвенной культурах, была обнаружена сходная тенденция по угнетению процессов роста лука при обоих способах культивирования. Однако в условиях почвенной культуры степень негативного влияния токсиканта снижается, что во многом объясняется буферными свойствами почвы (Большаков и др., 1978). Результаты эксперимента по исследованию способности активного ила модифицировать это воздействие в условиях почвенной культуры не противоречит и во многом подтверждает полученные ранее в условиях водной культуры данные.

Суммируя полученные результаты можно сказать, что исследуемые соли тяжелых металлов проявляют высокую генотоксичность для растений и, следовательно, при попадании в окружающую среду способны влиять на растения, контактирующие с ними и изменять биоценозы. Возможно использование активного ила для снижения негативного действия солей тяжелых металлов.

ВЫВОДЫ

1. Нитраты, хлориды и сульфаты двухвалентного марганца, кадмия, никеля и трехвалентного хрома оказывают токсическое и цитотоксическое действие на лук репчатый (*Allium cepa* L.).
2. С увеличением концентрации солей тяжелых металлов возрастает их токсичность и цитотоксичность. Определяют токсичность катионы, анионы достоверно не влияют на ростовые процессы, пролиферативную активность и хромосомный аппарат клеток корневой меристемы лука.
3. Катионы солей тяжелых металлов различаются по токсичности и цитотоксичности. В низких концентрациях солей тяжелых металлов (0,001-0,1 мг/мл) токсичность и цитотоксичность исследуемых катионов убывает в следующем ряду: $Cd^{2+} > Mn^{2+} \geq Cr^{3+} > Ni^{2+}$, в высоких концентрациях (1-10 мг/мл) данный ряд выглядит следующим образом: $Mn^{2+} > Cr^{3+} > Ni^{2+} > Cd^{2+}$.
4. Соли тяжелых металлов являются мутагенами для лука репчатого, причем на развитие мутагенного ответа достоверно влияют и анионы, и катионы. Для нитратов исследуемых металлов способность индуцировать хромосомные аберрации убывает в следующем ряду: $Ni^{2+} > Cd^{2+} > Cr^{3+} > Mn^{2+}$; для сульфатов - $Ni^{2+} > Cd^{2+} = Cr^{3+} = Mn^{2+}$; для хлоридов - $Cr^{3+} > Ni^{2+} > Cd^{2+} > Mn^{2+}$.

5. Внесение поликультуры активного ила в растворы исследуемых солей тяжелых металлов достоверно снижает их токсичность, цитотоксичность и мутагенность по отношению к луку репчатому. Способность активного ила понижать токсичность солей тяжелых металлов проявляется как в водной, так и в почвенной культурах.
6. Модифицирующее действие активного ила на биологическую активность солей тяжелых металлов связано с аккумуляцией активным илом катионов солей тяжелых металлов. Способность активного ила поглощать катионы тяжелых металлов убывает в ряду: $\text{Cr}^{3+} > \text{Ni}^{2+} \geq \text{Cd}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

- 1) Амосова А.А., Селезнева Е.С., Теньгаев Е.И. Оценка токсичности солей тяжелых металлов //Актуальные проблемы экологии человека:Труды VIII Всероссийск. Конгресс.- Самара,2002. С.11-14.
- 2) Амосова А.А., Селезнева Е.С. Исследование генотоксичности тяжелых металлов //Экология и жизнь: Сб. матер. V Международной научно-практической конференции.-Пенза, 2002. С.32-35.
- 3) Амосова А.А. Исследование генотоксичности тяжелых металлов и способности активного ила снижать ее //Молодые ученые – науке и производству: Сб. матер. Обл. научн. конф. - Самара,2002. С.25-26.
- 4) Амосова А.А. Токсичность солей тяжелых металлов //Безопасность биосферы: Тез. докл. - Екатеринбург, 2002. С.45.
- 5) Амосова А.А., Селезнева Е.С., Теньгаев Е.И. Цитотоксичность тяжелых металлов //Приоритет России XXI века: от биосферы и техносферы к ноосфере: Сб. матер. Междунар. научн.-пр. конф.-Пенза, 2003.С.13-15.
- 6) Амосова А.А. Анализ токсичности солей тяжелых металлов //Окружающая природная среда и экологическое образование и воспитание: Сб. матер. III Всеросс. научн.-пр. конф.- Пенза, 2003. С.77-79.
- 7) Амосова А.А. Влияние солей тяжелых металлов на продолжительность фаз митоза в клетках *Allium* сера //Медицинская экология:Сб. ст. II Междунар. научн.-пр. конф.-Пенза, 2003. С.180-182.