

## Оценка качества донных отложений среднего участка р. Енисей с помощью *Allium* теста

Т. А. ЗОТИНА, Е. А. ТРОФИМОВА, Ю. В. АЛЕКСАНДРОВА, О. В. АНИЩЕНКО

Институт биофизики ФИЦ КНЦ СО РАН  
660036, Красноярск, Академгородок, 50/50  
E-mail: t\_zotina@ibp.ru

Статья поступила 20.08.2018

После доработки 21.09.2018

Принята к печати 25.09.2018

### АННОТАЦИЯ

Оценен вредоносный потенциал цельных донных отложений (ДО) р. Енисей с помощью лукового теста. Пробы ДО отбирали в 10 точках на участке среднего течения реки протяженностью около 100 км, подверженному влиянию коммунального хозяйства г. Красноярска и промышленных предприятий. Исследованные пробы ДО значительно различались по содержанию потенциальных токсикантов (тяжелых металлов, техногенных радионуклидов и органических загрязнителей), биогенов и физическим свойствам. В качестве индикатора общей токсичности ДО использовали среднюю длину корня лука, цитотоксичности – митотический индекс, генотоксичности – долю ана-телофазных клеток в апикальной корневой меристеме, содержащих аномальные хромосомы. В результате тестирования выявлены как стимуляция, так и угнетение индикаторных параметров лука на пробах ДО р. Енисей по сравнению с контролем (искусственными ДО). Повышенная генотоксичность зарегистрирована в пробе ДО, загрязненной смесью органических и химических токсикантов. Выявлена достоверная положительная корреляция доли aberrантных клеток с содержанием меди и нефтепродуктов в пробах ДО. Экстремально сильных реакций индикаторных параметров лука на качество проб ДО не выявлено, что, вероятно, является следствием относительно низкого уровня загрязнения исследованных проб и согласуется с результатами химических анализов. Результаты тестирования позволяют заключить, что индикаторные параметры лукового теста обладают достаточной чувствительностью к качеству ДО р. Енисей и могут использоваться для их биотестирования.

**Ключевые слова:** ана-телофаза, генотоксичность, длина корня, искусственные донные отложения, митотический индекс, токсичность.

В результате хозяйственной деятельности человека в донных отложениях (ДО) накапливаются потенциально токсичные вещества, которые воздействуют на водную биоту и представляют потенциальную опасность для наземных животных и человека. Инструментальное измерение содержания потенциальных токсикантов в пробах ДО недостаточно информативно для прогнозирования их биологического действия, поскольку токсичные веще-

ства оказывают совместное действие на биоту и могут усиливать или ослаблять действие друг друга [Fent, 1996; Evseeva et al., 2005]. Поэтому для оценки вредоносного потенциала сложных смесей ксенобиотиков, содержащихся в ДО, наряду с измерением их содержания используют методы биотестирования экстрактов и элютриатов из ДО, а также цельных ДО [Mothersil, Austin, 2003; Clément et al., 2004; Haring et al., 2010; Höss et al., 2010;

Diepens et al., 2014]. Тестирование цельных отложений позволяет получить наиболее реалистичные результаты, и оно востребовано в случае загрязнения ДО радионуклидами (природными или техногенными), встроенными в минеральную матрицу.

К числу экспрессных и доступных методов биотестирования образцов окружающей среды относится биотест на основе лука репчатого, *Allium cepa* L. – луковый тест (*Allium*-тест), который показал высокую чувствительность к различным типам токсикантов, в том числе к смеси ксенобиотиков химической и радиационной природы [Fiskesjö, 1985; Evseeva et al., 2005; Leme, Marin-Morales, 2009; Geras'kin et al., 2011; Удалова и др., 2014]. Луковый тест позволяет оценить цито- и генотоксичность исследуемых образцов на основе анализа митотической активности и доли клеток с хромосомными aberrациями в кончиках корней, а также оценить общетоксический эффект по ингибированию роста корней [Fiskesjö, 1985; Júnior et al., 2007; Firbas, Amon, 2014, 2015]. Он с недавнего времени применяется для тестирования цельных природных ДО [Júnior et al., 2007; Geras'kin et al., 2011; da Costa et al., 2012].

Средний участок р. Енисей (от плотины Красноярской ГЭС до устья р. Ангара) подвергается техногенному загрязнению в результате деятельности промышленных предприятий и коммунального хозяйства г. Красноярска и других населенных пунктов, расположенных в зоне водосбора. В ДО среднего участка р. Енисей зарегистрированы ксенобиотики химической и радиационной природы [Сухоруков и др., 2004; Bolsunovsky, Bondareva, 2007; Дементьев и др., 2015; Zotina et al., 2015a, b]. Ранее проводилось экотоксикологическое исследование ДО среднего участка р. Енисей с помощью элодеи канадской (*Elodea canadensis* Michx.) в лабораторных экспериментах и в природных условиях, что позволило выявить участки реки с повышенным уровнем токсичности и генотоксичности [Болсуновский и др., 2007; Зотина и др., 2014; Медведева и др., 2014; Муратова и др., 2014; Zotina et al., 2015a, b].

Задача данной работы – определение вредоносного потенциала проб ДО р. Енисей, отобранных в зоне влияния промышленно-коммунального комплекса г. Красноярска и промышленных предприятий, расположен-

ных на среднем участке реки, с помощью лукового теста, а также сравнение результатов лукового теста с полученными ранее данными для элодеи канадской.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Пробы ДО отбирали в 10 точках на участке среднего течения р. Енисей в октябре – ноябре 2013 г. (рис. 1; табл. 1). Точки отбора выбирали так, чтобы получить образцы ДО с разнотипным загрязнением. Пробы ДО отбирали в прибрежной зоне р. Енисей из покрытого водой поверхностного корнеобитаемого слоя толщиной до 20 см, помещали в пластиковые канистры и доставляли в лабораторию, где их протирали через пластиковое сито с размером ячеек 0,8 см, раскладывали по полиэтиленовым пакетам, по 1 л в каждый, и помещали в холодильник на хранение при температуре 4–5 °С. В качестве искусственного контроля использовали донные отложения, приготовленные по стандарту OECD (Guideline 219), как описано ранее [Zotina et al., 2015a]. В качестве природного контроля рассматривали пробу ДО-1, отобранную в р. Енисей выше г. Красноярска, вдали от населенных пунктов и других объектов хозяйственной деятельности человека (см. рис. 1; табл. 1), согласно рекомендациям Федеральной службы гидрометеорологии и мониторинга окружающей среды Российской Федерации (Р 52.24.695-2007).

**Анализ проб донных отложений.** Содержание  $\gamma$ -излучающих радионуклидов измеряли в сырых пробах ДО на гамма-спектрометре со сверхчистым германиевым детектором GX2320 (Canberra, США), как описано ранее [Zotina et al., 2015b]. Удельные активности радионуклидов в пробах ДО приведены в Бк/кг сырого веса.

Содержание металлов и фосфора измеряли на ИСП-спектрометре (ICP-OES; iCAP 6300 Duo spectrometer, Thermo Electron Manufacturing) после озоления проб ДО в смеси азотной и хлорной кислот; содержание азота – методом Къельдаля, как описано ранее [Zotina et al., 2015b]. Анализ проводили в трех повторностях, результаты представлены как средняя арифметическая величина  $\pm$  стандартное отклонение (*SD*). Влажность определя-

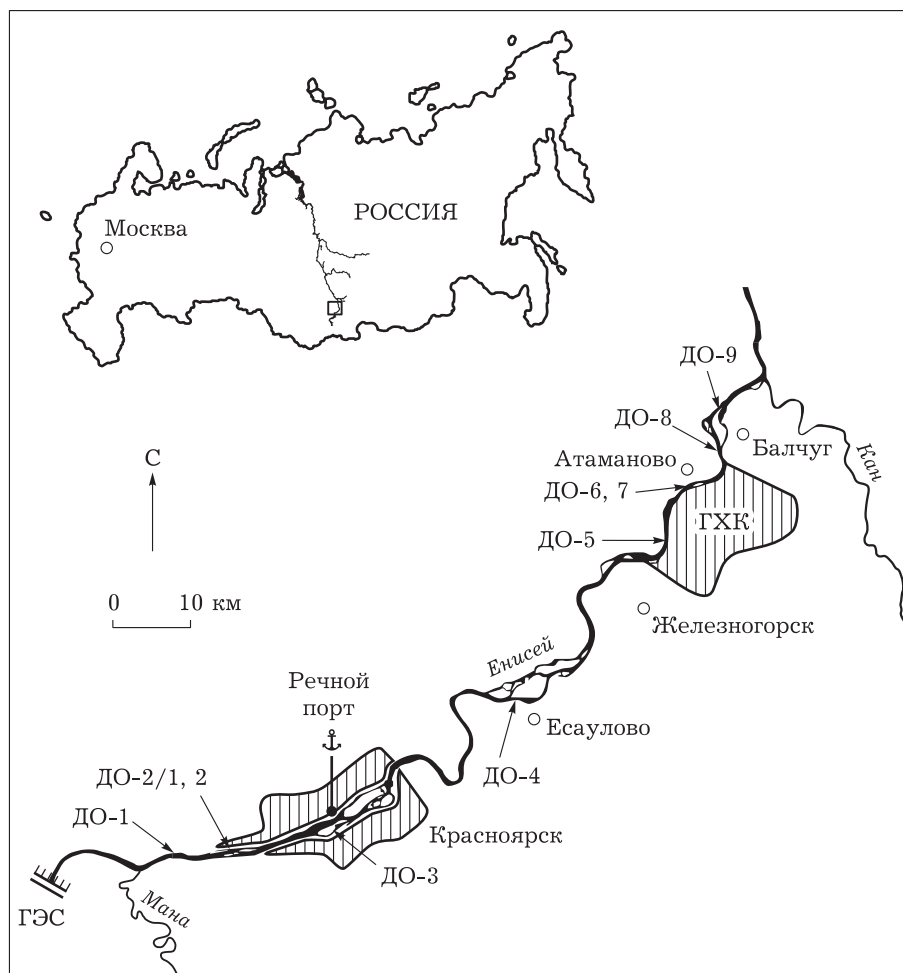


Рис. 1. Схематическая карта участка р. Енисей с указанием точек отбора проб донных отложений

ли как потерю веса проб ДО после их высушивания при 105 °С, содержание органического вещества – как потерю веса сухих проб после их озоления при 450 °С.

Экстракцию нефтепродуктов в пробах ДО проводили согласно ГОСТу (ПНД Ф 16.141-04). Высушенную при 50 °С пробу ДО измельчали в ступке и просеивали через сито с размером ячеек 1 мм. Навеску весом 30–40 г смачивали хлороформом (CHCl<sub>3</sub>, хч) в стеклянном стакане, затем заливали 15 мл хлороформа и перемешивали в течение 5 мин на платформе-шейкере при комнатной температуре. Надосадочную жидкость фильтровали через бумажный фильтр “белая лента” (размер пор 5–8 мкм). Процедуру повторяли 3–4 раза до получения бесцветного экстракта. Содержание нефтепродуктов определяли по весу сухого остатка, полученного после

выпаривания экстракта, и выражали в мг/кг сухого веса исходной пробы ДО.

Минеральный состав проб ДО исследовали методом рентгеноструктурного анализа на ARL X'TRA дифрактометре, как описано ранее [Zotina et al., 2015b]. Анализ выполнен в Институте геологии и минералогии им. В. С. Соболева СО РАН (г. Новосибирск).

**Подготовка лука и проведение эксперимента.** Для эксперимента использовали головки лука (*Allium cepa* L.) сорта Штутгартен ризен диаметром 1,7–2,2 см, весом 2,7–4,2 г. Перед экспериментом луковицы выдерживали в темноте при  $t = 4-5$  °С в течение четырех недель. За двое суток до эксперимента их вынимали из холодильника и выдерживали в темноте при  $t = 22$  °С в течение суток, а затем на сутки доньшки луковиц помещали в дистиллированную воду, налитую в чашки

## Описание точек отбора проб донных отложений в р. Енисей

Обозначение пробы	Описание точки отбора	Берег реки	Расстояние от Красноярска, км*	Координаты
ДО-1	с. Овсянка, протока перед о-вом Овсянским, отбор со стороны берега	Левый	-21	55°58'10,3"N 92°33'55,5"E
ДО-2/1	пос. Удачный, устье ручья, протекающего через поселок	»	-13,4	55°58'23,8"N 92°39'38,7"E
ДО-2	пос. Удачный	»	-14	55°8'24,6"N 92°0'15,3"E
ДО-3	г. Красноярск, о-в Отдыха, Абаканская протока, отбор со стороны острова	Правый	-1	55°59'38,9"N 92°53'01,7"E
ДО-4	с. Есаулово	»	43	56°08'50,8"N 93°15'57,7"E
ДО-5	р. Шумиха, устье	»	79	56°20'51,8"N 93°34'59,0"E
ДО-6	с. Атаманово, коса Атамановская, отбор со стороны косы	»	85	56°23'22,3"N 93°37'09,8"E
ДО-7	с. Атаманово, о-в Атамановский, отбор со стороны острова	»	86,5	56°23'46,7"N 93°38'58,3"E
ДО-8	р. Большая Тель, устье	»	92,5	56°25'52,0"N 93°41'48,4"E
ДО-9	с. Большой Балчуг, протока о-ва Березовый, отбор со стороны берега	»	96	56°27'58,2"N 93°42'02,0"E

\* Расстояние определяли по действующей судоходной карте [Карта..., 2008]. За точку отсчета принят речной порт Красноярска.

Петри. Перед высадкой в ДО у луковиц удаляли отмершие поверхностные ткани.

За сутки до начала эксперимента донные отложения раскладывали по стеклянным стаканам, закрывали пищевой пленкой и помещали в климатическую комнату. Луковицы высаживали в стаканы с ДО, заглубляя на две трети высоты, по 10 луковиц в один стакан в трех повторностях. После высадки луковиц стаканы выдерживали в климатической комнате в темноте при температуре 22 °С в течение двух суток. По окончании эксперимента луковицы аккуратно вынимали из ДО, стараясь не повредить корни, промывали в водопроводной воде, отрезали нижнюю часть с корнями и сразу помещали ее в уксусный алкоголь (96%-й этанол и ледяная уксусная кислота, 3 : 1).

**Индикаторные параметры лука.** Индикатором общей токсичности проб ДО служила средняя длина корня (мм), которую считали на 10 луковицах. Для оценки цито- и генотоксичности использовали корешки лука длиной около 1 см, которые брали с разных луковиц. Их апексы окрашивали 2%-м раствором ацетоорсеина, как описано ранее [Медведева и др., 2014], и готовили из них давленные

препараты. В качестве индикатора цитотоксичности определяли долю делящихся клеток – митотический индекс (МИ, %), который оценивали на пяти препаратах корешков с разных луковиц, выбранных случайным образом, в сумме для каждой пробы ДО просматривали 5430–6244 клетки. Индикатором генотоксичности служила доля аномальных ана-телофазных клеток (АК, %), содержащих aberrantные хромосомы. Среди аномалий учитывали фрагменты, мосты, агглютинацию, блуждающие хромосомы, неравномерное расхождение, многополюсный митоз, множественные нарушения. Долю аномальных клеток считали на 20 препаратах корешков, взятых с разных луковиц. В сумме анализировали по 3003–6367 ана-телофазным клеткам для каждой пробы ДО.

**Анализ результатов.** Коэффициент вариативности индикаторных параметров лукового теста (КВ) рассчитывали как отношение *SD* параметра к его средней величине, %.

Чувствительность индикаторных параметров лукового теста к качеству проб ДО рассчитывали по предложенной ранее формуле [Zotina et al., 2015b] как отношение разности

между максимальной и минимальной средними величинами каждого параметра на разных пробах ДО к средней величине этого параметра на всех протестированных пробах ДО ( $n = 10$ ) и выражали в %. Данный коэффициент показывает силу реакции индикаторных параметров лука на изменение качества тестируемых проб ДО [Zotina et al., 2015b].

Статистическую достоверность отличия индикаторных параметров лука на разных пробах ДО оценивали с помощью двухстороннего теста Краскела – Уоллиса ( $H$ ,  $p < 0,05$ ), поскольку распределение некоторых экспериментальных данных отличалось от нормального. Для установления статистически достоверной зависимости между индикаторными параметрами лукового теста и физико-химическими характеристиками проб ДО использовали корреляционный анализ в программе Statistica 7.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Содержание потенциальных токсикантов и физико-химические характеристики проб ДО.** Содержание потенциально токсичных тяжелых металлов (Zn, Ni, Cu, Cr, Pb, Cd) в пробах ДО р. Енисей в несколько раз различалось между точками отбора (рис. 2, *a–e*), за исключением никеля и хрома, концентрации которых наименее значительно варьировались между пробами ДО. Содержание никеля в пробах ДО превышало установленную на основе консенсуса пороговую концентрацию (ТЕС), ниже которой вредоносные эффекты маловероятны [MacDonald et al., 2000], во всех точках отбора (см. рис. 2, *б*). Наиболее высокое содержание цинка, превышающее ТЕС, зарегистрировано в пробе ДО-2/1 (см. рис. 2, *а*), отобранной в устье ручья, впадающего в р. Енисей (см. табл. 1; рис. 1). Максимальное содержание меди, превышающее ТЕС, обнаружено в пробе ДО-3 (см. рис. 2, *в*), которая отобрана в Абаканской протоке в черте г. Красноярска (см. табл. 1; рис. 1). В этой же пробе зарегистрировано повышенное содержание цинка, свинца, кадмия, а также и максимальное содержание нефтепродуктов (см. рис. 2, *а, д, е, и*). Содержание хрома и никеля в пробах искусственных ДО оказалось значительно ниже, чем в пробах ДО р. Енисей, содержание остальных металлов – на уровне

проб ДО с низким содержанием этих металлов (см. рис. 2). Наиболее высокие концентрации общего азота обнаружены в двух пробах: ДО-6 и ДО-8 (см. рис. 2, *ж*). В пробах ДО-2/1 и ДО-8 отмечено наиболее высокое содержание общего фосфора (см. рис. 2, *з*).

Из природных радионуклидов в пробах ДО р. Енисей присутствовал  $^{40}\text{K}$  (215–420 Бк/кг), в отдельных пробах регистрировалось небольшое содержание  $^7\text{Be}$ . На фоновом участке, расположенном выше радиоактивных сбросов, из техногенных радионуклидов в пробах ДО регистрировался только  $^{137}\text{Cs}$ , удельная активность которого в пробах ДО-1–ДО-4 составляла 0,3–1,0 Бк/кг сыр. веса (см. рис. 2, *к*). В пробах ДО-5–ДО-9 содержание техногенных радионуклидов превышало фоновый уровень, а максимальное их содержание зарегистрировано в пробе ДО-5, которая отобрана в устье р. Шумиха. Основу техногенной радиоактивности в пробе ДО-5 формировал  $^{137}\text{Cs}$  (97 %), а также присутствовал  $^{60}\text{Co}$ . В пробах ДО-6–ДО-9 помимо  $^{137}\text{Cs}$ , который составлял 36–56 % техногенной радиоактивности, присутствовали также  $^{60}\text{Co}$  (22–40 % техногенной активности) и  $^{152, 154}\text{Eu}$  (13–34 %). Максимальное содержание  $^{137}\text{Cs}$  в пробах ДО р. Енисей не превышало минимально допустимую удельную активность этого изотопа в радиоактивных отходах (10 000 Бк/кг) согласно нормам радиационной безопасности, действующим в РФ (СанПин 2.6.1.2523–09).

Влажность проб ДО р. Енисей составляла 17–60 %, искусственных ДО – 30 % (см. рис. 2, *л*); содержание органического вещества изменялось в диапазоне 1–9 % (см. рис. 2, *м*). По минеральному составу пробы ДО отличались незначительно. Основу их минеральной фракции составляли кристаллический кремний (кварц, 40–50 %) и натриево-кальциевый полевой шпат (плаггиоклаз, 25–40 %), а также присутствовали (Mg, Fe)-хлорит, калийный полевой шпат, кальцит, слюда и следовые количества ряда других минералов [Zotina et al., 2015b].

**Отклик индикаторных параметров лука на качество проб ДО.** На рис. 3 показаны результаты тестирования проб ДО р. Енисей с помощью лукового теста. В среднем на одной луковице выросло по 22–28 корней, в искусственном контроле – 19. Средняя длина корня варьировала на разных пробах ДО от 7 до 13 мм (см. рис. 3, *а*). На искусственных ДО

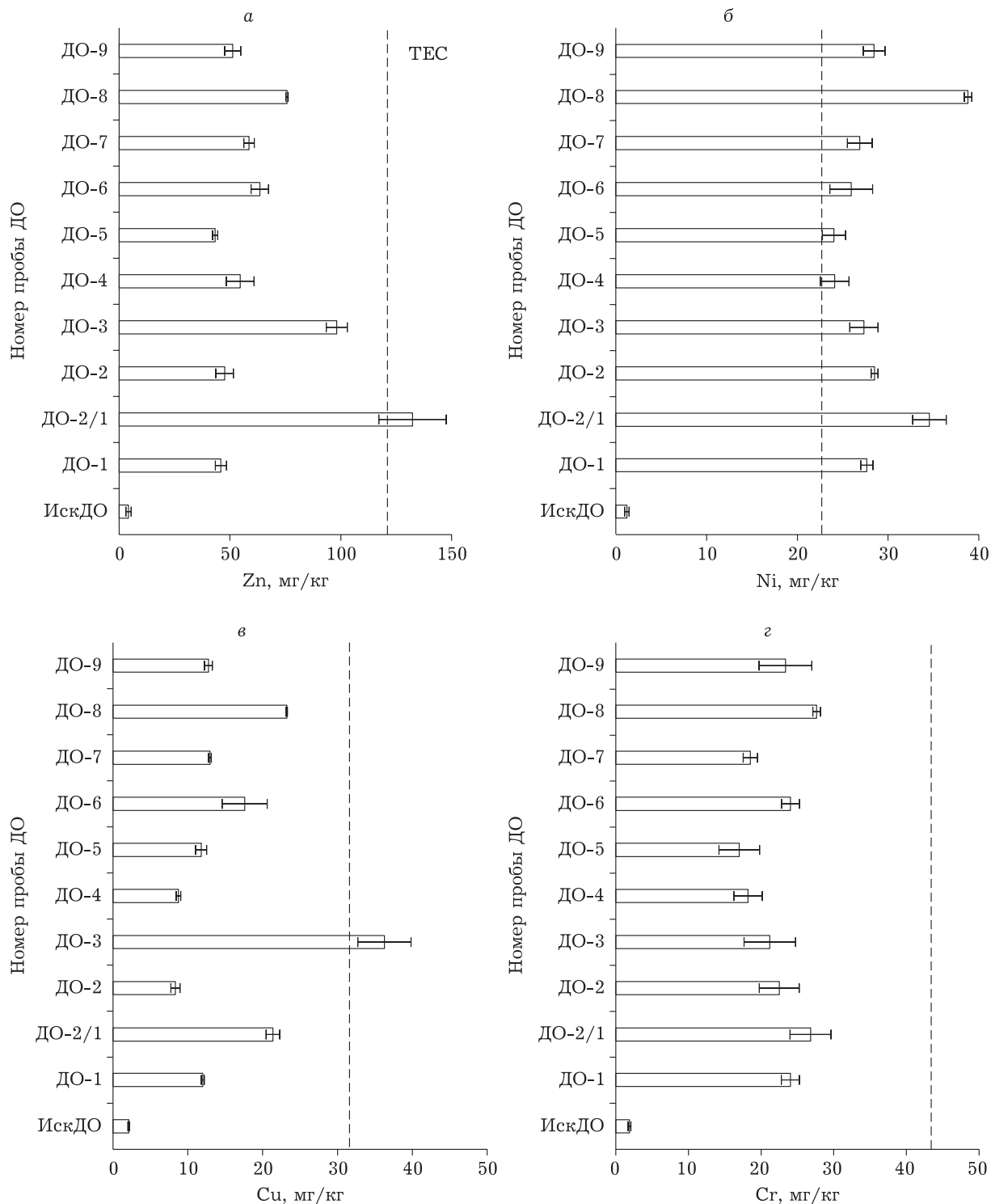


Рис. 2 (начало)

она составила 21 мм и статистически значимо ( $p < 0,05$ ) превысила эту величину на пробах ДО-2/1, ДО-2, ДО-3, ДО-6–ДО-9 р. Енисей. Минимальная средняя длина корня зарегистрирована на пробе ДО-6.

Митотический индекс (МИ) варьировал от 5,1 % на пробе ДО-7 до 8,3 % на пробе ДО-2 (см. рис. 3, б). Из общего числа делящихся клеток 36–57 % находилось в стадии профаза, 15–31 % – в метафазе и 28–42 % –



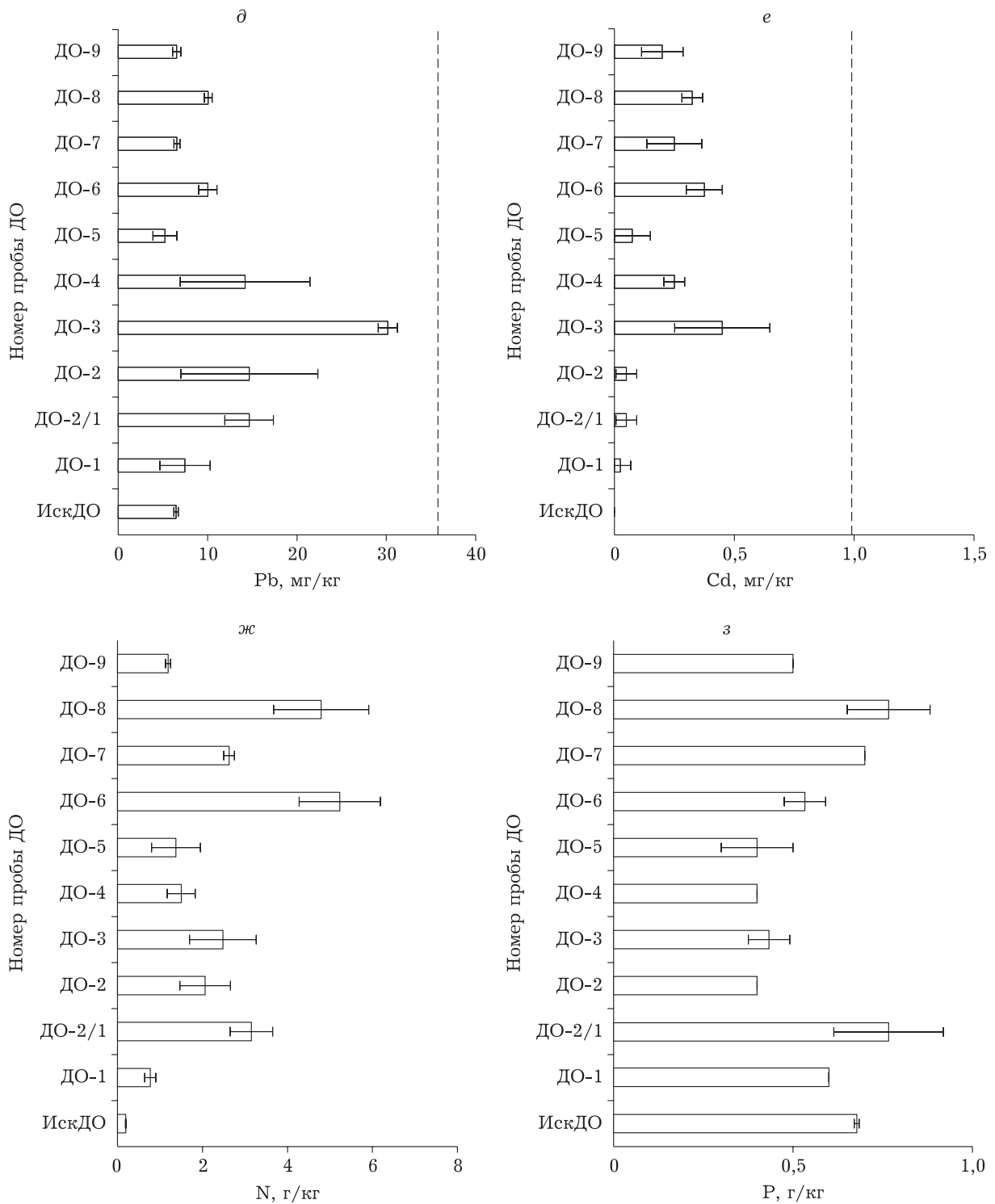


Рис. 2 (продолжение)

в ана-телофазе. Максимальная величина МИ достоверно ( $p < 0,05$ ) превышала данную величину на пробе ДО-7 и ДО-8. МИ в природном контроле (ДО-1) составил 6,4 %, в искусственном – 6,6 %.

Доля клеток, содержащих аномальные хромосомы, в корнях лука, выросших на пробах ДО р. Енисей, составляла от 0,4 % на пробе ДО-5 до 3,7 % на пробе ДО-3 (см. рис. 3, в). В искусственном контроле доля аномальных

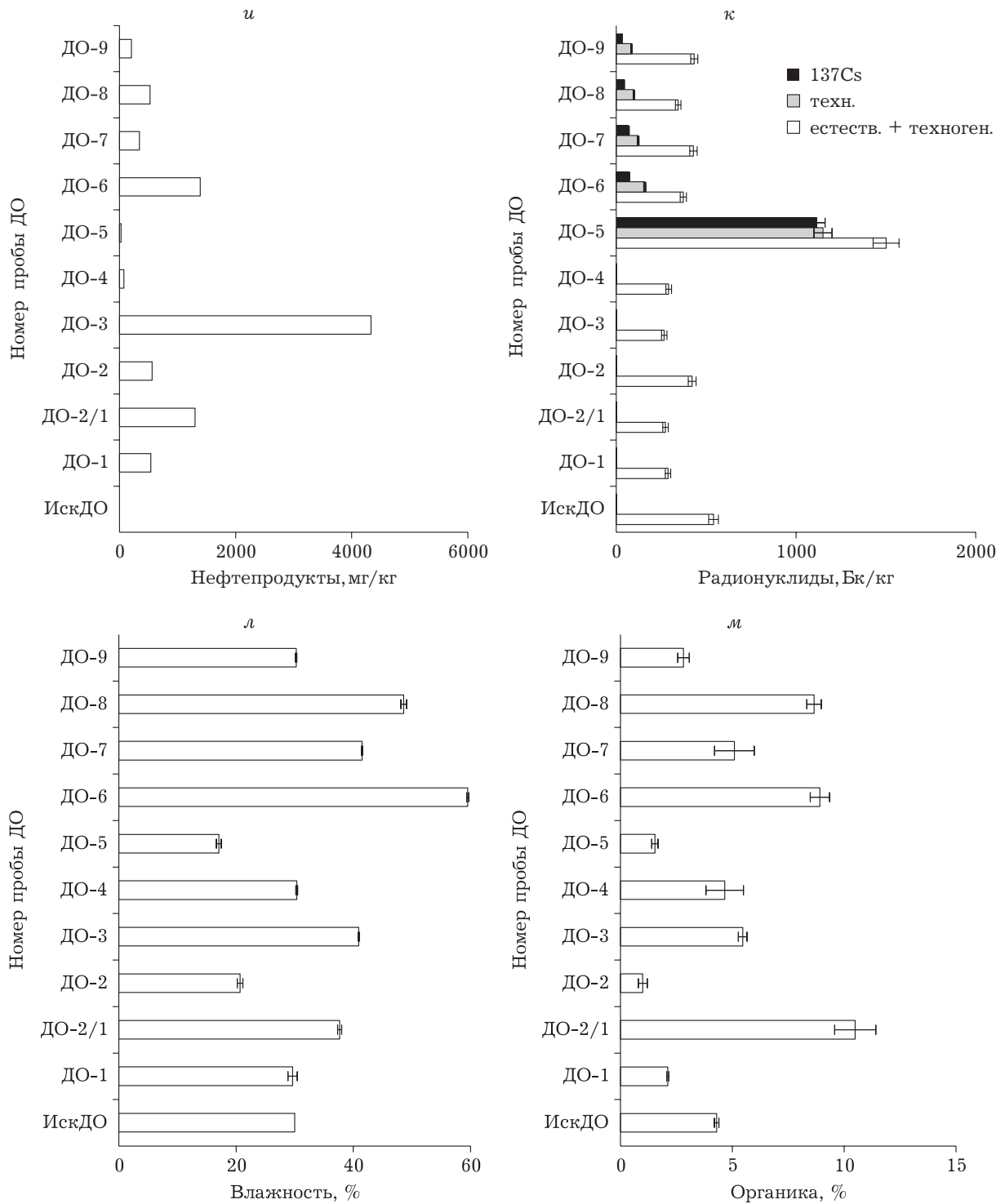


Рис. 2 (окончание). Содержание потенциально токсичных металлов, радионуклидов, нефтепродуктов, биогенных элементов, влаги и органического вещества в пробах донных отложений р. Енисей, использованных для биотестирования. Пунктирной линией обозначены пороговые концентрации, ниже которых вредоносные биологические эффекты маловероятны [ТЕС, MacDonalds et al., 2000]



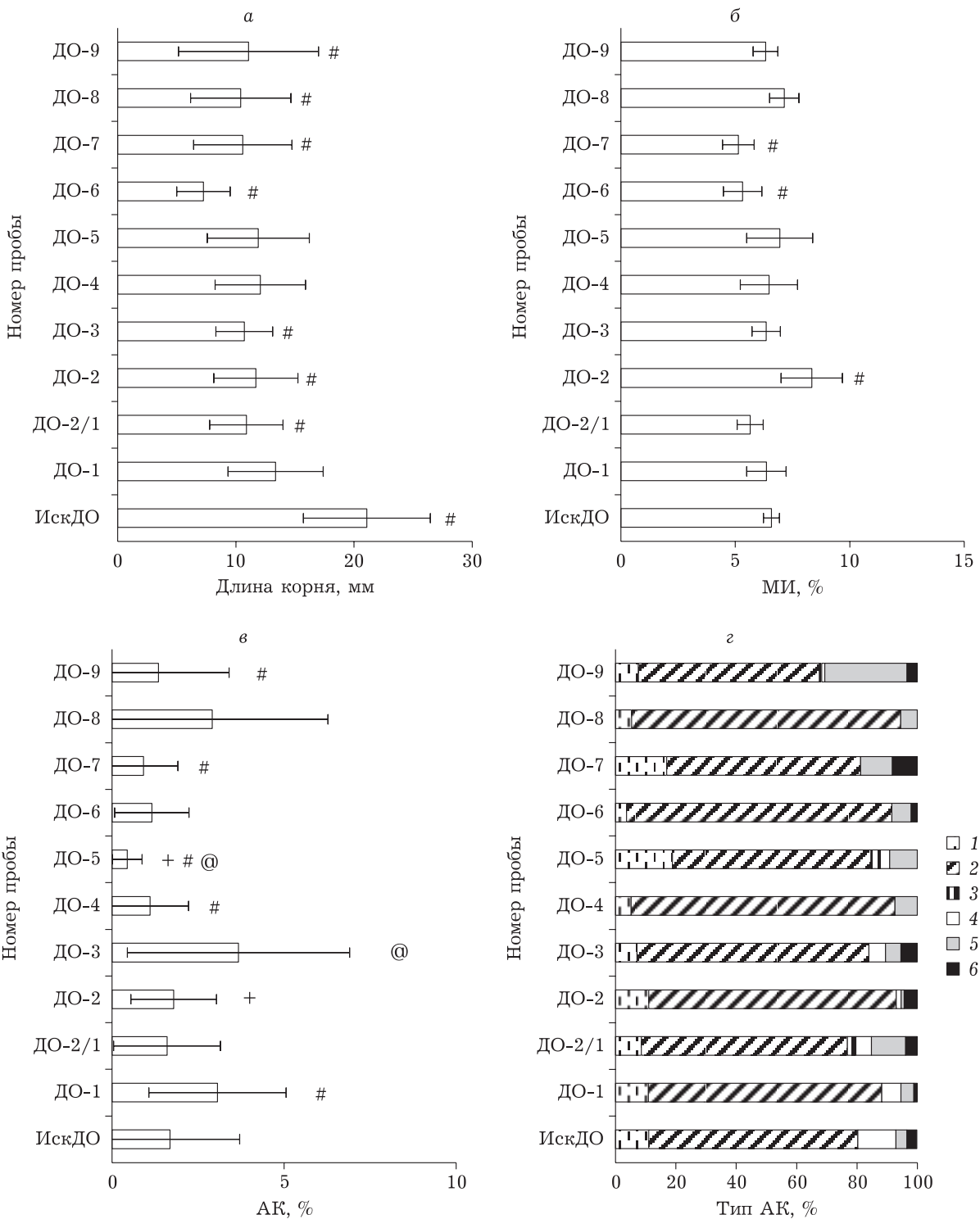


Рис. 3. Величины индикаторных параметров лукового теста на пробах донных отложений р. Енисей, полученные в результате лабораторного тестирования: а – средняя длина корня; б – митотический индекс (МИ); в – доля aberrантных клеток (АК); г – доля клеток с различными типами aberrаций хромосом (1 – мосты, 2 – фрагменты, 3 – агглютинация, 4 – аномалии расхождения; 5 – блуждающие хромосомы; 6 – множественные нарушения). Одинаковыми метками над столбцами обозначены достоверно ( $p < 0,05$ ) отличающиеся величины

клеток (АК) составила 1,6 %. Величина АК в природном контроле (ДО-1) достоверно превышала ( $p < 0,05$ ) этот показатель в пробах ДО-4, 5, 7, 9.

Из числа встреченных аномалий хромосом преобладали фрагменты (60–89 %), в основном одиночные (см. рис. 3, з). В сумме аномалии, обусловленные разрывами ДНК (фрагменты, мосты, агглютинация хромосом), доминировали, составляя 68–95 % от общего числа аномалий. Аномалии, являющиеся следствием нарушения работы веретена деления (блуждающие хромосомы, неравномерный и многополосный митоз), составляли в сумме от 3 до 28 % от общего числа повреждений. Доля клеток с множественными нарушениями не превышала 8 % (см. рис. 3, з).

**Вариабельность и чувствительность индикаторных показателей лука.** Средние величины коэффициентов вариабельности индикаторных параметров лука изменялись в диапазоне от 14 до 99 %. Наименее вариабельным параметром лукового теста оказался митотический индекс: его коэффициент вариабельности изменялся от 9 до 21 % на разных пробах ДО (табл. 2), наиболее вариабельным параметром – доля аномальных клеток (КВ = 65–152 %).

Коэффициент чувствительности индикаторных показателей лука к качеству ДО р. Енисей (КЧ, %) показывает силу реакции индикаторного параметра на изменение качества проб ДО в рамках исследованного набо-

ра из 10 проб природных ДО. Примерно равные величины КЧ получены для длины корня и МИ (50–56 %), самый высокий – для АК (179 %) (см. табл. 2). Таким образом, полученные коэффициенты показывают, что доля аномальных клеток варьировалась между пробами ДО примерно в 3 раза сильнее, чем МИ и длина корня.

**Корреляция индикаторных показателей лука с содержанием токсикантов в ДО.**

В ходе исследования проанализирована связь индикаторных параметров лука (длины корня, митотического индекса, доли аномальных клеток) с содержанием потенциальных токсикантов (см. рис. 2), биогенов, влаги и органического вещества в пробах ДО р. Енисей. В результате корреляционного анализа выявлена достоверная положительная зависимость между долей аномальных клеток и содержанием меди ( $r = 0,6605$ ;  $p = 0,038$ ) и нефтепродуктов ( $r = 0,6326$ ;  $p = 0,050$ ) в пробах ДО. Выход минорных типов аномалий хромосом положительно коррелировал с содержанием некоторых токсикантов в пробах ДО: множественные аномалии с содержанием меди ( $r = 0,6581$ ;  $p = 0,039$ ), свинца ( $r = 0,7975$ ;  $p = 0,006$ ) и нефтепродуктов ( $r = 0,8558$ ;  $p = 0,002$ ); агглютинация – с содержанием цинка ( $r = 0,6745$ ;  $p = 0,032$ ); аномалии расхождения хромосом – с содержанием нефтепродуктов ( $r = 0,6578$ ;  $p = 0,039$ ). Также выявлена обратная зависимость средней длины корня от содержания общего азота ( $r = -0,8863$ ;  $p = 0,001$ ), орга-

Т а б л и ц а 2  
Характеристика индикаторных параметров лукового теста

Показатель	Длина корня, см	МИ <sup>1</sup> , %	АК <sup>2</sup> , %
КВ <sup>3</sup> , % (n = 10)			
Среднее значение	34	14	99
Диапазон	22–54	9–21	65–152
Чувствительность к качеству ДО, %	56	50	179
% от природного контроля (n = 9)			
Среднее значение	80 ± 11	101 ± 16	54 ± 33
Диапазон	54–90	81–131	14–120
% от искусственного контроля (n = 10)			
Среднее значение	52 ± 8	97 ± 14	101 ± 59
Диапазон	34–63	78–127	51–205

<sup>1</sup>МИ – митотический индекс, <sup>2</sup>АК – доля aberrантных клеток; <sup>3</sup>КВ – коэффициент вариабельности.

нического вещества ( $r = -0,6738$ ;  $p = 0,033$ ) и влаги в ДО ( $r = -0,7849$ ;  $p = 0,007$ ).

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ проб ДО р. Енисей показал, что содержание потенциально токсичных тяжелых металлов, техногенных радионуклидов, нефтепродуктов и биогенов, а также физические свойства ДО варьируют в значительной степени. В большинстве ДО р. Енисей присутствует смесь потенциально токсичных веществ различной природы. Однако содержание потенциально токсичных металлов в исследованных пробах ДО Енисея не превышало установленные на основе консенсуса пороговые концентрации, выше которых вероятны вредоносные эффекты [MacDonald et al., 2000]. Исходя из полученных данных, возникает вопрос: достаточно ли чувствительны индикаторные параметры лукового теста к качеству исследуемых проб ДО р. Енисей. Подобные задачи решаются при подборе индикаторов для биотестирования ДО с относительно низким уровнем антропогенного загрязнения [Höss et al., 2010].

Известно, что индикаторные параметры одного растения обладают разной чувствительностью к токсикантам [Arts et al., 2008]. Анализ использованных для тестирования ДО р. Енисей индикаторных параметров лука с точки зрения их вариабельности и чувствительности показал (см. табл. 2), что относительно низкой вариабельностью, приемлемой в экотоксикологических исследованиях [Arts et al., 2008; Höss et al., 2010; Feiler et al., 2013], характеризуются МИ и средняя длина корня. Эти индикаторы показали одинаковую чувствительностью к качеству ДО, сравнимую по величине с чувствительностью длины побегов и МИ элодеи канадской при тестировании тех же проб ДО [Zotina et al., 2015b]. Интенсивность реакции индикатора генотоксичности (АК) на изменение качества ДО р. Енисей в луковом тесте оказалась в три раза выше, чем индикаторов цитотоксичности и общей токсичности (см. табл. 2). Однако индикатор генотоксичности лука являлся наиболее вариабельным, что подтверждено другими авторами [Junior et al., 2007] и отмечалось ранее для элодеи канадской [Zotina et al., 2015b]. При высокой вариабельности трудно полу-

чить достоверные отличия значений индикаторного параметра между точками ДО, что и наблюдалось в проведенном эксперименте. Высокая вариабельность индикатора генотоксичности в эксперименте обусловлена, в числе прочих факторов, отсутствием aberrантных ана-телофазных клеток в отдельных корнях лука. Возможно, для решения данной проблемы следует использовать более короткие корни.

Отклик индикатора общей токсичности – длины корня лука, в проведенном эксперименте незначительно варьировал между пробами ДО р. Енисей. Максимальная средняя длина корня зарегистрирована в искусственном контроле. В среднем длина корня лука в искусственном контроле больше, чем на большинстве проб ДО р. Енисей (см. табл. 2). Минимальная длина корня зарегистрирована на пробе ДО-6. Данная проба характеризуется самой высокой влажностью, повышенным содержанием органики, нефтепродуктов и азота по сравнению с контролем. Корреляционный анализ выявил достоверную обратную зависимость длины корня лука от содержания азота, органики и влаги в пробах ДО. Ранее показано, что низкая концентрация азота может стимулировать рост корней *Allium* [Seesay, 1980], что косвенно согласуется с полученным нами результатом.

Значительного изменения пролиферативной активности (МИ) – индикатора цитотоксичности – на разных пробах ДО р. Енисей не наблюдалось. В среднем данный показатель в корнях лука на пробах р. Енисей и в искусственном контроле находился на одном уровне (см. табл. 2). Повышенная пролиферативная активность отмечена в клетках корней лука на пробе ДО-2, которая характеризовалась низким содержанием потенциальных токсикантов по сравнению с контролем. Корреляции МИ с каким-либо показателем качества ДО не выявлено. В целом значения МИ, полученные в эксперименте, попадают в диапазон величин, зарегистрированных другими авторами в луковом тесте. Под действием одиночных токсикантов (металлов и органических соединений) в модельных экспериментах отмечалось снижение МИ в корнях лука [Yildiz, Arıkan, 2008; Yıldiz et al., 2009; Seth et al., 2009; Türkoğlu, 2012], а под действием смеси токсикантов в естественных ДО и природных водах отмечалось как снижение, так

и стимуляция МИ [Evseeva et al., 2005; Удалова и др., 2014].

Аберрации хромосом не являются специфическим индикатором и могут появиться в результате воздействия токсикантов химической и радиационной природы. Повреждения хромосом в клетках лука регистрировались в присутствии тяжелых металлов, гербицидов, нефтяных углеводородов, радионуклидов и других токсинов, а также их смесей [Evseeva et al., 2005; Seth et al., 2008; Yildiz, Arikan, 2008; Leme, Marin-Morales, 2009; Yildiz et al., 2009; Geras'kin et al., 2011; Türkoğlu, 2012; Удалова и др., 2014; Firbas, Amon, 2014]. В результате эксперимента наиболее высокие доли АК, достоверно не отличающиеся друг от друга, зафиксированы на трех пробах: ДО-1, ДО-3 и ДО-8 (см. рис. 3, в); максимальная доля аномальных клеток – на пробе ДО-3, характеризующейся высоким содержанием меди, цинка, свинца, кадмия и нефтепродуктов (см. рис. 2). В ней также зафиксирована максимальная доля aberrантных клеток в корнях элодеи канадской [Zotina et al., 2015b]. При тестировании почв, загрязненных  $^{137}\text{Cs}$ , отмечался высокий уровень aberrантных клеток в корнях лука [Kovalchuk et al., 1988]. В проведенном эксперименте, наоборот, минимальная доля аномальных клеток зафиксирована на пробе ДО-5 с наиболее высоким содержанием радиоцезия ( $^{137}\text{Cs}$ ) (см. рис. 2, к). Из проб ДО р. Енисей, содержащих повышенный уровень техногенных радионуклидов (ДО-5–ДО-9), только в пробе ДО-8 обнаружен повышенный уровень аномальных клеток, где помимо техногенных радионуклидов отмечено повышенное содержание меди и никеля. Корреляционный анализ позволил выявить положительную зависимость уровня генотоксичности ДО р. Енисей от содержания в них меди и нефтепродуктов.

Спектр хромосомных нарушений, встречаемых в клетках лука на исследованных пробах ДО р. Енисей, оказался идентичен спектру в искусственном контроле: преобладали нарушения, обусловленные разрывами ДНК (мосты, фрагменты, агглютинация). Данный тип повреждений хроматид характерен для действия тяжелых металлов. Например, в луковом тесте под действием меди и кобальта доминировали именно такие аберрации [Yildiz et al., 2009]. В корнях элодеи канадской при

тестировании проб ДО р. Енисей также преобладали нарушения хромосом, обусловленные разрывами ДНК, но спектр нарушений являлся другим, что, возможно, обусловлено более длительным воздействием потенциальных токсикантов на элодею, поскольку эксперимент с элодеей длился в 5 раз дольше, чем с луком [Zotina et al., 2015a, b]. Генотоксический эффект может быть вызван не только прямым повреждением структуры ДНК, но и непрямым способом – через присоединение токсикантов к белкам, поддерживающим целостность генома (тубулинам, ферментам, участвующим в репарации ДНК и др.) [Mateuca et al., 2006]. В проведенном исследовании на долю клеток, в которых аномалии хромосом вызваны повреждением работы митотического аппарата, приходилось не более 28 % от общей доли aberrантных клеток (на пробе ДО-8). Доля аномалий, обусловленных повреждением веретена деления, в корнях лука может варьировать в широком диапазоне под действием тяжелых металлов и органических токсикантов [Yildiz, Arikan, 2008; Yildiz et al., 2009].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тестирование цельных донных отложений р. Енисей с использованием лукового теста показало, что индикатор генотоксичности – доля аномальных клеток в корнях лука – обладает наибольшей чувствительностью к качеству ДО, равно как и наибольшей вариабельностью по сравнению с индикаторами общей токсичности и цитотоксичности. Присутствие смеси токсикантов в пробах ДО р. Енисей вызвало как стимуляцию, так и снижение выхода доли аномальных клеток в корнях лука на разных пробах. В присутствии токсикантов радиационной природы не отмечено стимуляции доли аномальных клеток, тогда как в присутствии смеси органических и химических токсикантов зарегистрировано возрастание генотоксичности и достоверно выявлена ее положительная корреляция с содержанием меди и нефтепродуктов. Индикаторы цитотоксичности (митотический индекс) и общей токсичности (средняя длина корня) обладали меньшей чувствительностью к качеству ДО р. Енисей, чем индикатор генотоксичности, однако достаточной,

чтобы проявить достоверную стимуляцию и угнетение на некоторых пробах ДО. Реакции индикаторных параметров общей токсичности, цито- и генотоксичности лукового теста на качество проб ДО р. Енисей не совпадали. Экстремально сильных реакций индикаторных параметров лукового теста на качество исследованных ДО не выявлено, что, вероятно, является следствием низкого уровня техногенного загрязнения исследованных проб и согласуется с результатами химического анализа. На основе результатов проведенного тестирования можно заключить, что индикаторные параметры лукового теста обладают достаточной чувствительностью к присутствию потенциальных токсикантов в ДО р. Енисей и могут использоваться для контактного тестирования донных отложений р. Енисей наряду с тестом на основе элодеи канадской.

Авторы благодарят сотрудников лаборатории радиоэкологии ИБФ СО РАН за помощь в отборе проб, проведении экспериментов и анализе данных.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Болсуновский А. Я., Муратова Е. Н., Суковатый А. Г., Пименов А. В., Санжараева Е. А., Зотина Т. А., Седельникова Т. С., Паньков Е. В., Корнилова М. Г. Радиоэкологический мониторинг реки Енисей и цитогенетические характеристики водного растения *Elodea canadensis* // Радиационная биология. Радиоэкология. 2007. Т. 47, № 1. С. 63–73.
- Дементьев Д. В., Болсуновский А. Я., Борисов Р. В., Трофимова Е. А. Содержание тяжелых металлов в донных отложениях реки Енисей в районе Красноярск // Изв. Том. политех. ун-та. 2015. Т. 326, № 5. С. 91–98.
- Зотина Т. А., Трофимова Е. В., Болсуновский А. Я., Анищенко О. В. Экспериментальная оценка возможности использования погруженных макрофитов для биотестирования донных отложений р. Енисей // Сиб. экол. журн. 2014. № 4. С. 547–560 [Зотина Т. А., Трофимова Е. А., Bolsunovsky A. Ya., Anishenko O. V. Experimental estimation of the possible use of submerged macrophytes for biotesting bottom sediments of the Yenisei River // *Contemp. Probl. Ecol.* 2014. Vol. 7, N 4. P. 410–421].
- Карта реки Енисей от Красноярской ГЭС до устья реки Ангара. ФГУ «Енисейречтранс» СПб.: Изд-во ГБУ «Волго-Балт», 2008. 91 с.
- Медведева М. Ю., Болсуновский А. Я., Зотина Т. А. Цитогенетические нарушения у водного растения *Elodea canadensis* в зоне техногенного загрязнения р. Енисей // Сиб. экол. журн. 2014. № 4. С. 561–572 [Medvedeva M. Yu., Bolsunovsky A. Ya., Zotina T. A. Cytogenetic abnormalities in aquatic plant *Elodea canadensis* in anthropogenic contamination zone of Yenisei River // *Contemp. Probl. Ecol.* 2014. Vol. 7. P. 422–432].
- Муратова Е. Н., Горячкина О. В., Корнилова М. Г., Пименов А. В., Седельникова Т. С., Болсуновский А. Я. Цитогенетическое изучение водных растений акватории Енисей в зоне радиационного загрязнения // Изв. РАН. Сер. биол. 2014. № 5. С. 510–517.
- Сухоруков Ф. В., Дегерменджи А. Г., Белопещский В. М., Болсуновский А. Я., Ковалев С. И., Косолапова Л. Г., Мельгунов М. С., Рапута В. Ф. Закономерности распределения и миграции радионуклидов в долине р. Енисей. Новосибирск: Изд-во СО РАН, филиал «Гео», 2004. 286 с.
- Удалова А. А., Гераскин С. А., Дикарев В. Г., Дикарева Н. С. Оценка цито- и генотоксичности природных вод в районе расположения хранилища радиоактивных отходов с помощью *Allium*-тест // Радиационная биология. Радиоэкология. 2014. Т. 54, № 1. С. 97–106.
- Arts G. H. P., Belgers J. D. M., Hoekzema C. H., Thissen J. T. N. M. Sensitivity of submerged freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests // *Environ. Pollut.* 2008. Vol. 153. P. 199–206.
- Bolsunovsky A., Bondareva L. Actinides and other radionuclides in sediments and submerged plants of the Yenisei River // *J. Alloy. Compd.* 2007. Vol. 444–445. P. 495–499.
- Ceesay M. A. Growth and nitrogen nutrition studies of onions (*Allium cepa* L.). A thesis ... for the degree of Master of Horticultural Science in Horticultural Production at Massey University. 1980. (Электронный ресурс <https://mro.massey.ac.nz/handle/10179/7373>).
- Clément B., Devaux A., Perrodin Y., Danjean M., Ghidini-Fatus M. Assessment of sediment ecotoxicity and genotoxicity in freshwater laboratory microcosms // *Ecotoxicology.* 2004. Vol. 12. P. 323–333.
- da Costa T. C., de Brito K. C., Rocha J. A., Leal K. A., Rodrigues M. L., Minella I. P., Matsumoto S. T., Vargas V. M. Runoff of genotoxic compounds in river basin Sediments under the influence of contaminated soils // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2012. Vol. 75. P. 63–72.
- Diepens N. J., Arts G. H. P., Brock T. C. M., Smidt H., Van Den Brink P. J., Heuvel-Greve M. J., Koelmans A. A. Sediment toxicity testing of organic chemicals in the context of prospective risk assessment: a review // *Crit. Rev. Environ. Sci. Tec.* 2014. Vol. 44, N 3. P. 255–302.
- Evseeva T. I., Geras'kin S. A., Shuktomova I. I., Taskaev A. I. Genotoxicity and cytotoxicity assay of water sampled from the underground nuclear explosion site in the north of the Perm region (Russia) // *J. Environ. Radioactiv.* 2005. Vol. 80. P. 59–74.
- Feiler U., Höss S., Ahlf W., Gilbert D., Hammers-Wirtz M., Hollert H., Meller M., Neumann-Hensel H., Ottermanns R., Seiler T. B., Spira D., Heininger P. Sediment contact tests as a tool for the assessment of sediment quality in German waters // *Environ. Toxicol. Chem.* 2013. Vol. 32. P. 144–155.
- Fent K. Ecotoxicology of organotin compounds // *Crit. Rev. Toxicol.* 1996. Vol. 26. P. 1–117.
- Firbas P. A survey of *Allium cepa* L. Chromosome damage in Slovenian environmental water, soil and rainfall samples // *Int. Journ. Curr. Res. Biosci. Plant Biol.* 2015. Vol. 2. P. 62–83.
- Firbas P., Amon T. Chromosome damage studies in the onion plant *Allium cepa* L. // *Caryologia.* 2014. Vol. 67. P. 25–35.
- Fiskesjö G. The *Allium*-test as a standard in environmental monitoring // *Hereditas.* 1985. Vol. 102. P. 99–112.
- Geras'kin S., Oudalova A., Michalik B., Dikareva N., Dikarev V. Genotoxicity assay of sediment and water



- samples from the Upper Silesia post-mining areas, Poland by means of *Allium*-test // *Chemosphere*. 2011. Vol. 83. P. 1133–1146.
- Haring H. J., Smith M. E., Lazorchak J. M., Crocker P. A., Euresti A., Wratschko M. C., Schaub M. C. Comparison of bulk sediment and sediment elutriate toxicity testing methods // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2010. Vol. 58. P. 676–683.
- Höss S., Ahfl W., Fahnenstich C., Gilberg D., Hollert H., Melbye K., Meller M., Hammers-Wirtz M., Heininger P., Neumann-Hensel H., Ottermanns R., Ratte H. T., Seiler T. B., Spira D., Weber J., Feiler U. Variability of sediment-contact tests in freshwater sediments with low-level anthropogenic contamination – Determination of toxicity thresholds // *Environ. Pollut.* 2010. Vol. 158, N 9. P. 2999–3010.
- Júnior H. M., Silva J., Arenson A., Portela C. S., Fernandes de Sa Ferreira I. C., Henriques J. A. P. Evaluation of genotoxicity and toxicity of water and sediment samples from a Brazilian stream influenced by tannery industries // *Chemosphere*. 2007. Vol. 67. P. 1211–1217.
- Kovalchuk O., Kovalchuk I., Arkhipov A., Telyuk P., Hohn B., Kovalchuk L. The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident // *Mutat. Res.* 1988. Vol. 415. P. 47–57.
- Leme D. M., Marin-Morales M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application // *Ibid.* 2009. Vol. 682. P. 71–81.
- MacDonald D. D., Ingersol C. G., Berger T. A. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2000. Vol. 39. P. 20–31.
- Mateuca R., Lombaert N., Aka P. V., Decordier I., Kirsch-Volders M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring // *Biochimie*. 2006. Vol. 88. P. 1515–1531.
- Mothersill C., Austin B. *In vitro* Methods in Aquatic Toxicology. Berlin, Germany: Springer, 2003. 472 p.
- Seth C. S., Mirsa V., Chauhan L. K. S., Singh R. R. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: Cytogenetic and Comet assay approach // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2008. Vol. 71. P. 711–716.
- Търкоглу S. Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content, and comet assay // *Pestic. Biochem. Physiol.* 2012. Vol. 103. P. 224–230.
- Yildiz M., Arikan E. S. Genotoxicity testing of quizalofop-P-ethylherbicide using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay // *Caryologia*. 2008. Vol. 61. P. 45–52.
- Yildiz M., Çiğerci I. H., Konuk M., Fidan A. F., Terzi H. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays // *Chemosphere*. 2009. Vol. 75. P. 934–938.
- Zotina T., Medvedeva M., Trofimova E., Alexandrova Yu., Dementyev D., Bolsunovsky A. Chromosomal abnormalities in roots of aquatic plant *Elodea canadensis* as a tool for testing genotoxicity of bottom sediments // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2015a. Vol. 122. P. 384–391.
- Zotina T. A., Trofimova E. A., Medvedeva M. Yu., Dementyev D. V., Bolsunovsky A. Ya. Use of the aquatic plant *Elodea canadensis* to assess toxicity and genotoxicity of Yenisei River sediments // *Environ. Toxicol. Chem.* 2015b. Vol. 34. P. 2310–2321.

## Assessment of the quality of bottom sediments of the middle reaches of the Yenisei River with *Allium* test

T. A. ZOTINA, E. A. TROFIMOVA, Yu. V. ALEXandrova, O. V. ANISHCHENKO

*Institute of Biophysics, Federal Research Center “Krasnoyarsk Scientific Center” of SB RAS  
660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50/50  
E-mail: t\_zotina@ibp.ru*

Harmful potential of bulk bottom sediments (BS) of the Yenisei River was estimated with *Allium* test. Sediment samples were collected in ten sites at about 100-km stretch of the middle reaches of the Yenisei affected by urban activity of the city of Krasnoyarsk and industrial plants. The samples of sediments differed considerably in concentration of potentially toxic substances (heavy metals, artificial radionuclides and organic pollutants), nutrients and physical properties. Average length of root of onion was considered as indicator of general toxicity, mitotic index – as indicator of cytotoxicity, and percent of ana-telophase cells in the root apices carrying abnormal chromosomes – as indicator of genotoxicity. Both stimulation and inhibition of indicator endpoints was revealed on sediment samples of the Yenisei relatively to control (artificial sediments). Increased genotoxicity was recorded on the sediments sample, contaminated with mixture of organic and chemical toxins. Significant positive correlation of percent of abnormal cells and concentration of copper and petrochemicals in sediment samples was revealed. Extremely strong reactions of onion endpoints to the quality of BS were not revealed, probably due to relatively low level of contamination of the sediment samples. This is in agreement with the results of chemical analyses. Based on the results of the testing we can conclude that the endpoints of the *Allium* test are sensitive enough to the quality of BS of the Yenisei River and can be used for their biotesting.

**Key words:** ana-telophase, artificial sediments, genotoxicity, length of root, mitotic index, toxicity.