

4. Малер Г., Кордес Ю. Основы биологической химии. М., 1970. 567 с.
5. Ohman C. The structure and function of the adhesive organ in strigeid trematodes. III *Apatemon gracilis minor* (Yamaguti, 1933) // *Parasitol.* 1966. Vol. 56, № 2. P. 209-226.
6. Ястребов М. Б. Мускулатура тела некоторых трематод и фиксация фаз в эволюции присасывательной функции // *Зоол. журн.* 1997. Т.76, № 6. С. 645-656.
7. Ошмарин А. П. К изучению закономерностей начальных стадий развития гельминтов // *Экология гельминтов.* Ярославль, 1977. Вып. 1. С. 53-61.

*Галина Александровна ПЕТУХОВА —
доцент кафедры экологии и генетики,
кандидат биологических наук;
Мамлакат Сабировна ИШБУЛАЕВА;
Нелли Петровна СЕМЕРИКОВА;
Светлана Вячеславовна ТРУБИНА —
студенты биологического
факультета ТюмГУ*

УДК 681.3.574.3.575.224

ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ ШАЙМСКОЙ НЕФТИ И ЕЕ ВОДОРАСТВОРИМОЙ ФРАКЦИИ В ТЕСТАХ НА ДРОЗОФИЛЕ

АННОТАЦИЯ. В работе приведены результаты изучения генетической опасности нефти и ее водорастворимой фракции в экспериментах на дрозофиле. Показана высокая токсичность и генетическая опасность нефти и ее водорастворимой фракции для мух.

The article discovers a genetic danger of oil and its water-soluble factions in experiments on drosophila. High toxicity and genetic danger of oil and its water-soluble factions for flies are shown there.

Интенсивная разработка нефтяных и газовых месторождений в Тюменской области остро ставит проблему охраны богатой северной природы. Наиболее тяжелыми и опасными по своим последствиям являются загрязнения подземных и наземных пресных вод и почвы. К основным загрязнителям в глобальном масштабе относятся нефть, буровой и нефтяной шламы и сточные воды нефтеперерабатывающих производств [1]. Катастрофические нефтяные загрязнения, особенно если они продолжительны, вызывают сукцессию прибрежных и придонных сообществ с локальной и региональной аккумуляцией нефтепродуктов. При этом различные загрязнения действуют в комплексе и возможно изменение генотипа представителей биоты, а также общее ухудшение качества воды [2]. Известно, что нефть — многокомпонентная система, состав которой очень гетерогенен [3]. Наиболее опасными для организмов компонентами нефти являются ее растворимые и эмульгированные фракции, так как, попадая в организм гидробионтов, они могут проходить через многих представителей пищевой цепи, не претерпевая существенных изменений в силу своей химической инертности. О высокой токсичности сырой нефти и составляющих ее компонентов известно из литературы [4-7]. Мутагенная и тератогенная активность нефти и ее водорастворимой фракции изучена недостаточно. В связи с этим и было предпринято данное исследование.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве тест-объекта для проверки токсического, мутагенного и тератогенного действия сырой шаимской нефти и ее водорастворимой фракции (ВРФН) использовали мух *Drosophila melanogaster* линии Кантон-С (серое тело) и линии yellow (желтое тело).

В начале экспериментов была определена полулетальная концентрация нефти в питательной среде для дрозофилы по методу Миллера-Тейнера, дополненного регрессионным анализом [8]. В наших исследованиях полулетальная концентрация нефти в среде составила 5,2%. Эта концентрация и использовалась в дальнейших экспериментах.

Токсические свойства нефти оценивали в тесте на выживаемость дрозофил, содержащихся в течение 30 дней на среде с добавлением нефти в полулетальной концентрации. Тератогенность тестируемого вещества изучали в тесте на морфозы типа «вырезка на крыле» и в тесте на частоту возникновения укороченных щетинок у мух, развившихся на среде с добавлением нефти. У мух F1 оценивали влияние нефти на половые клетки: учет вели в тесте на доминантные летали (регистрировали гибель яиц, отложенных обработанными самками). Возможность сохранения негативных последствий от нефтяного загрязнения в половых клетках мух оценивали по частоте доминантных леталей у необработанных особей F2, являющихся потомками мух, развившихся на среде, загрязненной нефтью. Для оценки цитогенетических нарушений, возникающих при действии сырой шаимской нефти, токсикант вносили в среду в концентрации 1% и 5%. Приготовление цитологических препаратов из нервных ганглиев личинок 3 возраста дрозофилы проводили по стандартной методике [9].

Исследование токсического действия водорастворимой фракции нефти (ВРФН) проводили при учете выживаемости мух, содержащихся на среде с токсикантом, плодовитости дрозофил, а также по количеству неразвившихся яиц, после нанесения на них 3-4 капель испытуемого вещества (эмбриотоксический эффект ВРФН). Для выяснения влияния ВРФН на половые клетки дрозофилы проводили изучение частоты доминантных леталей у особей, развившихся на среде с токсикантом. Мутагенность водорастворимой фракции нефти исследовали при учете нерасхождений и потерь X-хромосом у гибридов F1 от скрещивания виргинных самок линии Кантон-С с самцами линии w^a В. Тератогенность ВРФ шаимской нефти оценивали по частоте появления морфозов типа «вырезка на крыле» у мух F1, развившихся в питательной среде с добавлением тестируемого вещества. Концентрация ВРФН в эксперименте была 2,5%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование выживаемости мух, содержащихся в течение 20 дней на среде с добавлением 5,2% сырой шаимской нефти (табл. 1), показало, что как у самок, так и у самцов в эксперименте идет снижение по сравнению с контролем ($P < 0,05$) величины изучаемого показателя, особенно выраженное у самцов по сравнению с самками. Вероятно, снижение выживаемости дрозофил связано с токсическим действием сырой нефти на мух. Полученные нами данные согласуются с результатами, известными из литературы о токсичности нефтепродуктов [10, 11].

Частота гибели яиц у мух, развившихся на среде с тестируемым агентом (3,8%), и у их потомков, развившихся в чистой среде (3,0%), была выше контрольного уровня (1,1%), что свидетельствует о влиянии нефти на половые клетки мух. Появление доминантных леталей в опыте связано, прежде всего, с увеличением, по сравнению с контролем, частоты ранних леталей. Известно [12-14], что причиной ранней эмбриональной гибели яиц являются повреждения в цитоплазме ооцита, дефицит в геноме

важных для эмбриогенеза хромосом, не восстановленные хроматидные разрывы и хромосомные aberrации, различные физиологические нарушения. Поздние эмбриональные летали возникают в результате хромосомных перестроек и последующей утраты хромосомного материала в митозах дробления или в результате таких повреждений хромосом, которые препятствуют процессу репликации [15]. Исходя из природы доминантных леталей, можно заключить, что ранние и поздние эмбриональные летали имеют как генетическую, так и физиологическую этиологию, поэтому можно говорить о генотоксичности данного агента. Повышение частоты ранних леталей при действии сырой шаимской нефти (в опыте 3,6%, в контроле — 0,8%) свидетельствует о генотоксичности испытуемого вещества.

Таблица 1

**Выживаемость мух при содержании на среде с добавлением нефти
в полулетальной концентрации**

Вариант опыта	Кол-во мух	Выживаемость мух на ...день (%)						
		4	10	14	18	22	26	31
Самки								
Контроль	120	97,5 ± 1,42	88,3 ± 2,93	83,3 ± 3,40	73,3 ± 4,04	47,5 ± 4,56	41,0 ± 4,50	31,7 ± 4,25
Опыт	200	90,5 ± 2,07 *	83,0 ± 2,66	72,0 ± 3,17 *	43,5 ± 3,50 *	39,3 ± 3,46 *	26,1 ± 3,11 *	12,0 ± 2,30 *
Самцы								
Контроль	120	94,2 ± 2,13	83,4 ± 3,40	73,6 ± 4,02	65,0 ± 4,35	34,8 ± 4,35	29,3 ± 4,15	18,1 ± 3,51
Опыт	200	84,0 ± 2,59 *	67,3 ± 3,31 *	55,1 ± 3,52 *	34,2 ± 3,35 *	27,0 ± 3,14	15,7 ± 2,57 *	6,4 ± 1,73 *

Условные обозначения:

* — статистически достоверные отличия между опытом и контролем

У особей F₂, развившихся и содержащихся на чистой среде, но являющихся потомками обработанных родителей, частота доминантных леталей и прежде всего ранних эмбриональных леталей была значимо выше контрольного уровня (2,4%, а в контроле — 1,1%). Это, вероятно, связано с сохранением в половых клетках нарушений, возникших у обработанных родительских особей F₁, развившихся на среде с добавлением нефти. Таким образом, у сырой шаимской нефти выявлен не только эффект генотоксического влияния на половые клетки, но и эффект отдаленного действия, проявляющийся у потомков, полученных от обработанных родителей.

Тератогенные свойства нефти изучали при учете крыловых морфозов и частоты появления укороченных щетинок у дрозофил, развившихся в среде с добавлением нефти. Величины изучаемых показателей в опыте были статистически значимо выше контрольного уровня. Таким образом, нефть вызывала нарушения в ходе эмбрионального развития крыльев и щетинок у мух. Анализ цитогенетических нарушений в клетках нервных ганглиев дрозофилы проводили после их развития в среде с добавлением нефти. Было показано, что частота всех учитываемых нарушений (слипаний хромосом, пикнозов, пульверизации хромосом, дицентрических хромосом и фрагментации хромосом) не превышала контрольного уровня при внесении в питательную среду мух в концентрации 1%, и значимо увеличивала частоту как клеточных нарушений, так и перестроек хромосом при действии нефти в концентрации 5% (табл. 2). Из литературы известно отсутствие мутагенной активности двух видов сырой и двух видов топливной нефти у одноклеточных водорослей *Chlamydomonas*

reinhardi [16]. Было, однако, установлено [11], что действие нефтепродуктов на водоросли зависит от концентрации токсикантов: увеличение концентрации веществ вело к гибели талломов водорослей. Можно предположить, что при действии невысоких концентраций нефти возникают не крупные нарушения, а более мелкие генные мутации. Вероятно, с возникновением такого рода нарушений генетического материала связано повышение частоты гибели яиц, отложенных обработанными мухами, и сохранение этого показателя у необработанных потомков, полученных от обработанных родителей. При действии высоких концентраций нефти в среде возникают видимые хромосомные перестройки, увеличивающие гибель клеток и частоту нарушений в ходе эмбриогенеза, регистрируемую в наших исследованиях по показателям морфозов. Особую тревогу вызывают сохраняющиеся в половых клетках нарушения, регистрируемые у интактных потомков, полученных от обработанных родителей. Наличие у сырой шаимской нефти эффектов отдаленного действия указывает на большую опасность нефтяного загрязнения для последующих поколений.

Таблица 2

Частота клеточных нарушений и хромосомных перестроек при развитии мух в питательной среде с добавлением нефти

Варианты опыта	Кол-во клеток	Частота клеточных нарушений (слипания +пикнозы) ,%	Частота перестроек хромосом (%)
Концентрация нефти в среде 1 %			
Контроль	619	9,6 ± 1,18	4,2 ± 0,81
Нефть	426	12,8 ± 1,62	6,7 ± 1,21
Концентрация нефти в среде 5 %			
Контроль	600	10,8 ± 1,27	3,9 ± 0,79
Нефть	668	31,1 ± 1,79 *	18,9 ± 1,51 *

Наряду с изучением генотоксических свойств сырой шаимской нефти, нами проводилось исследование мутагенных, тератогенных и токсических свойств ее водорастворимой фракции.

Анализ токсичности ВРФН по показателям выживаемости мух на питательной среде с добавлением тестируемой фракции в концентрации 2,5% показал снижение жизнеспособности дрозофил, особенно самцов, в опытном варианте (табл. 3) по сравнению с уровнем контроля.

Таблица 3

Выживаемость мух при содержании на питательной среде с ВРФ Шаимской нефти (2,5 мг/л)

Вариант опыта	Кол-во мух	Выживаемость мух на ... день (%)					
		1	5	9	14	20	26
Самки							
Контроль	225	100 - 0,10	82,2 ± 2,55*	70,0 ± 3,05	62,4 ± 3,23	44,9 ± 3,31	31,3 ± 3,09
Опыт	225	100 - 0,10	74,5 ± 3,65*	38,7 ± 3,98*	23,3 ± 3,45*	4,0 ± 1,60*	1,3 ± 0,93*
Самцы							
Контроль	225	100 - 0,10	74,2 ± 2,92	65,1 ± 3,18	57,6 ± 3,29	34,0 ± 3,16	25,4 ± 2,90
Опыт	225	100 - 0,10	61,3 ± 3,98*	26,7 ± 3,61*	14,0 ± 2,83*	2,7 ± 1,31*	0 +0,07*

Токсическое влияние водорастворимой фракции нефти на половые клетки оценивали при исследовании удельной и реальной плодовитости самок. Оба изучаемых показателя у мух опытных вариантов были ниже контрольного уровня на 12-23%.

Эмбриотоксическое действие ВРФН исследовали при нанесении ее на отложенные мухами яйца. Было установлено увеличение частоты доминантных эмбриональных леталей (7,0%), особенно ранних (6,4%) в опытном варианте по сравнению с контролем (2,1%).

Анализ мутагенной активности ВРФН проводили при учете частоты доминантных леталей и частоты нерасхождений и потерь X-хромосом в половых клетках дрозофилы. Частота доминантных леталей у мух, развившихся в среде с добавлением 2,5% водорастворимой фракции нефти, была выше контрольного уровня (табл. 4).

Таблица 4

Частота доминантных леталей, морфозов, потерь и нерасхождений хромосом у мух после развития в среде с добавлением ВРФН

Вариант опыта	Частота ДЭЛ (%)	Частота нерасхождений хромосом	Частота потерь хромосом	Частота морфозов (%)
Контроль	2,7 ± 0,31	0,2 ± 0,11	0,0 ± 0,00	0,2 ± 0,11
Опыт	11,4 ± 1,11 *	0,9 ± 0,21 *	0,6 ± 0,17 *	1,4 ± 0,14*

Повышенная гибель яиц в опыте связана с ранней эмбриональной смертностью. Частота нерасхождений и потерь хромосом в опытном варианте была выше контрольного уровня, что свидетельствует о наличии у водорастворимой фракции шаимской нефти мутагенных свойств. У водорастворимой фракции шаимской нефти выявлено наличие тератогенных свойств: частота крыловых морфозов в опыте была значительно выше контрольной.

ВЫВОДЫ

1. Проведенные исследования показали, что у сырой шаимской нефти в экспериментах с дрозофилой выявлено токсическое влияние на соматические (при учете выживаемости) и половые клетки (при учете плодовитости). Мутагенность нефти зависела от ее концентрации в среде: при низких концентрациях мутагенность отсутствовала, а при высоких была значительной. Выявлены тератогенные свойства у тестируемого токсиканта. Установлен эффект отдаленного действия сырой нефти на половые клетки мух.

2. У ВРФН выявлен мутагенный эффект действия на половые клетки дрозофилы (при учете частоты доминантных леталей и частоты потерь и нерасхождений X-хромосом), токсический эффект на соматические и половые клетки и эмбриотоксический эффект. Установлено наличие тератогенных свойств у водорастворимой фракции шаимской нефти.

3. Загрязнение окружающей среды нефтью и ее водорастворимой фракцией представляет генетическую опасность для живых организмов, так как эти вещества обладают токсическими, мутагенными и тератогенными свойствами как для половых, так и для соматических клеток, что может привести к трудно прогнозируемому изменению генофондов популяций и перестройке внутри- и межпопуляционных взаимоотношений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Панов Г. Е., Петряшин П. К. Охрана окружающей среды на предприятиях нефтяной и газовой промышленности. М.: Недра, 1986. 244 с.

2. Inture A. D. Oil pollution and fisheries. Phil. Irans Roy. Soc. London. № 1084. 1982. P. 401-411.
3. Кегельман Г. С., Махмутбеков Э. А. Защита окружающей среды при добыче, транспортировке и хранении нефти и газа. М.: Недра, 1981. 265 с.
4. Ахмедова Г. П. Азотистый обмен головного мозга рыб при действии токсикантов. Автореф. дисс... канд. биол. наук. М., 1987. 23 с.
5. Дохолян В. К. Влияние растворенных нефтепродуктов на жизнедеятельность некоторых видов рыб Каспийского моря // Вопросы ихтиологии. 1980. Т. 20. Вып. 4. С. 733-738.
6. Михайлова Л. В. Влияние нефти на рыб и водных беспозвоночных // Рыбное хозяйство. 1974. № 6. С. 53-66.
7. Linden O. Effects of the oil on the amphipods *Gammarus oceanicus*. Environ. Pollut. 1976. № 4. P. 239-250.
8. Урбах В. Ю. Математическая обработка для биологов и медиков. М., 1963. С. 75-77.
9. Gatti M., Tansarella C., Olivieri G. Analysis of the chromosome aberration induced by X-ray in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Genetics. 1974. V. 79. № 4. P. 701-709.
10. Миронов О. Г. Биологические ресурсы моря и нефтяное загрязнение. М.: Пищевая промышленность, 1972. 105 с.
11. Focuda H. Acute toxicity nonpersistent oils on *Porhyra* and *Monostroma*. Hydrobiologia. 1987. № 151-152. P. 425-429.
12. Литвинова Е. М., Шварцман П. Я. Изучение механизма инактивации и мутагенеза при действии этиленimina на половые клетки // Генетика. 1973. Т. 9, № 7. С. 74-79.
13. Петрова Л. Г., Тихомирова М. М. Изучение эффекта последействия радиации на разные типы мутаций у дрозофилы. Сообщение 1. Доминантные летали // Генетика. 1973. Т. 9, № 5. С. 56-65
14. Kon Borsfel. Bleomycin: mode of action on DNA. Gann. Monogr. Cancer. Res. 1976. № 19. P. 51-62.
15. Шварцман П. Я., Анисимова А. И. Изучение механизма инактивации и мутагенеза при действии этиленimina на половые клетки дрозофилы // Генетика. 1973. Т. 9 № 3. С. 5-15.
16. Vandermeulen J. H., Lee R. W. Lack of mutagenic activity of crude and refined oils in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhartii* // Bull. Environ. Contam. and Toxicol. 1986. V. 36, № 2. P. 250-253.

*Галина Александровна ПЕТУХОВА —
доцент кафедры экологии и генетики,
кандидат биологических наук;
Наталья Михайловна КОВАЛЬЧУК;
Светлана Игоревна ВОЛКОВА —
студенты биологического
факультета ТГУ*

УДК 681.3.574.3.575.224

ОЦЕНКА ОПАСНОСТИ ЭФФЕКТОВ ПОСЛЕДЕЙСТВИЯ НЕФТИ С ПОМОЩЬЮ МОДЕЛЬНЫХ ТЕСТ-ОБЪЕКТОВ

*АННОТАЦИЯ. Исследовали влияние нефти на животных (*Drosophila melanogaster*, *Daphnia magna*). Показано, что у всех организмов, подвергавшихся кратковременному воздействию нефтяного загрязнения среды, снижаются основные показатели приспособленности. Сохранение эффектов последействия связано с сохранением генетических нарушений в клетках.*

*The oil influence on animals (*Drosophila melanogaster*, *Daphnia magna*). It is shown that all organisms, which were affected by short-term influence of the oil pollution,*