

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра морфологии и экологии животных

**ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ РЕЧНОГО ОКУНЯ
(*PERCA FLUVIATILIS*) ИЗ ВОДОЕМА-ОХЛАДИТЕЛЯ
БАЛАКОВСКОЙ АЭС**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 424 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология
биологического факультета

Сучковой Алины Геннадьевны

Научный руководитель:

Доцент кафедры
морфологии и экологии
животных, к. б. н.



М.Ю. Воронин

Зав. кафедрой
морфологии и экологии
животных, д.б.н.,
профессор



Г.В. Шляхтин

Саратов 2016

Введение

Биомониторинг предполагает слежение за биологическим эффектом антропогенного воздействия. При этом допускается, что некоторые показатели, используемые для наблюдения, объективно отражают состояние природных объектов в целом. Выбор этих показателей должен основываться на том, какие показатели наиболее значимо связаны с исследуемым фактором антропогенного воздействия. При сложности изучения экосистем в целом, гораздо эффективнее, зачастую, использовать в качестве индикатора конкретное сообщество, которое позволит в определенной мере судить о состоянии и тенденциях развития более крупной экосистемы.

С помощью метода учета микроядер показано, что в периферической крови рыб, подвергшихся действию высоких концентраций ацетата свинца, хлорида кадмия и сырой нефти, частота встречаемости эритроцитов со следами хромосомных поломок значительно превышает уровень спонтанно возникающих мутаций. При всех изученных сроках воздействия токсикантов в популяции эритроидных клеток наблюдается увеличение против нормы числа клеток с микроядрами и двуядерных клеток. Наблюдения показывают, что кроветворные клетки рыб могут быть использованы как надежная тест – система для обнаружения цито – и генетических соединений, а также в цитогенетическом мониторинге водной среды. Такое положение подтверждается исследованиями, проведенными в рамках цитогенетического мониторинга внутренних водоемов.

Цели и задачи исследования. Цель данной работы состояла в оценке влияния Балаковской АЭС (БАЭС) на кровь речного окуня (*Perca fluviatilis* L.), как типичного обитателя пресных водоемов России.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Выбрать контрольный водоем, в минимальной степени подверженный возможному влиянию со стороны Балаковской АЭС, для отлова окуней.

2. Подобрать метод окрашивания мазков, позволяющий наиболее точно дифференцировать цитопатологические нарушения, крови рыб.

3. Провести сравнение количества клеток с микроядрами и суммарное количество клеток крови с цитопатологическими нарушениями в крови окуней из водоема – охладителя Балаковской АЭС и контрольного водоема.

4. Проанализировать многолетнюю изменчивость показателей крови рыб на основании собственных данных и ранее проведенных исследований.

Краткая характеристика материалов исследования. Отлов речного окуня проводился в водоеме-охладителе Балаковской АЭС (10 особей). В качестве контроля отбирались рыбы из р. Малый Иргиз (11 особей). Анализу подвергались эритроциты периферической крови рыб, полученные прижизненно из хвостовой вены. Для каждой особи готовили не менее двух мазков, согласно методике «Изготовление, фиксация и окраска мазков (тотальные препараты)». Мазки окрашивали акридиновым оранжевым и просматривали под флуоресцентным микроскопом. На препарате просматривалось 2000 эритроцитов и подсчитывались цитопатологические нарушения.

Описание структуры работы. Бакалаврская работа изложена на 44 страницах. Содержит главы: Обзор литературы, материал и методы, результаты исследования и обобщение результатов многолетнего мониторинга. В работе имеется 13 рисунков, 2 таблицы и 6 гистограмм. Список литературы содержит 57 источников из них 1 на английском языке.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обосновывается актуальность исследования, отмечается практическая и теоретическая значимость работы, формулируются основные цель и задачи исследования.

Глава 1. ВЛИЯНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ СТАНЦИЙ НА ЭКОСИСТЕМЫ ВОДОЕМОВ-ОХЛАДИТЕЛЕЙ (обзор литературы)

Проведен анализ литературных данных по воздействию тепловых и атомных электростанций на водоемы – охладители. Обзор методов изучения форменных элементов крови рыб. Рассмотрены форменные элементы рыб и их мутации. Показана возможность использования экологического мониторинга водоемов с применением цитогенетических показателей крови рыб.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Водоем-охладитель БАЭС можно считать сравнительно крупным среди объектов данной категории: его максимальная длина – 7.6 км, ширина – 3.3 км, средняя площадь – 26.1 км², объем – 150 млн. м³. Водозабор на производственные нужды станции составляет 126 млн. м³/год. После планируемого в ближайшие годы пуска 5 – го и 6 – го блоков и повышения общей мощности станции до 6000 МВт забор воды должен увеличиться до 197.8 млн. м³/год. Водоем – охладитель отделен от Саратовского водохранилища дамбой, через которую происходит значительная фильтрация воды, поскольку уровень водоема выше, чем в Саратовском водохранилище на 2 м. Фильтрационные потери воды через нее составляют 14.28 млн. м³/год. Компенсация потерь воды на испарение и фильтрацию осуществляется из р. Березовка. Характер трансформации химического состава воды водоема-охладителя БАЭС обычен для водоемов этого типа – увеличение рН, жёсткости воды и содержания минеральных солей.

Отлов рыбы проводился 17 – 21 августа 2015 г. Рыба отлавливалась в водоеме-охладителе Балаковской АЭС. Выборка составила десять особей. В качестве контрольной выборки (11 особей) использовались особи, пойманные в устье реки Малый Иргиз. В процессе исследования анализу подвергались эритроциты периферической крови, полученные прижизненно из хвостовой вены.

Фиксация препарата производилась этиловым спиртом, а также простым высушиванием на воздухе с последующим хранением препарата при температуре 2–3 0С. Окрашивание препарата производилось акридиновым оранжевым в течение 20 минут. Подготовленные описанным образом мазки просматривались на микроскопе Микмед – 2 в ультрафиолетовом свете с увеличением $100\times 1.5\times 10$. На препарате подсчитывались клетки с микроядрами, а также отмечались клетки с цитогенетическими повреждениями, анализу подвергались не менее 1000 клеток. Микроядра идентифицировались как округлые образования, имеющие свечение зелёным или красным цветом, находящиеся непосредственно рядом с ядром в одной оптической плоскости. Проверка нормальности распределения проводилась графически и по критериям Колмогорова – Смирнова, Шапиро – Уилкса W и критерию Лиллиефорса. Рассчитывались асимметрия и эксцесс. Оценка достоверности различий между выборками проводилась по критерию Манна – Уитни.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате анализа периферической крови окуней, выловленных из р. Малый Иргиз (контроль) было отмечено, микроядра встречаются лишь в единичных клетках. Медиана выборки равна 1. У особей из водоема-охладителя БАЭС количество клеток с микроядрами колеблется в пределах 1 – 9, медиана составляет 2.25 на тысячу просмотренных эритроцитов.

Помимо клеток с микроядрами как в водоеме – охладителе, так и контроле были выявлены другие цитогенетические нарушения. Так, на

просмотренных препаратах были обнаружены деструктивные изменения ядра, вызванные, в частности, нарушением целостностью кариолеммы, в результате чего происходит выход содержимого ядра (хроматина) в цитоплазму, проявляющиеся в образовании так называемых «хвостов». Помимо того, были выявлены такие цитологические патологии как ядра с насечкой, протрузии, ядра неправильной формы. Медиана численности клеток с цитопатологическими изменениями ядра у рыб, отловленных в р. М. Иргиз и водоеме – охладителе составляет 4.5 и 9.75 соответственно.

При статистическом анализе результатов исследования использовали непараметрическую статистику, поскольку значения количества клеток с микроядрами были распределены ненормально. Кроме этого наблюдался эксцесс распределения (0.84) значений количества клеток с микроядрами в водоеме – охладителе БАЭС. Асимметрия (1.9) и эксцесс распределения (3.8) значений количества клеток с микроядрами в контроле. Эксцесс распределения значений суммарного количества клеток с цитопатологическими нарушениями в водоеме-охладителе БАЭС составил 0.5, в контроле – 0.6. Были отмечены достоверные отличия количества клеток с микроядрами в крови окуней из водоема – охладителя Балаковской АЭС и р. М. Иргиз ($U = 12, p = 0.0025$).

Суммарное количество клеток со всеми зарегистрированными цитогенетическими нарушениями у особей из водоема – охладителя составило 10–40 (медиана 12). У окуней из р. М. Иргиз этот параметр составил 4–14 (медиана 4.5). Были отмечены достоверные отличия суммарного количества клеток крови окуня с патологиями ядра между исследованными особями из водоема – охладителя БАЭС и устья р. М. Иргиз ($U = 7, p = 0.00073$).

Глава 4. ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ МНОГОЛЕТНЕГО БИОМОНИТОРИНГА

Сравнивая полученные данные с результатами предыдущих лет исследования можно отметить, что в 2013 году количество клеток с микроядрами было больше, чем в 2014 году. Данные текущего 2015 года в целом соответствуют данным прошлого года (таблица 2). Это можно объяснить влиянием сезонного и температурного факторов на гематологические показатели рыб. Отлов рыб в 2013 г. проводился в конце августа, а в 2014 и 2015 гг. немного раньше, в середине месяца. Существуют исследования, показывающие, что частота встречаемости эритроцитов рыб с микроядрами достоверно выше в летний период исследования, что возможно связано с перестройкой метаболизма у рыб, а также с увеличением выбросов загрязняющих веществ во время весеннего паводка. Полагаем, что это объясняет достоверно большее содержание микроядер в крови рыб отловленных в пруду – охладителе в этом году по сравнению с контрольной выборкой.

По данным исследований проведенных в 2013 г. статистически достоверных отличий количества клеток с микроядрами в крови окуней из водоема – охладителя Балаковской АЭС и р. М. Иргиз обнаружено не было. В 2014 и 2015 гг. выявлены достоверные отличия по данному показателю по сравнению с контролем. Это может быть вызвано более высокой температурой в водоеме – охладителе БАЭС. Кроме этого, почти все окуни отловленные в 2015 г. были заражены нематодой *Eustrongylides* sp. (NEMATODA: DIOSTORHYMIDAE). Заражение паразитарными инвазиями может повлиять на состояние крови рыб, что и могло вызвать повышение количества микроядер в крови и определить статистически достоверные отличия между выборками из р. Малый Иргиз и водоема-охладителя Балаковской АЭС. Для уточнения данного вопроса требуется проведение дальнейших исследований: сравнение выборок зараженной паразитами рыб и незараженной рыбы из водоема-охладителя Балаковской АЭС.

Негативного воздействия на кровь рыб со стороны БАЭС, выражающемся в увеличении частоты встречаемости клеток с микроядрами,

зафиксировано не было. Другие цитологические нарушения носят единичный характер, встречаются как в водоеме-охладителе, так и в контроле и не могут свидетельствовать о негативном воздействии на клетки крови рыб.

Таблица 2 – Количество (на 1000 просмотренных) клеток с цитопатологическими нарушениями в крови окуня по результатам исследований 2013 / 2014 / 2015 гг.

Показатель Место отлова	Медиана количества клеток с микроядрами	Медиана суммарного количества клеток с цитопатологическими нарушениями
водоем- охладитель	14.5 / 1* / 2.25*	16 / 10.5 / 12*
р. Малый Иргиз	14 / 0 / 0.5	16 / 8.5 / 4.5

* – отмечены статистически значимые ($p < 0.05$) отличия

ВЫВОДЫ

1. В качестве водоема, в котором отлавливались окуни для контроля выбрано устье р. Малый Иргиз, расположенного в 35 километрах выше по течению БАЭС. Устье р. Малый Иргиз лежит в левобережной части Саратовского водохранилища. Здесь рыбы обитают в сходных с водоемом-охладителем условиях, но в минимальной степени подвержены воздействию со стороны Балаковской АЭС.

2. Проведение люминисцентного анализа крови рыб с использованием акридинового оранжевого, которым выявляется ДНК в ядрах и микроядрах эритроцитов рыб, позволяет наиболее точно дифференцировать цитопатологические нарушения. Это исключает возможные ошибки, связанные с любыми другими частицами, близкими по размерам к микроядрам.

3. Были отмечены достоверные отличия количества клеток с микроядрами ($U = 12$, $p = 0.0025$) и суммарного количества клеток с цитогенетическими нарушениями ($U = 7$, $p = 0.00073$) в крови окуней из водоема – охладителя БАЭС и р. М. Иргиз. Медиана количества клеток с микроядрами у особей, отобранных из водоема – охладителя БАЭС, составляла 2.25 на тысячу просмотренных эритроцитов, из р. М. Иргиз

равнялась 0.5. Медиана суммарного количества клеток с цитогенетическими нарушениями у особей, отобранных из водоема – охладителя БАЭС, составляла 12 на тысячу просмотренных эритроцитов. Медиана выборки окуней из р. М. Иргиз равнялась 4.5.

4. У окуней в 2014 и 2015 гг. количество микроядер уменьшилось, по сравнению с исследованиями 2013 года. Отбор рыб для анализа осуществлялся в 2013 г. в июле, а в 2014 и 2015 г. в августе. Существуют исследования, показывающие, что частота встречаемости эритроцитов рыб с микроядрами достоверно выше в летний период, что связано с перестройкой метаболизма у рыб. В 2014 и 2015 гг. выявлены достоверные отличия количества клеток с микроядрами в крови окуней из водоема – охладителя Балаковской АЭС и р. М. Иргиз по сравнению с контролем. Это может быть вызвано более высокой температурой в водоеме – охладителе БАЭС. Кроме этого, почти все окуни отловленные в 2015 г. были заражены нематодой *Eustrongylides* sp. (NEMATODA: DIOCTOPHYMIDAE), что и могло вызвать повышение количества микроядер в крови.