

2. Павловец Г.Я., Романов П.С., Романова И.П. Методика определения размера реакционно-активных наноконпонентов энергоемких композитов методом диффузионной аэрозольной спектроскопии// Всероссийская молодежная конференция, посвященная 80-летию Московского государственного открытого университета им. В.С. Черномырдина «Наноматериалы и нанотехнологии: проблемы и перспективы». 2 – 3 октября 2012 г. с.94.
3. ТУ 48-5-226-87. Порошок алюминиевый сферический дисперсный, марки АСД-1, АСД-4. Технические условия. Государственный стандарт СССР. –М.: Изд-во стандартов, 1987. 37 с. (Государственная система обеспечения единства измерений).
4. Ермакова Е.В., Корчагина Е.Н., Беляков В.И. Сравнительный анализ технических и метрологических характеристик бомбовых калориметров, применяемых в России//Измерительная техника. 2011. №2. с. 51 – 57.
5. Физическая химия. В 2 кн. Кн. 1. Строение вещества. Термодинамика: Учеб. для ВУЗов // Краснов К.С., Воробьев Н.К., Годнев И.Н. и др.; под ред. К.С. Краснова. 3-е изд., испр. –М: Высш. шк., 2001. 512 с.
6. Скуратов С.М., Колесов В.П., Воробьев А.Ф. Термохимия. Ч. I и II. –М.: МГУ, 1964. 966 с.
7. Павловец Г.Я. Научно-технические основы получения и применения ультрадисперсных металлических порошков в высокоэнергетических композициях //Научно-методические материалы. –М.: Секция прикладных проблем при Президиуме РАН, 1998. Выпуск 6. с. 1 – 70.

### **Влияние солености на биоконцентрацию и генотоксичность тяжелых металлов для морских звезд *Asterias rubens* L.**

Поромов А.А.<sup>1</sup>, Перетыкин А.А.<sup>2</sup>, д.б.н. проф. Смуров А.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Университет машиностроения,

<sup>2</sup>МГУ им. М.В.Ломоносова

8 (910) 480-38-80, aap1309@gmail.com

*Аннотация.* В работе проведен сравнительный анализ уровней биоконцентрации металлов в теле и образования микроядер в клетках целомической жидкости морских звезд *Asterias rubens* L. при воздействии смеси железа, свинца, меди и кадмия в условиях нормальной (25,7‰) и низкой солености (21‰), так как соленость может значительно влиять на проявление токсических свойств веществ. Низкая соленость увеличивает генотоксичность металлов и нарушает иммунный ответ. Значимых различий в уровне биоконцентрации в условиях разной солености не наблюдалось.

*Ключевые слова:* *Asterias rubens*, тяжелые металлы, соленость, амебоциты, биоконцентрация

#### **Введение**

Загрязнение тяжелыми металлами является одной из самых распространенных форм загрязнения морской среды [10]. Морская вода, обладая особыми физико-химическими свойствами, влияет на проявление токсических эффектов многих веществ, в том числе и тяжелых металлов. Множество факторов определяют биологическую активность содержащихся в морской воде веществ и условия существования морских организмов: соленость (S), pH, растворенный кислород, температура, содержание питательных веществ и твердых частиц [14]. При этом, pH и соленость являются основными переменными, которые определяют биодоступность и токсичность веществ, в том числе и тяжелых металлов, связанных с донными осадками и растворенными в морской воде. Изменения солености может влиять как на биологические эффекты токсикантов, так и на ответные реакции организмов [12]. Например, Cd становится более токсичным при снижении солености, в связи с переходом в форму свобод-

ных ионов [13]. Токсические эффекты Pb и Zn проявляются только при высоких концентрациях и меньше зависят от солености, так как присутствуют в воде в виде гидроксидов [16].

В природных условиях на организмы одновременно действуют несколько факторов, эффекты которых не являются простой суммой отдельных эффектов. Вместе с тем, химические вещества, входящие в состав смеси, при комбинированном воздействии, могут изменять свою биологическую активность и оказывать более выраженный токсический эффект [17]. Наибольший риск усиления токсического эффекта можно ожидать при комбинированном воздействии структурно-родственных химических соединений или веществ с близким механизмом действия. Поэтому в данной работе выбрана смесь наиболее значимых загрязнителей морской среды из числа тяжелых металлов.

В ходе исследований изучена биоконцентрация (поступление веществ из воды) металлов и генотоксичность при действии смеси железа, свинца, меди и кадмия на представителей типа иглокожие (*Echinodermata*) морских звезд *Asterias rubens* Linnaeus, 1758. Использование иглокожих связано с их высокой экологической значимостью в морских экосистемах и эволюционной близостью к хордовым за счет единой эволюционной ветви вторичноротых животных [3]. Строение тела морских звезд обеспечивает ток воды, которая напрямую воздействует на клетки, находящиеся в целомической полости [18].

Цель данной работы – оценить влияние солености на генотоксичность и биодоступность смеси металлов ( $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) для морских звезд *Asterias rubens*. Задачами работы являются оценка уровней биоконцентрации металлов и образования микроядер в клетках целомической жидкости при нормальной для данного региона солености (25,7‰) и наиболее низкой (21‰), в эстуариях, где встречаются морские звезды. Микроядра (Мя) образуются из участков хромосом при нарушениях митоза при делении клеток [11].

#### Материалы и методы

Неповрежденные пятилучевые морские звезды *Asterias rubens* диаметром 66 – 100 мм для проведения экспериментов собирали в районе Беломорской биологической станции имени Н.А. Перцова, Мурманская область, Россия (66.55359° N, 033.10403° E). В восемь десятилитровых аквариумов помещали по 5 экземпляров морских звезд, в одной половине аквариумов поддерживалась соленость 21‰ (низкая соленость), в другой – 25,7‰ (нормальная соленость), температура воды составляла  $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ , с естественным освещением и суточным циклом. В аквариумы была добавлена смесь металлов в концентрациях согласно таблице 1. Длительность эксперимента составила 10 дней, воду меняли на половину объема раз в три дня.

Таблица 1

#### Концентрации тяжелых металлов добавленных в воду

ИИТ	Fe, мг/л	Pb, мг/л	Cu, мг/л	Cd, мг/л
0	0	0	0	0
100	2.5	0.25	0.025	0.0125
400	10	1	0.1	0.05
800	20	2	0.2	0.1

Для характеристики смеси металлов рассчитывали интегральный индекс токсичности (ИИТ) по следующей формуле [9]:

$$\text{ИИТ} = \frac{[\text{Fe}]}{0,1} + \frac{[\text{Pb}]}{0,01} + \frac{[\text{Cu}]}{0,001} + \frac{[\text{Cd}]}{0,0005},$$

где [Fe, Pb, Cu, Cd] – концентрации металлов, мг/л, добавляемых в воду в ходе эксперимента; в знаменателях – ПДК для рыбохозяйственных водоемов соответствующих металлов, согласно СанПиНу 2.1.5.980-00 «Гигиенические требования к охране поверхностных вод».

Целомическую жидкость из морских звезд отбирали трижды (3, 7, 10 сутки эксперимента) шприцом на 1 мл с 21 мм иглой. Средний объем извлекаемой жидкости составлял

0,6 мл. Для подготовки препаратов клеток целомической жидкости 200  $\mu$  жидкости распределяли на предметном стекле. Предметные стекла просушивали на воздухе и фиксировали в метаноле в течение 15 мин с последующим окрашиванием раствором Романовского-Гимзы в течение 20 мин. Избыток красителя удаляли путем промывки дважды в дистиллированной воде и далее сушили на воздухе. Препараты просматривали под микроскопом с увеличением 90х, подсчитывали 1000 целомоцитов, определяли число клеток, содержащих микроядра. Микроядра (Мя) отличали от клеточных включений и гранул красителя по следующим признакам: Мя обычно имеют одинаковую интенсивность окрашивания с макроядром, но могут быть более интенсивно окрашены; Мя не связаны и не пересекаются с макроядрами; Мя не могут перекрываться; Мя не обладают рефракцией в отличие от многих артефактов, например, частиц красителя [7].

На 10-е сутки эксперимента по пять морских звезд из каждого аквариума высушивали при температуре 40 °С, измельчали и перемешивали, без разделения на отдельные органы. Навески 0,25 г образца растворяли в 10 мл смеси концентрированной соляной и азотной кислот (в соотношении 3:1), далее добавляли 3 мл хлорной кислоты и 3 мл фтористоводородной кислоты. Далее пробы разлагали в микроволновой печи, после чего отстаивали в течение суток и фильтровали. Концентрации металлов в морских звездах были проанализированы методом атомно-абсорбционной спектрометрии на Agilent ICP-MS 7500.

Отношения между биологическими характеристиками морских звезд и концентрациями металлов оценивали с помощью линейной регрессии и корреляционного анализа. Для установления влияния солености на биоконцентрацию металлов использовали ковариационный анализ (ANCOVA). Различия между долей микроядер в клетках контрольных и экспериментальных морских звезд оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни [8]. Значимые различия доли микроядер при действии различных концентраций металлов и уровней солености определяли с помощью однофакторного и двухфакторного дисперсионного анализа [15]. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics 20 и KyPlot 2.0. Величина уровня значимости была установлена  $P < 0,05$ .

### Результаты

1. Биоконцентрация тяжелых металлов в морских звездах. Результаты регрессионного и ковариационного анализа содержания металлов в теле морских звезд и разных концентраций металлов, добавленных в ходе эксперимента в воду аквариумов представлены в таблице 2.

Таблица 2

#### Результаты регрессионного и ковариационного анализа содержания ТМ

Тип анализа	Соленость, % Критерий	Железо		Медь		Свинец		Кадмий	
		25.7	21	25.7	21	25.7	21	25.7	21
Регрессионный анализ	$R^2$	0.38	0.743	0.893	0.1	0.3	0.76	0.94	0.873
	F	1.291	2.471	16.3	0.23	0.85	0.64	31.3	13.7
	P	0.39	0.275	0.05*	0.68	0.45	0.12	0.03*	0.06*
	B	1.98± 1.79	-1.82± 1.16	103.7 ± 25.3	22.9± 47.8	5.90± 6.38	12.2 ± 4.8	20.13 ± 3.60	6.65± 1.79
Ковариационный анализ	Соленость	1.18 (P=0.36)		0.12 (P=0.75)		0.28 (P=0.87)		0.06 (P=0.83)	
	Метал добавленный в воду в ходе эксперимента	0.59 (P=0.66)		2.01 (P=0.29)		0.26 (P=0.22)		3.83 (P=0.15)	

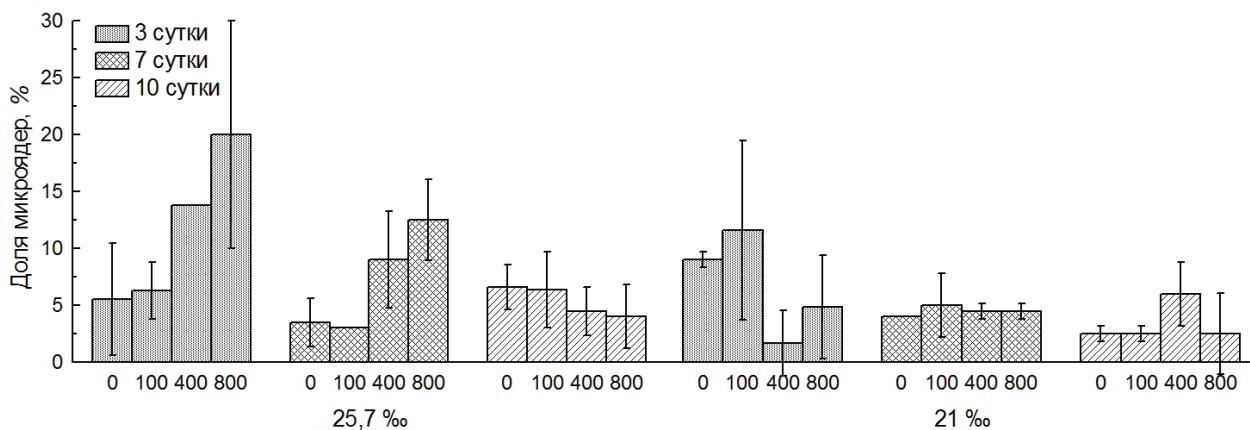
$R^2$  – коэффициент детерминации; F – критерий Фишера; P – уровень значимости; B – коэффициент наклона; \* – статистически достоверная линейная зависимость.

Концентрация железа не увеличивалась, при увеличении содержаний этого металла в морской воде, что подтверждается результатами регрессионного анализа. Однако наблюдались различия в концентрациях железа в морских звездах при разной солености, содержащихся в аквариумах без добавления металлов (контроль) и при добавлении железа 2,5 мг/л. Естественные содержания железа в морских звездах в районе сбора материала ( $166,1 \pm 57,8$  мг/кг) значительно выше концентраций железа, добавленного в воду аквариумов ходе эксперимента. Для пониженной солености наблюдаются отрицательные значения наклона прямой, что может свидетельствовать о выводе железа из тела морских звезд при понижении солёности.

Для остальных металлов отмечается увеличение их содержания в морских звездах при увеличении их концентрации в воде, что показывает положительные значения коэффициента наклона (В). При этом высокий уровень биоконцентрации можно отметить для Pb и Cu. Содержание Pb в морских звездах после эксперимента в три раза превышало концентрации, добавленные в морскую воду в ходе эксперимента, а для Cu в 15 – 20 раз. Содержание Cd в морских звездах дозозависимо увеличилось при увеличении его концентрации в морской воде, однако не превысило его концентрацию в воде. Для кадмия и меди при солености 25,7‰, наблюдается статистически достоверная линейная зависимость между содержаниями металлов в теле морских звезд и концентрациями металлов, добавленных в воду в ходе эксперимента.

Значения коэффициента наклона прямой для всех металлов, кроме свинца, показывают различия в уравнениях линейной регрессии для низкой и нормальной солености. Ковариационный анализ не показывает статистически достоверного влияния солености на биоконцентрацию металлов, что говорит о более сложных механизмах биоконцентрации металлов и процессах регуляции их содержания в теле морских звезд.

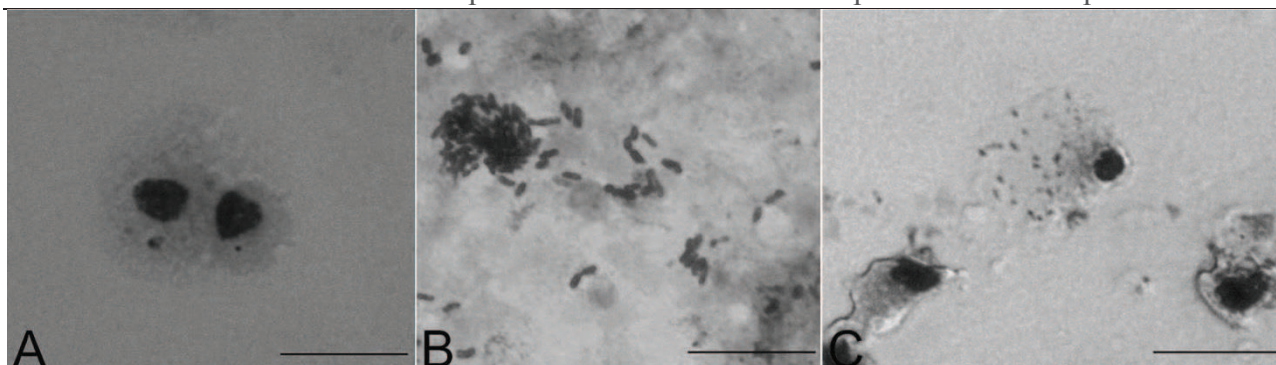
2. Образование микроядер. Результаты оценки доли микроядер в клетках целомической жидкости морских звезд представлены на рисунке 1.



**Рисунок 1. Доля клеток с микроядрами среди эозинофильных гранулоцитов. По оси абсцисс – значения ИИТ для нормальной и низкой солености на 3-и, 7-е и 10-е сутки эксперимента**

При солености 25,7‰ на 3 и 7 сутки эксперимента наблюдается дозозависимое увеличение доли клеток с микроядрами, что вызвано токсическим действием металлов,  $R^2 = 0,98$ ,  $P < 0,05$  и  $R^2 = 0,92$ ,  $P < 0,05$ . На 10 сутки различий между долями микроядер в клетках в контрольном и экспериментальных аквариумах не наблюдается.

При солености 21‰ дозозависимого эффекта увеличения генотоксичности не наблюдается в течение всего эксперимента. На препаратах со значениями ИИТ 400 и 800 на 3-и и 7-е сутки эксперимента наблюдается бактериальное заражение грамм-положительными палочковидными бактериями, после 10-ти суток наблюдаются фагоцитированные синие гранулы внутри клеток при микроскопировании образцов (см. рисунок 2).



**Рисунок 2. Эозинофильные гранулоциты морских звезд, окраска по Романовскому-Гимзе: А – микроядра в клетках, В – бактерии в целомической жидкости; С – клетка с гранулами в цитоплазме (10μ)**

Ковариационный анализ не показывает статистически достоверного влияния солёности на долю микроядер в клетках целомической жидкости, что, вероятно, связано с недостаточным количеством повторов и, как результат, низкой мощностью анализа.

#### **Обсуждение и заключение**

Морская звезда *Asterias rubens* – массовый и широко распространенный бореальный вид, обитающий в условиях различной солёности и антропогенной нагрузки, который может служить биоиндикатором качества морской среды среди организмов подвижной эпифауны, которые обуславливают 50% продукции и играют ключевую роль в круговороте тяжелых металлов в этих биотопах [14]. Как показано в наших предварительных экспериментах, 100% гибель морских звезд на третьи сутки эксперимента наблюдалась при значении ИИТ равном 3200.

Линейный характер корреляции между содержаниями Cd и Cu в морской воде и теле морских звезд *Asterias rubens* позволяют использовать их как индикаторы загрязнения этими металлами. Аналогичные результаты получены в работе [4] на морских звездах из загрязненных областей Норвегии, однако отмечается выход на плато при накоплении Cd и описаны механизмы выведения этого металла из тела морских звезд [13].

Концентрации железа, добавляемые в воду в ходе экспериментов, были значительно ниже его содержаний в теле морских звезд. Это связано с высокими его содержаниями в месте сбора материала из-за хозяйственной деятельности биостанции. Можно говорить о высоких коэффициентах аккумуляции железа из донных осадков.

Значимых различий между уровнями аккумуляции металлов при различной солёности не выявлено, однако уравнения регрессии отличаются, что говорит о более сложном механизме действия солёности на процессы биоконцентрации. В работах с морскими звездами из естественных местообитаний показаны различия биоаккумуляции металлов при различной солёности, что связано с различиями в самих местообитаний и пищевым рационом, так как основным путём поступления металлов в организм иглокожих является пищевой [2, 4].

На клеточном уровне наблюдалась адаптация к воздействию тяжелых металлов, при этом низкая солёность увеличивала токсический эффект металлов. На десятые сутки эксперимента наблюдалась адаптация к воздействию тяжелых металлов. В работе [6] не выявлено влияние различной солёности (22, 25 и 30‰) на образование микроядер, а токсические эффекты на уровне клеток целомической жидкости связаны с воздействием только металлов.

В нашем эксперименте отмечается кратковременное увеличение токсичности металлов, выраженное в увеличении доли микроядер в эозинофильных гранулоцитах и бактериальном заражении, что связано с совместным действием тяжелых металлов и низкой солёности. На 10 сутки эксперимента клеточный иммунный ответ в условиях низкой солёности восстанавливается, в результате чего внутри клеток обнаруживаются фагоцитированные бактериаль-

ные гранулы, а отдельные бактерии уже не обнаруживаются, также уменьшается генотоксичность, что вероятнее всего связано с накоплением белков, способных связывать свободные ионы металлов [12].

При воздействии тяжелых металлов и резкого снижения солености наблюдаются прямые цитогенетические эффекты (образование микроядер и бактериальное заражение). Далее, при более длительной экспозиции, можно предположить адаптацию, направленную на уменьшение токсических эффектов металлов за счет клеточных протекторных механизмов, что проявляется в отсутствии различий исследуемых характеристик с контрольными на 10 сутки эксперимента. В целоמוцитах обнаружены белки, способные связывать металлы в хелатные комплексы и, далее, эти клетки выводятся через пищеварительную систему и органы выделения, способствуя детоксикации металлов и являясь эффективным инструментом их выведения из органов морских звезд [1, 16].

Высокая экологическая пластичность морских звезд *Asterias rubens*, которая обеспечивает широкое распространение и устойчивость к антропогенному воздействию обуславливает возможность их использования в качестве модельных организмов на большой территории и в условиях высоких уровней нагрузки. Полученные в ходе работы результаты (показано отсутствие различий в уровнях биоконцентрации металлов при разных уровнях солености, характерных для местообитаний морских звезд в Белом море и кратковременное усиление токсических эффектов металлов при понижении солености) позволят достоверно сравнивать биологические характеристики морских звезд, обитающих при разных уровнях солености в ходе экодиагностических исследований.

#### Литература

1. Baier-Anderson C., Anderson R.S. Immunotoxicity of environmental pollutants in marine invertebrates // *Recent Advances in Marine Biotechnology 2000.5*. P. 189 – 225.
2. Bjerregaard P. Effect of selenium on cadmium uptake in selected benthic invertebrates // *Marine Ecology Progress Series*. 1988. Vol. 48. P.17 – 28.
3. Canty M.N., Hutchinson T.H., Brown R.J., Jones M.B., Jha A.N. Linking genotoxic responses with cytotoxic and behavioural or physiological consequences: Differential sensitivity of echinoderms (*Asterias rubens*) and marine molluscs (*Mytilus edulis*) // *Aquatic Toxicology*. 2009. Vol. 94. Issue 1. 13. P. 68 – 76.
4. Coteur G. et al. Field contamination of the starfish *Asterias rubens* by metals . part 1: short- and long-term accumulation along a pollution gradient // *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2003. Vol. 22(9). P. 2136 – 2144.
5. Coteur G., Corriere N., Dubois P. Environmental factors influencing the immune responses of the common European starfish (*Asterias rubens*)//*Fish & Shellfish Immunology*. 2004. Vol. 16(1). P. 51 – 63.
6. Coteur G. et al. Field contamination of the starfish *Asterias rubens* by metals. part 2: Effects on cellular immunity//*Environmental Toxicology and Chemistry* 2003. Vol. 22(9). P. 2145 –2151.
7. Fenech M. The in vitro micronucleus technique//*Mutation Research*. 2000. Vol. 455(1-2). P.81 – 95.
8. Hoaglin D.C., Welsch, R.E. The Hat Matrix in Regression and ANOVA // *The American Statistician*. 1978. Vol. 32(1), P. 17 – 22.
9. Ovchinnikov I.P. Fast biological testing methods for online solution of problems arising during gas field development // *Chemical and Petroleum Engineering*. 1997. Vol. 33(1). P. 79 – 80.
10. Pruski A.M., Dixon D.R. Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. // *Aquatic Toxicology*. 2002. Vol. 57. P. 127 – 137.
11. Schmid W. The micronucleus test // *Mutation Research*. 1975. Vol. 31. P. 9 – 15.
12. Soto M., Cajaraville M.P., Marigómez I. Tissue and cell distribution of copper, zinc and cadmium in the mussel, *Mytilus galloprovincialis*, determined by autometallography // *Tissue & Cell*. 1996. Vol. 28(5).P. 557 – 568.

13. Temara A., Ledent G., Warnau M., Paucot H., Jangoux M. Experimental cadmium contamination of *Asterias rubens* (Echinodermata) // Marine Ecology Progress Series. 1996. Vol. 140, P. 83 – 90.
14. Temara A. et al. Factors influencing the concentrations of heavy metals in the asteroid *Asterias rubens* L. ( Echinodermata ) // Marine Ecology Progress Series. 1997. Vol. 203. P. 51– 63.
15. Zar J.H. Biostatistical Analysis, 3rd ed. Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, USA. 1996.
16. Zorita I. et al., Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using mussels as sentinel organisms // Environmental pollution. 2007. Vol. 148 (1). P. 236 – 50.
17. Бакиров А.Б. Научные разработки ФГУН УфНИИ медицины труда и экологии человека в нефтяной промышленности // Нефть и здоровье: сборник научных трудов Всероссийской конференции Уфа, 2009. - С. 18 – 25.
18. Козлова А.Б., Петухова О.А., Пинаев Г.П. Анализ клеточных элементов целомической жидкости на ранних сроках регенерации морской звезды *Asterias rubens* L // Цитология. 2006. 48(3). С.175 – 183.

### **Влияние скорости на эффективность сепарации капель при частичной конденсации пара на трубном пучке**

К.т.н. доц. Жихарев А.С., Мантрова Ю.С.  
Университет машиностроения  
a\_giharev@msuie.ru

*Аннотация.* Рассмотрен процесс улавливания взвешенных в паровой фазе капель и влияние на различных факторов на его эффективность.

*Ключевые слова:* конденсация пара; трубные сепараторы, конденсационная сепарация пара

Одним из способов повышения эффективности улавливания взвешенных в паре капель является использование эффекта конденсации пара. Наиболее перспективным представляется осуществление процесса конденсации с целью осаждения капель на поверхности трубного пучка.

Конденсационная сепарация пара является сложным процессом, зависящим от ряда физических и конструктивных факторов. В случае продольного обтекания паром вертикального трубного пучка капли, находящиеся в нем, перемещаются к поверхности конденсации под воздействием конденсирующейся части пара, а также под воздействием термодиффузиофореза и стефановского течения. Капли, которые достигли поверхности конденсации, осаждаются на ней. Оставшаяся часть капель выносятся из аппарата. Вблизи поверхности раздела фаз может происходить конденсационное укрупнение капель, что способствует их осаждению. При поперечном движении пара относительно пучка труб существенный вклад в развитие процесса осаждения капель могут дать также силы инерции, возникающие вследствие отклонения линий тока у поверхности трубок. В случае, когда движение пара осуществляется вдоль вертикальной поверхности трубки, на которой пар частично конденсируется, силы тяжести и инерции, по всей вероятности, не будут определять процесс осаждения капель на поверхность конденсации, в связи с чем их можно не учитывать для рассмотренных условий.

При поперечном движении пара относительно трубного пучка на взвешенную каплю будут действовать те же силы, что и в случае продольного движения пара: сила динамического воздействия пара, сила сопротивления, сила тяжести, сила инерции, сила термофореза, сила диффузиофореза и стефановская сила [1]. Однако действие этих сил будет носить несколько иной характер. Взвешенная капля двигается к поверхности конденсации, увлекаемая потоком пара. На некотором расстоянии от поверхности линии тока огибают трубку и тогда капля под действием силы инерции и потока пара, направленного к поверхности трубки