ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ АПИМОНИТОРИНГ. ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ОБРАЗЦОВ МЕДА ИНДУЦИРОВАТЬ ГЕННЫЕ МУТАЦИИ НА ИНДИКАТОРНЫХ БАКТЕРИЯХ В ТЕСТЕ ЭЙМСА SALMONELLA

В.Т. КАКПАКОВ, С.К. АБИЛЕВ, А.Г. БУТОВ*, РОССИЯ

Институт Общей Генетики им. Н.И. Вавилова Академии Наук России
Тел.: 7-095-135-43-26;Факс 7-095-132-89-62; E-mail: kakpakov@vigg.ru
**Союз Пчеловодов России, 119991 Москва, ул. Губкина 3*

Аннотация

В проведенных нами экспериментах были использованы индикаторные штаммы Salmonella typhimurium TA 98 и TA 100, предложенные Эймсом и сотрудниками (AMES et al., 1971). Опыты проводили без применения системы метаболической активации. Наличие мутагенного эффекта у исследованных 10 образцов учитывали по индукции обратных мутаций у тест штаммов от ауксотрофности по гистидину к прототрофности. Результаты учитывали при наличии мутагенного эффекта во всех вариантах позитивного контроля.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в 30% образцов исследо-ванных медов содержатся мутагенные соединения, индуцирующие мутации типа замены пар оснований.

Ключевые слова: экологический апимониторинг/тест Эймса/мутагенность меда/индукция обратных мутаций.

Введение

Известно, что большинство химических соединений, обладающих опухолеиндуцирующей активностью у млекопитающих, являются мутагенами, то есть они способны вызывать изменения в ДНК живых клеток. Поэтому одним из показателей биологической активности канцерогенов является их мутагенная активность (БЕЛИЦКИЙ, ТУРУСОВ, 2000). В настоящее позитивные результаты тестирования на мутагенную активность химических загрязнений окружающей среды рассматриваются как показатель потенциальной канцерогенной активности и, соответственно, тесты на мутагенность включены в перечень методов определения возможной канцерогенности. Исследования Эймса и его сотрудников по выявлению взаимосвязи между канцерогенностью и мутагенностью показали, что 90% канцерогенных веществ были мутагенными. ТАМУРА с сотрудниками (1985) впервые показали, что маточное молочко обладает свойством повреждать ДНК в дозах крайне высоких по сравнению с другими лекарственными препаратами и было определено, что ежедневные дозы маточного молочка размером от 50 до 200 мг не могут считаться канцерогенными. Однако, было замечено, что продолжительное потребление маточного молочка в чрезмерных количествах нежелательно.

Материал и методика

В проведенных нами экспериментах были использованы индикаторные штаммы *Salmonella typhimurium* TA 98 и TA 100, предложенные Эймсом и сотрудниками (AMES et al., 1971).

Эксперименты проводили без применения системы метаболической активации. Наличие мутагенного эффекта у исследуемых образцов меда учитывали по индукции обратных мутаций у тест-штаммов от ауксотрофности по гистидину к прототрофности.

Исследуемые образцы меда растворяли в стерильной деионизи-рованной воде, готовили стандартные концентрации 1000 и 10.000 мкг/мл и стерилизовали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (фирмы «Миллипор», США).

Селективный полуобогащенный агар (0,7%) в пробирках плавили в водяной бане при температуре 100^0 С и помещали в термостатируемую водяную баню с температурой $45\text{-}46^0$ С.

В начале в пробирки с агаром вносили 0,1 мл раствора тестируемого образца меда, затем 0,1 мл суспензии бактерий. Все добавки делались вне водяной бани, затем содержимое пробирки быстро перемешивали и выливали на слой нижнего минимального агара на чашки Петри диаметром 90 мм. Чашки оставляли при комнатной температуре 3-40 мин и после полного застывания агара переносили в термостат на 37^0 С. Учет результатов проводили через 48-72 часа инкубации.

Эксперимент сопровождали положительными контролями. В качестве позитивных контролей использовали вещества, индуцирующие мутации у соответствующих щтаммов-тестеров – 2–нитрофлоурен (2-НФ) для штамма TA 98, азид натрия – для штамма TA 100. В каждом контрольном и опытном вариантах использовали по 3 чашки. Эксперимент повторяли дважды. Результаты учитывали при наличии мутагенного эффекта во всех вариантах позитивного контроля.

Результаты

Результаты экспериментов представлены в таблицах I и II в виде среднего числа ревертантов на 3-х чашках Петри.

Как следует из таблиц I и II, образцы меда не проявили мутагенной активности в штамме ТА98, регистрирующем мутагенов, индуцирующих мутации типа сдвига рамки считывания. Однако образцы меда гречихи-разнотравного (N^{o}5), эвкалиптового (N^{o}7) и гречишного (N^{o}8) проявили мутагенную активность на штамме ТА100. Последний штамм ревертирует от ауксотрофности к прототрофности в результате замены пар оснований.

Таким образом из 10 исследованных случайно взятых образцах в 3 содержатся мутагенные соединения, индуцирующие мутации типа замены пар оснований.

Таблица I

Действие образцов меда на индикаторные штаммы бактерий в тесте Эймса *Salmonella* (опыт 1)

Штамм Препарат, вариант N^{o} образца		Доза препарата, мкг/чашку	Среднее число ревертантов на чашку	Кратность превышения над контролем
1	2	3	4	5
ТА 98	Вода	0	27±2,3	1,00
	1	100	31±3,1	1,15
		1000	29±2,3	1,03
	2	100	23±2,0	0,85
		1000	28±2,4	1,03
	3	100	33±3,1	1,22
		1000	32±3,0	1,18
	4	100	25±3,0	0,92
		1000	24±2,9	0,88
	5	100	29±2,7	1,07
		1000	35±3,1	1,30
	6	100	30±3,2	1,11
		1000	26±2,9	0,91
	7	100	29±2,7	1,07
		1000	21±2,4	0,77
	8	100	24±2,3	0,88
		1000	33±3,1	1,00
	9	100	26±3,2	1,06
		1000	33±3,0	1,00
	10	100	31±2,4	0,93
		1000	29±2,3	0,87
	2-НФ	5,0	2300±4,6	0,81
	ДМСО*	0	25±2,1	92,00
ТА 100	Вода	0	41±4,1	1,00
НМАС	1	100	149±3,9	1,06
		1000	151±5,1	1,07
	2	100	139±4,1	0,98
		1000	123±5,1	0,87
	3	100	119±4,3	0,84
		1000	153±4,2	1,08
	4	100	145±4,9	1,06
		1000	162±4,8	1,00
	5	100	60±9,9	2,50
		1000	785±33,1	5,57
	6	100	155±5,9	0,96
		1000	143±6,0	0,88
	7	100	435±20,1	3,08
		1000	970±43,5	6,88
	8	100	253±10,4	1,79
		1000	680±19,3	4,82
	9	100	145±5,1	1,02
		1000	137±3,9	0,97
	10	100	141±5,3	1,00
		1000	133±5,1	0,94
	Азид	5,0	1700±55,3	12,06

* ДМСО – растворитель 2-НФ диметилсульфоксид

Таблица II

Действие образцов меда на индикаторные штаммы бактерий в тесте Эймса *Salmonella* (опыт 2)

Штамм Препарат, вариант N° образца		Доза препарата, мкг/чашку	Среднее число ревертантов на чашку	Кратность превышения над контролем
1	2	3	4	5
ТА 98	вода	0	23±2,1	1,00
	1	100	25±2,2	1,08
		1000	19±2,1	0,82
	2	100	23±1,9	1,00
		1000	28±1,9	0,88
	3	100	23±2,1	1,00
		1000	22±2,1	0,95
	4	100	25±1,9	1,08
		1000	24±2,1	1,07
	5	100	29±2,5	1,26
		1000	30±3,0	1,30
	6	100	30±2,9	1,30
		1000	26±2,5	1,10
	7	100	29±2,3	1,26
		1000	21±2,2	0,91
	8	100	24±2,3	1,04
		1000	27±2,1	1,17
	9	100	26±2,1	1,16
		1000	20±2,4	0,86
	10	100	21±1,8	0,91
		1000	29±1,9	1,26
	2-НФ	5,0	1880±9,3	75,20
	ДМСО*	0	25±2,1	1,00
ТА 100	вода	0	131±2,2	1,00
НМАС	1	100	149±2,4	1,13
		1000	150±2,5	1,14
	2	100	139±2,1	1,06
		1000	128±2,1	0,97
	3	100	119±3,1	0,91
		1000	140±3,5	1,07
	4	100	145±3,5	1,11
		1000	125±3,6	0,95
	5	100	410±9,1	3,13
		1000	940±30,2	7,17
	6	100	135±3,1	0,96
		1000	143±4,1	0,88
	7	100	330±6,7	2,52
		1000	845±21,5	6,45
	8	100	293±11,3	2,23
		1000	768±26,4	5,86
	9	100	135±5,1	1,03
		1000	137±4,3	1,04
	10	100	141±4,4	1,07
		1000	133±4,3	1,01
	Азид	5,0	1950±23,7	14,88

* ДМСО – растворитель 2-НФ диметилсульфоксид

Дискуссии

Мониторинг генетических последствий заграznения окружающей среды является актуальной проблемой современной генетики. Несмотря на то, что в своей деятельности на всем пути исторического развития человечество сталкивалось с действием мутагенов среды, количество и разнообразие последних стало стремительно расти в XX веке, а в середине ушедшего столетия проблема антропогенных загрязнителей окружающей среды, обладающим мутагенными свойствами, была создана как одна из глобальных проблем человечества (ДУБИНИН, 2001).

Использование пчел и продуктов пчеловодства для слежения за состоянием окружающей нас среды, то есть экологический апимониторинг может быть хорошим инструментом выявления территорий с экологически чистыми продуктами питания и целенаправленной государственной охраны таких зон.

Выводы

В 10 случайно выбранных образцах пчелиного меда: горный каштан, горный цитрус, малина, липовый, гречишно-разнотравный, пустырник, эвкалиптовый, гречишный, подсолнечниковый, цветочный 3 образца : гречишно-разнотравный, эвкалиптовый и гречишный содержали мутагенные соединения, индуцирующие мутации типа замены пар оснований в тесте Эймса *Salmonella*.

ЛИТЕРАТУРА

Ames B.N., The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. In: Chemical mutagens, principles and methods for their detection (Hollander A., ed.). *N.Y. Plenum Press*, 1971, 267-282

Ames B.N., Durston W.E., Yamasaki E., Lee F.D, Carcinogens are mutagens: a simple test system in combining liver gomogenates for activation and bacteria for detecting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70* (1973), 2281-2285

Белицкий Г.А., Турусов В.С., Выявление и мониторинг химических канцерогенов. В сб: Канцерогенез (ред. Саридзе Д.Г.). *М. Научный мир*, 2000, 418 с.

Дубинин Н.П. Экологическая и космическая генетика. Селекция. *Избранные труды*. Том 3 (2001), 3

Тамура Т., Кубояма Н., Фуджи А., Исследование мутагенности маточного молочка. *XXX Международный конгресс по пчеловодству Апимондии. Нагойя* (1985), 420-423