

Винахід відноситься до гігієни або зокрема до біомоніторингу забруднення навколишнього середовища.

Для виявлення інтенсивності мутагенного фону довкілля, спричиненого антропогенним забрудненням, використовуються різні рослинні тест-системи, які базуються на таких сучасних методах: 1) оцінка молекулярно-генетичних порушень за частотою явищ гомологічної рекомбінації у трансгенних лініях рослин *Arabidopsis thaliana* і *Nicotiana tabacum*; 2) метод визначення цито- і генотоксичності води і ґрунтів на основі ана-телофазного аналізу первинної меристеми корінців рослин (цибулі, кукурудзи, часнику), пророщених на різних пробах досліджуваних об'єктів [1-4].

Найбільш близьким прототипом винаходу є "Process for monitoring mutagens in plants" - European Patent №00116070.4-2116, властивостями якого є оцінка інтенсивності мутагенного фону води та ґрунтів, що здійснюється на основі використання трансгенних рослин *Arabidopsis thaliana* і *Nicotiana tabacum*.

Недоліком прототипу є те, що даний спосіб передбачає застосування виключно двох ліній *Arabidopsis thaliana* і *Nicotiana tabacum*, які чутливі до радіаційного забруднення і не дозволяють об'єктивно тестувати мутагени хімічної природи.

Відомий метод визначення хімічного забруднення за допомогою ана-телофазного аналізу первинних корінців цибулі посівної *Allium* сера, який рекомендований групою експертів Міжнародної комісії із захисту від мутагенів оточуючого середовища [5]. Перевагою цього методу цитогенетичного моніторингу є добра кореляція його результатів з результатами, отриманими на інших тест-системах [6]. *Allium*-тест дає можливість вивчати два аспекти токсичності: а) загальну токсичність (або фітотоксичність) на основі пригнічення росту корінців цибулі (*Allium* сера), б) цитотоксичність, документовану мікроскопічним дослідженням хромосомних аберацій в клітинах кореневої меристеми.

Недоліком цього методу є те, що не враховуються ряд показників (енергія проростання насіння, активність поділу клітин, хромосомні аберації в різних фазах мітозу), окремі ядерні аномалії, які повністю охопили б спектр пошкодження спадкового апарату і довели природу потенційних мутагенів довкілля.

Для усунення вказаних недоліків нами пропонується використання трансгенних рослин в поєднанні з аналізом порушень мітозу: для первинної діагностики антропогенного забруднення використовується *Arabidopsis thaliana* з різним ступенем чутливості до мутагенів, а для конкретизації чинника забруднення - насіння цибулі *Allium* сера. Лише поєднана характеристика змін фенотипу і явищ гомологічної рекомбінації трансгенних рослин з врахуванням ана-тело-метафазних показників, активності мітотичних процесів об'єктивно відображає ступінь цито- і генотоксичності екологічних факторів. Спектр аберацій та ядерних аномалій клітин первинної меристеми з високим рівнем достовірності доводить природу факторів забруднення (хімічне або радіаційне).

Методика використання *Arabidopsis thaliana* полягає у наступному. Забір питної води та ґрунтів проводиться за загально прийнятими методами [7]. Насіння трансгенних рослин висаджується у ґрунт/воду і вирощується в стандартних умовах - 16 годин день/8 годин ніч, при температурі 22°C протягом 2 тижнів. Для проведення гістохімічної обробки рослини стерилізуються - промивання протягом 1 хвилини у 0,02% розчині гіпохлориду натрію, 5 хвилин у 70% етанолі та 3 рази по 1 хвилині у дистильованій воді. Наступний етап - вакуум-інфільтрація стерильним буферним розчином, що містить 3-бромо-4-хлоро-5-умбиферилглюкуронід (X-glu), потім інкубація в цьому ж розчині протягом 48 годин. Для екстракції хлорофілу та візуалізації рекомбінаційних явищ рослини обробляються 70% етанолом. Після цього виявляються сині плями в різних органах рослин: листках, стеблах, корінцях. Частота явищ гомологічної рекомбінації корелює з кількістю і площею синіх плям і відповідає інтенсивності мутагенного фону.

Методика виготовлення препарату з другого тест-об'єкту - насіння цибулі *Allium* сера. Насіння пророщується в чашках Петрі, у кількості 50 насінин на пробу, в присутності досліджуваного фактора (води, ґрунту, суспензії харчових продуктів, ліків тощо) в термостаті при температурі 21°C. Підрахунок енергії проростання насіння, відбір корінців та визначення їх довжини проводиться через 72 годин, що відповідає другому періоду активності мітозу. Фіксація корінців здійснюється в розчині етанолу та оцтової кислоти (3:1) протягом 24 годин. Підготовка давлених препаратів та їх фарбування 2% орсеїном, а для виявлення ДНК - за Фольгеном, проводиться за стандартними методиками [7-8]. Мітотичний індекс визначається у 400 клітинах з 5-ти полів зору в різних фазах мітозу (про-, мета-, ана- і телофазах); хромосомні аберації - у 100 мета-, ана- і ранніх телофазах. Ідентифікуються хромосомні та хроматидні аберації на 100 клітин і на одну абераційну клітину, як показники радіаційного та хімічного мутагенезу.

Результати дослідження

Проведено моніторингове дослідження води та ґрунтів в 2000 та 2002 роках з 15 екологічних зон Івано-Франківської області: зони посиленого радіаційного контролю (Снятинський район), хімічно забрудненого (м.Івано-Франківськ, м.Коломия) та умовно екологічно чистого (Верховинський і Косівський райони) регіонів. За фенотипом трансгенних ліній рослин *Arabidopsis thaliana* ідентифіковано наявність потенційних мутагенів у довкіллі (табл.1).

Таблиця 1

Морфологічна характеристика трансгенних ліній *Arabidopsis thaliana*, пророщених на різних пробах ґрунтів

№ п/п	Лінії трансгенних рослин	Верховинський район			м. Івано-Франківськ			м. Коломия		
		Висота стебла (см)	% схожості	Бутонізація	Висота стебла (см)	% схожості	Бутонізація	Висота стебла (см)	% схожості	Бутонізація
1	Col-O Bin AR/SiR2№8	1,5±0,5	75,0	-	1,5±0,5	62,5	-	1,0±0,5	50,0	-
2	Col-O Bin AR/SiR2№7	2,0±0,4	100,0	-	2,1±0,5	100,0	-	2,7±0,8	25,0	-
3	BAR Bin	1,3±0,6	75,0	-	1,3±0,6	25,0	-	1,3±0,6	37,5	-

	AR/RPД3-1									
4	BAR Bin AR/RPД3-9	1,0±0,5	62,5	-	0,7±0,3	62,5	-	0,7±0,5	37,5	-
5	Col-O pTA/SiR2№2	1,0±0,5	75,0	-	1,2±0,5	50,0	+	0,5±0,0	37,5	-
6	Col-O pTA/SiR2№3	2,0±0,5	87,5	-	5,2±0,8	75,0	+	3,9±0,5	50,0	+
7	Col-O pMEX/SiR2№3	3,0±0,8	50,0	+	5,0±0,6	62,5	+	4,1±0,6	50,0	+
8	Col-O pMEX/SiR2№9	5,4±0,8	75,0	+	4,1±1,8	62,5	+	4,8±0,2	25,0	+

Інтенсивність антропогенного забруднення оцінювали за частотою явищ інтрахромосомної гомологічної рекомбінації. При пророщуванні трансгенних рослин на пробах ґрунтів з міста Івано-Франківська встановлено найбільшу кількість синіх плям у генетично модифікованих лініях Col-0 pMEX/SiR2 №3, Col-0 pMEX/SiR2 №9. Аналогічна закономірність спостерігалась при пророщуванні *Arabidopsis thaliana* на воді та ґрунтах м. Коломиї. Частота рекомбінаційних процесів ДНК у рослинах, що виростили на пробах води та ґрунтів рекреаційних зон, була найменшою, що доводить можливість їх відношення до екологічно чистих територій ( $p < 0,01$ ). Для диференціації природи мутагенних чинників проведений цитологічний аналіз верхівкової меристеми первинної корінців *Allium* сера. Встановлено, пригнічення мітотичної активності клітин на всіх фазах мітозу, з порушенням веретена поділу (табл.2).

Таблиця 2

Вплив іонізуючого випромінювання та хімічних мутагенів на розподіл клітин в залежності від фаз мітозу в апікальній меристемі корінців *Allium* сера 48 – годинних проростків ( $M \pm m$ )

Досліджуваний регіон	ПІ	МІ	АІ	ТІ
Контроль	22,4±2,4	6,2±2,4	6,4±1,6	6,0±2,0
Зона посиленого радіаційного контролю				
Стецева				
Лозниця	19,7±2,0*	6,0±2,1	5,0±1,4*	5,0±2,2*
Потічок	17,9±3,1	5,6±2,1*	5,0±1,3	4,8±1,4*
Русів	14,4±1,4*	5,0±1,0*	4,0±1,1*	4,5±1,2
	15,2±2,1	5,4±1,5*	5,2±1,4	4,7±1,8*
Зона хімічного забруднення				
Коломия 1	12,95±2,0	5,5±2,0*	4,9±2,1	5,1±2,2
Коломия 2	16,8±1,9	6,1±1,7	5,1±1,9*	6,4±2,0
Коломия 3	18,5±1,7*	5,9±2,3	5,1±2,0	5,7±1,6
Коломия 4	18,9±2,2	6,0±1,9	5,5±1,5	5,9±2,0
Івано-Франківськ 1	17,5±2,5*	6,0±2,1	5,5±1,4	5,1±1,6*
Івано-Франківськ 2	17,2±1,8	5,9±1,6	5,4±1,9*	5,8±2,0
Івано-Франківськ 3	16,3±2,0	5,7±1,7*	4,9±2,0	5,5±2,2*
Івано-Франківськ 4	16,9±1,7	5,8±2,0	4,8±1,4	5,7±1,9*
Рекреаційна гірська зона				
Косів	20,0±1,8*	6,0±2,1	5,0±1,5*	5,9±2,0
Верховина	21±2,0	6,1±2,0*	5,8±2,0*	6,0±1,8

Примітки: 1. ПІ – профазний індекс, МІ – метафазний індекс, АІ – анафазний індекс, ТІ – телофазний індекс.  
2.\* -  $P < 0,05$ .

На препаратах корінців, пророщених на пробах води та ґрунтів зони посиленого радіаційного контролю, переважали аберації хромосомного типу; а з хімічно забрудненого району - хроматидні аберації. Спектр аберацій, доводить природу мутагенних факторів.

Висновок. Запропонований спосіб біомоніторингу антропогенного забруднення дозволить отримати об'єктивну оцінку інтенсивності мутагенного фону, зумовленого дією хімічних та радіаційних факторів. Застосування трансгенних ліній *Arabidopsis thaliana* дозволяє оцінити зміни фенотипу рослин, частоту явищ гомологічної рекомбінації на молекулярно-генетичному рівні, а також візуалізувати їх у вигляді синіх плям. Використання тест-об'єкту *Allium* сера дає можливість на одному препараті одночасно отримати кілька показників, які повністю відображають стан спадкового апарату клітин, ступінь його пошкодження, спектр хромосомних аберацій, що характеризує geno- і цитотоксичність досліджуваного екологічного фактора та його природу. Метод не вимагає великих матеріальних затрат, характеризується доступністю матеріалу, можливістю дослідження в динаміці.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Погосян В.С., Симонян Е.Г., Джигарджян Э.М., Арутюнян Р.М. Оценка генотоксического действия антропогенных факторов на растения в городских условиях // Цитология и генетика. - 1991. Т.25, №1. - С.23-29.
2. Puchta H., Swoboda P., Hohn B. Induction of intrachromosomal homologous recombination in whole plants // The Plant Journal. - 1995. - Vol.7. - P.203-210.
3. Vesna Smaka- Kincl, Peter Stegnar, Milan Lovka, Mihael J.Toman The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure // Mutation Research 368 (1996) 171-179

4. O. Kovalchuk, I. Kovalchuk, A. Arkhipov, P. Telyuk, B. Hohn, L. Kovalchuk. The Allium cepa chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident// Mutation Research 415 (1998) 47-57.
5. Руководство по изучению генетических эффектов в популяциях человека / Программа ООН по окружающей среде, Международная организация труда и ВОЗ. Гигиенические критерии оценки окружающей среды. - М.: Медицина; Женева: ВОЗ, 1989 г. - 121с.
6. Fiskesj G., Levan A. Evaluation of the first ten MEIC chemicals in the Allium test // ATLA. - 1993. - 21. - P.139-149.
7. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. - М.: Колос, 1980. - 304с.
8. Дарлингтон С., Ла Кур Л. Хромосомы. Методы работы : Пер. с англ. - М.: Атомиздат, 1980. - 216с.