



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 53375

(13) A

(51) 7 A01G7/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВІНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД  
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ  
ВЛАСНИКА  
ПАТЕНТУ

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ МУТАГЕННОГО ЕФЕКТУ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

1

2

(21) 2002053834

(22) 10 05 2002

(24) 15 01 2003

(46) 15 01 2003, Бюл. № 1, 2003 р.

(72) Глухов Олександр Захарович, Хижняк Ніна  
Антонівна, Сафонов Андрій Іванович

(73) ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

(57) Спосіб визначення мутагенного ефекту важких металів, який включає облік показників порушення ембріонального розвитку рослин та свідчення за даними обліку про наявність мутагенного ефекту, який відрізняється тим, що для визначення віддалених та безпосередніх наслідків впливу факторів середовища, зокрема важких ме-

талів, використовують як тест-систему частоту та спектр аномалій для вже сформованого зародкового апарату, а саме пстогенна редукція ендосперму, розширення шару епідермісу зародку, розростання палінової оболонки, анізокотилія, тератологічна полікотилія та тератологічна схізокотилія, цілковите зменшення зародку, гемптрикотилія, гемптетракотилія, складання ендотести з палісадного шару близьких до кубічних клітин, за якими визначають ступінь генотоксичності мутагенних факторів середовища, в тому числі важких металів, та проводять елементний аналіз специфіки впливу окремих металів

Винахід відноситься до фітоембріології, фітотоксикології, охорони генофонду рослин природної флори та може бути використаний для тестування генотоксичних ефектів важких металів на основі ідентифікування індукованих ними аномалій ембріонального розвитку, а також для визначення оптимальних концентрацій важких металів, прогнозування наслідків мутагенних трансформацій та якостей насінин та рослин природної флори у наступних поколіннях

Відомі способи біоіндикації мутагенів ґрунтів за допомогою реакції пилку індикаторних рослин, де визначається ступінь дефектності пилкових зерен амфіміктичних квіткових рослин, які використовуються як індикаторні [1,2]. Можливість використання біоіндикаційних досліджень при проведенні гігієнічної оцінки якості навколишнього середовища надає великого значення розробці експресних високочутливих методів. Для аналізу забруднення ґрунтів мутагенами найбільш вдалим тест-об'єктом є рослини [1].

Існує спосіб визначення мутагенного ефекту факторів середовища за допомогою ідентифікації індукованих пестицидами аномалій ембріонального розвитку рослин, де вивчали спектр порушень ембріогенезу на 1 – 2 - й день квіткування та обліку підлягали такі показники, як старіння яйцевого апарату, асинхронний розвиток зародку та ендосперму та поліембріонія. При наявності мутагенно-

го ефекту факторів середовища робили висновок, якщо значення першого з перелічених показників зменшувалося, а другого та третього збільшувалося у порівнянні з контролем [3].

Недоліками цього способу є мала достовірність при аналізі проб саме у перші дні квіткування з урахуванням високої морфологічної пластичності квітки та генеративного апарату, неточна означеність мутагенного ефекту та використання даних тільки пестицидного забруднення, а точніше лише концентрації  $\text{HN}_2$ , що не дає повну картину мутагенного характеру субстрату.

В основу винаходу поставлена задача поліпшення методів ембріональної оцінки навколишнього середовища за допомогою рослин природної флори на прикладі *Tripleurospermum perforatum* (Merat) M. Lairz (Asteraceae Dum.), де обліку підлягають не впроваджені раніше показники, а рослинні збори проводять після квіткування, забезпечується можливість встановити рівень та спектр аномалій у розвитку ембріональних структур, також виявити не тільки інтегративну, а й дискретну ознаку дії мутагенних факторів середовища, зокрема важких металів, на ембріональний розвиток першого та наступних поколінь, та за рахунок цього використання способу дозволить більш точно прогнозувати наслідки мутагенних трансформацій, якостей насінин та рослин природної флори, оцінити специфіку металевого забруднення на техно-

(13) A

(11) 53375

(19) UA

генно змінених територіях

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб визначення мутагенного ефекту важких металів, який містить облік показників порушення ембріонального розвитку рослин та свідчення за даними обліку про наявність мутагенного ефекту, відповідно винаходу для визначення віддалених та безпосередніх наслідків впливу факторів середовища, зокрема важких металів, використовують як тест - систему частоту та спектр аномалій для вже сформованого зародкового апарату, а саме гістогенна редукція ендосперму, розширення шару епідермиса зародку, розростання палинної оболонки, анізокотилія, тератологічна полікотилія та тератологічна схізокотилія, цілковите зменшення зародку, гемітрикотилія, гемітетракотилія, складання ендотести з палинної оболонки шару близьких до кубічних клітин, за якими визначають ступінь генотоксичності мутагенних факторів середовища, в тому числі важких металів, та проводять елементний аналіз специфіки впливу окремих металів

Спосіб оснований на тому, що визначення віддалених та безпосередніх наслідків впливу факторів середовища, зокрема важких металів, використовують як тест - систему частоту та спектр аномалій для вже сформованого зародкового апарату, а саме гістогенна редукція ендосперму, розширення шару епідермиса зародку, розростання палинної оболонки, анізокотилія, тератологічна полікотилія та тератологічна схізокотилія, цілковите зменшення зародку, гемітрикотилія, гемітетракотилія, складання ендотести з палинної оболонки шару близьких до кубічних клітин, за якими визначають ступінь генотоксичності мутагенних факторів середовища в тому числі важких металів та проводять елементний аналіз специфіки впливу окремих металів. При цьому найбільш інформативними показниками є гістогенна редукція ендосперму (ГРЕ), розширення шару епідермиса зародку (РШЕЗ), розростання палинної оболонки (РГО), анізокотилія (А), тератологічна полікотилія (ТП) та тератологічна схізокотилія (ТС). Гістогенна відповідність з'ясована за літературними джерелами [4 - 7]

Приклад. Вказаний спосіб визначення мутагенного ефекту важких металів було проведено на рослині *Tripleurospermum perforatum* (Merat) M. Lajz (Asteraceae Dum.), що вирощували на території промислових майданчиків Артемівського та Костянтинівського районів Донецької області наступних модульних зон. Артемівський завод по переробці кольорових металів (МЗ - 3), Артемівський машинобудівельний завод (МЗ - 4), Артемівський завод "Доріндустрія" (МЗ - 5), Артемівський кераміко - трубний комбінат (МЗ - 6), Часовоярський вогнетривкий комбінат (МЗ - 7), Артемівський скляний завод ім. Артема (МЗ - 8), Костянтинівський завод "Автоскло" (МЗ - 9), Костянтинівський механізований скляний завод (МЗ - 10), Костянтинівський завод "Укрцирк" (МЗ - 11), територія залізничного вокзалу м. Костянтинівка (МЗ - 12) та в контрольних фонових умовах, де концентрації важких металів в ґрунтах були на рівні фона для Донецької області: с. Серебрянка (МЗ - 1) та с. Званиця (МЗ - 2). Обрані рослини з контрольних місць зростання додатково вирощували в лабораторних умовах на інгратних металонасних субстратах з концентраціями Pb - 500, Zn - 500, Cd - 10, Ni - 300, Cr - 300, Mo - 10, Fe - 200, Mn - 4000, Cu - 300, Hg - 5 мг/кг. Вміст металів у субстраті обумовлений гранично допустимими концентраціями [8 - 10] з поправкою на місцеві стандарти та фонові рівні [11]. Повторність лабораторного експерименту дорівнювала 5. Дослідження проводили на рослинах першого, другого, третього та четвертого покоління. Для вивчення спектру порушень ембріонального розвитку була обрана найбільш стабільна та стандартизована стадія - кінець квіткування. Для аналізу використовували 300 насінин в контрольних варіантах та 200 - у досліджених модульних зонах. Постійні препарати готували за загальноприйнятими цитологічними методиками [12, 13]. Товщина зрізів - 10 мкм, фарбування гематоксиліном за Гейденгайном.

В табл. 1 представлені найбільш інформативні показники спектру аномалій від загальної кількості порушень (частота різних типів структурних аномалій в залежності від місцезростання).

Таблиця 1

Варіант	Частота аномальних порушень, $M \pm m$	Спектр порушень, %						
		ГРЕ	РШЕЗ	РГО	А	ТП	ТС	Інші
МЗ-1 (контроль)	$3,01 \pm 0,02$	50		25				25
МЗ-2 (контроль)	$4,02 \pm 0,01$	50						50
МЗ-3	$62,04 \pm 0,51$	30	2	40	18	5	1	4
МЗ-4	$57,27 \pm 0,49$	23	10	15	12	10	20	10
МЗ-5	$42,16 \pm 0,40$	40	15	10	20	5	5	5
МЗ-6	$38,45 \pm 0,31$	5	14	30	21	16	5	9
МЗ-7	$44,98 \pm 0,40$	20	5	13	35	10	10	7
МЗ-8	$45,19 \pm 0,31$	20	30	15	19	10	5	1
МЗ-9	$50,42 \pm 1,01$	12	28	15	15	20	9	1
МЗ-10	$49,90 \pm 0,90$	5	11	5	13	17	40	9
МЗ-11	$69,71 \pm 1,12$	5	7	70	4	6	5	3
МЗ-12	$48,30 \pm 0,44$	3	12	7	60	3	7	8

Примітка: М - середнє арифметичне, m - похибка

З табл. 1 видно, що кількість аномальних порушень у дослідних зонах значно більше від контролю. Результати частоти зустрічаємості достовірні на 95% - му рівні. Ступінь трансформованої зародкових елементів залежить від територіального розташування та міста збору ембріологічного матеріалу. В контролі присутні деякі аномалії, що обумовлено нормальною генетичною гетерогенністю насінного матеріалу, та багато з типів порушень відсутні взагалі, тоді як у дослідних зонах зустрічаються усі типи означених аномалій.

В табл. 2 представлені дані лабораторного експерименту - безпосереднього впливу важких металів на ембріональні структури тест - рослини (вплив нітратних форм важких металів на ступінь аномальності ембріональних елементів).

Таблица 2

Метали	Спектр порушень, %						
	ГРЕ	РШЕЗ	РГО	А	ТП	ТС	Інші
Pb	1	-	2	92	4	1	-
Zn	1	-	93	-	3	2	1
Cd	91	1	2	1	1	2	2
Ni	10	20	15	15	20	15	5
Cr	20	10	20	25	10	15	-
Mo	17	10	10	23	10	20	10
Fe	1	-	2	-	3	92	2
Mn	15	10	22	15	18	10	10
Cu	-	-	4	-	92	-	4
Hg	3	24	13	17	7	26	10

З табл. 2 видно, частота появи аномалій специфічна в залежності від чинника - важкого металу. Найбільш інформативною при забрудненні свинцем є ознака анізокотилії, цинком - розростання палинкової оболонки, кадмієм - пістогенна редукція ендосперму, залізом - тератологічна схізокотилія та міддю - тератологічна полікотилія. Вплив нікеля, хрому, молібдена, марганцю та ртуті не несе цілеспрямованого ефекту для вивчених структур.

Позитивний ефект проявляється в тому, що на відміну від відомого запропонований спосіб дозволяє виявити мутагенний вплив важких металів на більш віддалені етапи онтогенезу рослин. Він має можливість встановити рівень та спектр аномалій у розвитку ембріональних структур та виявити не тільки інтегративну, а й дискретну ознаку дії мутагенних факторів середовища на ембріональний розвиток першого та наступних поколінь.

Використання способу дозволить більш точно прогнозувати наслідки мутагенних трансформацій та якостей насінин та рослин природної флори, оцінити специфіку металевого забруднення на техногенно змінених територіях.

Джерела інформації

1 Нечкина М. А., Журков В. С. Способ биоиндикации мутагенов почвы // Гигиена и санитария - 1997 - № 1 - С. 48 - 49.

2 А. с. 1725785 СССР МКИ А 01 Н 1/00 Способ определения интегрального эффекта неблагоприятных факторов внешней среды / Нечкина М. А., Куприянов П. Г. - 1992 - № 14 - С. 10.

3 А. с. 1463189 СССР МКИ А 01 G 7/00 Способ определения мутагенного эффекта факторов среды / Попа Н. Е., Закржевская А. М. - 1989 - № 9

- С. 12 (прототип)

4 Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции / Под ред. Т. Е. Батыгиной - Генеративные органы цветка - СПб. Мир и семья, 1994 - Т. 1 - 320 с.

5 Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции / Под ред. Т. Е. Батыгиной - Семья - СПб. Мир и семья, 1997 - Т. 2 - 823 с.

6 Левина Р. Е. Морфология и экология плодов - Л. Наука, 1987 - 160 с.

7 Макрушин Н. М. Основы гетеросперматологии - М. Агропромиздат, 1989 - 287 с.

8 Дудик А. М. Временные методические рекомендации по геолого - экологическим работам в пределах горнопромышленных районов Украины - Донецк Б. и., 1992 - 105 с.

9 Дорошко Т. Ю. Предельно допустимые концентрации тяжелых металлов в почве и ее защита от загрязнения // Медицинский журнал Узбекистана - 1981 - № 7 - С. 40 - 42.

10 Кабата - Пендиас А., Пендиас Х. Микроэлементы в почвах и растениях - М. Мир, 1989 - 439 с.

11 Сафонов А. И. Особенности локализации некоторых металлов - токсикантов в почвах северных промышленных узлов Донбасса // Экологическая и техногенная безопасность. Сб. научн. тр. Международн. Научно - практ. конференции - Харьков. Изд. - во Харьк. Ин-та социального прогресса, 2000 - С. 131 - 135.

12 Паушева З. П. Практикум по цитологии растений - М. Агропромиздат, 1988 - 271 с.

13 Барыкина Р. П., Веселова Т. Д., Девятов А. Г. Основы микроскопических исследований в ботанике - М. Наука, 2000 - 128 с.

