

Винахід відноситься до промислової ботаніки, фітоембріології, фітотоксикології, охорони генофонду рослин природної флори та може бути використаний для тестування токсичних ефектів важких металів на основі ідентифікування індукованих ними аномалій розвитку та формування пилкового зерна, а також для визначення оптимальних концентрацій важких металів, прогнозування наслідків структурних трансформацій та якостей пилкової сировини та рослин природної флори.

Відомо, що стан пилку може бути показником забруднення ґрунтів важкими металами [1]; серед актуальних питань промислової ботаніки виділяються аспекти вивчення генеративного розвитку за умов забруднення довкілля [2].

Відомі способи біоіндикації мутагенів ґрунтів за допомогою реакції пилку індикаторних рослин, де визначається ступінь дефектності пилкових зерен амфіміктичних квіткових рослин, які використовуються як індикаторні [3, 4]. 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 [3].

Відомий також 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 мутагенного ефекту факторів середовища робили висновки, якщо значення першого з перелічених показників зменшувалося, а другого та третього збільшувалося у порівнянні з контролем [5]. Недоліками цих способів є визначення інтегрального або загального фонового забруднення без визначення конкретного чинника, який саме індукує процеси зміни будови рослинного організму.

Найбільш близьким за технічною сутністю і досягненням результату є спосіб визначення інтегрального ефекту впливу несприятливих факторів зовнішнього середовища, який оснований на здатності мутагенів підвищувати ступінь дефектності пилку (СДП) трав'янистих рослин природної флори внаслідок порушення процесів мейозу при формуванні пилкових зерен. Для індикації мутагенів ґрунту цим способом можуть бути використані тільки ті рослини, які розмножуються статевим шляхом та при оптимальних умовах існування мають мінімальну кількість дефектного пилку [6].

Недоліками цього способу є визначення загального мутагенного фону, який обумовлений складним комплексом взаємодії природних та антропогенних факторів. Цей спосіб не дозволяє визначити конкретні фактори середовища, які саме впливають на показники дефектності генеративної сфери рослини-індикатора, тому у різних контрастних техногенних, геохімічних, радіологічних тощо екотопах реакція рослин може бути неоднакова, а мутагенний фон ґрунтів може оцінюватися як рівний.

В основу винаходу поставлена задача визначення локального ефекту токсичного впливу важких металів та поліпшення методів палінологічної оцінки навколишнього середовища за допомогою рослин природної флори на прикладі *Cichorium intybus* L. (Asteraceae Dum.), де обліку підлягають не впроваджені раніше індексовані показники внаслідок шкалоутворення, а збори пилкового матеріалу проводять під час квіткування та забарвлюють метиленовим синім, ацетокарміном, гематоксиліном та орсеїном; забезпечується можливість встановити рівень та спектр атипового поліморфізму у розвитку паліносировини, також виявити не тільки інтегративну, а й дискретну ознаку дії гетерогенних факторів середовища, зокрема важких металів, на розвиток та формування пилкового зерна, та за рахунок цього використання способу дозволить більш точно прогнозувати наслідки металогенних трансформацій, якостей пилку та рослин природної флори, оцінити специфіку металевого забруднення на техногенне змінених територіях.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб визначення локального ефекту токсичного впливу важких металів, який містить аналіз палінологічного матеріалу за показником ступеня дефектності пилку рослини-індикатора та свідчення за даними обліку й статистичної обробки про наявність трансформуючого ефекту, відповідно винаходу для визначення віддалених та безпосередніх наслідків впливу факторів середовища, зокрема важких металів, використовують в якості тест-системи індекс за розробленою 10-бальною шкалою для морфоструктурних елементів пилку та за цим індексом визначають ступінь та специфіку забруднення ґрунтів важкими металами.

Спосіб оснований на тому, що для визначення віддалених та безпосередніх наслідків впливу факторів середовища, зокрема важких металів, використовують в якості тест-системи індекс за розробленою 10-бальною шкалою для морфоструктурних елементів пилку та за цим індексом визначають ступінь та специфіку забруднення ґрунтів важкими металами.

Особливості визначення, формоутворення, загальної морфології та екології паліносировини з'ясовано за літературними джерелами [7-10].

Приклад.

Вказаний спосіб визначення локального ефекту токсичного впливу важких металів було проведено на рослині *Cichorium intybus* L., що вирощували на території промислових майданчиків Артемівського та Костянтинівського районів у наступних пробних площах: СЕРЕБ - сільський населений пункт Серебрянка, долина р. Сіверський Донець (контроль); ЛУГ - населений пункт міського типу Луганське, ділянка степового типу рослинності (контроль); НОВ - сільський населений пункт Новогригорівка, ділянка степового типу рослинності (контроль); ЧАС - Часовярський вогнетривкий комбінат; ПТ - Артемівський машинобудівний завод "Победа труда"; РК - рудеральний комплекс Артемівського центрального звалища сміття; ОКМ - Артемівський завод з обробки кольорових металів; АВТ - автовокзал м. Артемівськ; АСЗ - Артемівський скляний завод; ШВД - рудник виробничого об'єднання "Південний"; КСЗ - Костянтинівський механізований скляний завод; УКЦ - Костянтинівський завод "Укрцирк"; КАВТ - автовокзал м. Костянтинівка. Обрані рослини з контрольних місць зростання додатково вирощували в лабораторних умовах на нітратних металоносних 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 [11-13] з поправкою на місцеві стандарти та фонові рівні [14]. Повторність лабораторного експерименту дорівнювала 5.

Для встановлення індикаторних індексів обиралися пиляки з вже сформованими та незвільненими пилковими зернами в період квіткування особин (червень-липень). Для аналізу використовували 30 особин *Cichorium intybus*. Препарати готували за загальноприйнятими цитологічними методиками за умов фарбування метиленовим синім, ацетокарміном, гематоксиліном та орсеїном [15, 16].

Увесь спектр атипового поліморфізму пилку за показником СДП поділяли на 10 інтервалів.

На основі отриманих даних нами були отримані наступні значення ступеня дефектності пилку для індексів за 10-бальною індикаторною шкалою:

- 1 - <2,50;
- 2 - 2,50-4,99;
- 3 - 5,00-7,49;
- 4 - 7,50-9,99;
- 5 - 10,00-12,49;
- 6 - 12,50-14,99;
- 7 - 15,00-17,49;
- 8 - 17,50-19,99;
- 9 - 20,00-29,99;
- 10 -  $\geq 30,00$ .

В таблиці 1 містяться дані щодо ступеня дефектності пилкових зерен (СДП) *Cichorium intybus* за умов різного забарвлення, де CV - коефіцієнт варіації.

Таблиця 1

Пробні площі	Барвники							
	Метиленовий синій		Ацетокармін		Гематоксилін		Орсеїн	
	СДП(М)	CV, %	СДП(А)	CV, %	СДП(Г)	CV, %	СДП(О)	CV, %
СЕРЕБ	0,56±0,02	2,01	1,17±0,05	3,03	1,00±0,02	6,02	1,04±0,01	3,70
ЛУГ	1,52±0,02	3,08	0,72±0,02	3,50	0,22±0,00	3,27	0,77±0,01	3,17
НОВ	1,34±0,03	2,09	1,22±0,08	2,26	1,33±0,03	8,00	1,95±0,08	4,01
ЧАС	16,01±0,12	1,07	18,00±0,51	3,01	7,04±0,09	7,02	15,95±0,27	3,74
ПТ	34,99±1,20	2,28	16,89±0,38	2,06	17,03±0,54	6,11	14,10±0,13	6,16
РК	19,01±1,07	4,19	20,67±0,39	3,12	17,15±0,52	2,18	20,24±0,46	5,03
ОКМ	27,03±0,24	2,82	18,00±0,30	3,20	19,94±0,49	4,10	21,71±0,58	8,08
АВТ	2,03±0,07	1,15	1,24±0,07	2,03	1,15±0,03	8,80	1,83±0,07	10,73
АСЗ	2,01±0,03	1,60	1,70±0,07	3,71	1,69±0,06	10,25	1,04±0,02	11,69
ШВД	2,09±0,03	2,04	1,83±0,03	3,45	1,36±0,07	10,51	1,12±0,03	12,77
КСЗ	15,36±0,28	3,76	13,17±0,12	1,05	17,26±0,48	3,72	10,70±0,35	11,71
УКЦ	23,36±0,28	2,95	20,17±1,02	3,74	20,25±0,82	2,52	10,25±0,41	13,76
КАВТ	1,15±0,03	3,90	1,00±0,07	4,48	1,28±0,06	10,50	1,10±0,04	6,68

За даними таблиці 1 можна зазначити, що загальна тенденція деформованості пилкових зерен зберігається, та кожний барвник теоретично можна використовувати як альтернативний, але значення коефіцієнту варіації свідчать, що ознаки деформованості занадто варіюють при забарвленні гематоксиліном та орсеїном, що вказує на меншу інформативність ознаки при встановленні СДП та дозволяє рекомендувати метиленовий синій та ацетокармін як кращі барвники для цієї серії експерименту.

Для контрольних зон показник СДП був мінімальний.

Для пробних площ АТ, АСЗ, ПВД, КАВТ також зазначені невисокі показники ступеня дефектності пилку, що може свідчити про невисоке техногенне, та, як наслідок останнього, мутагенне забруднення ґрунтів.

Коефіцієнт варіації у випадку з забарвленням метиленовим синім та ацетокарміном не перевищував 4,48, що вказує на достатню стабільність цього показника у даному випадку експерименту. Важливо зазначити, що дані в таблиці 1 достовірні на 95% рівні.

Виходячи з того, що кращими барвниками є метиленовий синій та ацетокармін, доречно було простежити особливості деформованості пилкових зерен *Cichorium intybus* за фракціонованими блоками.

В таблиці 2 зазначені особливості дефектності пилку *Cichorium intybus*, що забарвлений метиленовим синім та ацетокарміном, де використані дані однієї з п'яти повторностей експерименту.

В таблиці використані наступні фракціоновані блоки:

- 1 - пилкові зерна правильної форми з рівномірно забарвленою цитоплазмою;
- 2, 4, 6 - пилкові зерна забарвлені слабо, мають явні ознаки дегенерації;
- 3, 5, 7 - незабарвлені пилкові зерна, зовсім позбуті вмісту, або мають лише його залишки.

Таблиця 2

Пробні площі	Нормальний розмір пилкових зерен, %			Дрібні зерна, %		Крупні зерна, %		СДП
	1	2	3	4	5	6	7	
Забарвлення метиленовим синім								
СЕРЕБ	93,50	-	0,25	-	0,25	6,00	-	0,50
ЛУГ	91,00	0,25	0,50	0,25	0,50	7,50	-	1,50
НОВ	93,20	-	0,50	-	0,50	5,50	0,30	1,30

ЧАС	82,00	6,00	3,00	2,00	2,00	2,00	3,00	16,00
ПТ	59,65	20,00	5,10	5,00	-	6,25	4,00	34,10
РК	77,70	2,10	3,10	7,10	7,00	3,00	-	19,30
ОКМ	66,00	2,00	15,00	-	-	7,00	10,00	27,00
АВТ	91,95	-	0,05	-	2,00	6,00	-	2,05
АСЗ	94,00	-	-	-	2,00	4,00	-	2,00
ПІВД	89,70	1,00	-	1,00	0,05	8,25	-	2,05
КСЗ	78,65	5,25	-	5,10	5,00	6,00	-	15,35
УКЦ	70,20	8,00	4,00	2,00	2,00	6,50	7,30	23,30
КАВТ	93,35	-	-	1,10	0,05	5,50	-	1,15
Забарвлення ацетокарміном								
СЕРЕБ	93,85	-	0,05	-	1,10	5,00	-	1,15
ЛУГ	92,30	-	0,20	0,50	-	7,00	-	0,70
НОВ	93,30	-	0,50	0,20	0,50	5,50	-	1,20
ЧАС	79,50	2,00	5,00	3,00	5,00	2,50	3,00	18,00
ПТ	77,20	-	2,20	3,60	6,00	6,00	5,00	16,80
РК	76,40	10,50	3,00	3,10	4,00	3,00	-	20,60
ОКМ	75,00	-	1,00	3,00	3,00	7,00	11,00	18,00
АВТ	91,75	-	-	1,00	0,25	7,00	-	1,25
АСЗ	93,30	0,20	0,50	1,00	-	5,00	-	1,70
ШВД	89,70	0,30	0,50	1,00	-	8,50	-	1,80
КСЗ	80,95	2,00	8,00	-	3,05	6,00	-	13,05
УКЦ	74,00	5,00	-	4,00	4,00	6,00	7,00	20,00
КАВТ	94,00	0,50	0,50	-	-	5,00	-	1,00

За даними таблиці 2 з'ясовано, що більші абсолютні показники отримані за умов забарвлення метиленовим синім, але це не вказує на менше індикаторне значення при забарвленні ацетокарміном, оскільки дані достовірні при  $P \leq 0,05$ .

Парні блочні поєднання при кореляційному аналізі між індексом атипового поліморфізму, що встановлюється за індикаційною шкалою, та ступенем забруднення ґрунтів важкими металами показали, що деформованість пилку, яка визначення за умов забарвлення метиленовим синім, найбільш корелює з концентрацією нікелю (коефіцієнт кореляції ( $r^2=0,87$ ), а при забарвленні ацетокарміном - цинку ( $r^2=0,79$ ). Інші коефіцієнти кореляції не перевищували значення 0,40.

Для перевірки цього факту та з'ясування який метал найбільш обумовлює дефектність пилку нами був проведений лабораторний експеримент (при безпосередньому впливі окремих важких металів), результати якого відображені в таблиці 3, де МС - за умов забарвлення метиленовим синім, А - ацетокарміном.

Таблиця 3

Барвники	Метали									
	Pb	Zn	Cd	Ni	Cr	Mo	Fe	Mn	Si	Hg
	Індекси									
МС	3	5	2	10	1	1	1	1	1	1
А	2	10	1	5	1	1	1	1	1	1

За даними таблиці 3 встановлено, що поява деформованості специфічна в залежності від чинника - важкого металу. СДП здебільшого залежить від концентрації нікелю та цинку, але за умов забарвлення метиленовим синім - Ni, а при забарвленні ацетокарміном - Zn. Перебільшення мінімального індексу (1) зазначено в експерименті з Pb та Cd, що може вказувати на однакову трансформаційну дію цих металів у порівнянні з Ni та Zn, а можливо, поява деформованого пилку обумовлена атиповою будовою інших структурних показників, які в даній серії експерименту не вивчалися.

Позитивний ефект проявляється в тому, що на відміну від відомого запропонований спосіб дозволяє диференційовано тестувати забруднення ґрунтів нікелем, цинком та визначати віддалені ефекти свинцю та кадмію. Він може використовуватися у натурному (природному) біомоніторингу для експрес-діагностики металопресингу, що дуже актуально для територій з посиленням антропогенним впливом техногенне трансформованих екотопів.

Використання способу дозволить більш точно виділяти зони нікелевого та цинкового забруднення, проводити оцінку та постійний моніторинг стану довкілля природних та техногенне змінених територій.

Джерела інформації.

1. Бессонова В.П. Состояние пыльцы как показатель загрязнения среды тяжёлыми металлами // Экология. - 1992. №4. - С. 45-50.
2. Бессонова В.П. Актуальні питання вивчення генеративного розвитку рослин за умов забруднення довкілля // Проблеми сучасної екології (Тез. міжнародн. конф., Запоріжжя, 24-26 червня 2002р.) - Запоріжжя. - 2002. - С.17.
3. Нечкина М.А., Журков В.С. Способ биоиндикации мутагенов почвы // Гигиена и санитария. -1997. -№1. - С.48-49.
4. Журков В.С., Русаков Н.В., Тонкопий Н.И. Гигиеническая оценка мутагенного потенциала промышленных отходов // Гигиена и санитария.-1998.-№4.-С.30-32.

5. А.с. 1463189 СССР МКИ А01G7/00. Способ определения мутагенного эффекта факторов среды / Попа Н.Е., Закржевская А.М. - 1989. -№9. -С.12.
6. А.с. 1725785 СССР МКИ А01Н1/00. Способ определения интегрального эффекта неблагоприятных факторов внешней среды / Нечкина М.А., Куприянов П.Г. -1992. -№14. -С.10 (прототип).
7. Аксерова Р.К. Палинология трибы Cichorieae (Compositae) // Морфология пыльцы и спор современных растений. Тр. III Международн. палинологической конф. в СССР. - Л.: Наука, 1973. -С.33-36.
8. Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции / Под ред. Т.Б. Батыгиной. - Генеративные органы цветка. - СПб.: Мир и семья, 1994.-Т.1.-320с. 9. Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции / Под ред. Т.Б. Батыгиной. - Семя. - СПб: Мир и семья, 1997. -Т.2. - 823с.
10. Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции / Под ред. Т.Б. Батыгиной. - Системы репродукции. - СПб: Мир и семья, 2000. -Т.3. -640с.
11. П.Дудик А.М. Временные методические рекомендации по геолого-экологическим работам в пределах горнопромышленных районов Украины. - Донецк: Б. и., 1992. -105с.
12. Дорошко Т.Ю. Предельно допустимые концентрации тяжелых металлов в почве и её защита от загрязнения // Медицинский журнал Узбекистана. - 1991.-№7.-С. 40-42.
13. Кабата-Пендиас А., Пендиас Х. Микроэлементы в почвах и растениях. - М.:Мир, 1989. -439с.
14. 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.
15. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. - М.: Агропромиздат, 1988.-271с.
16. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г. Основы микроскопических исследований в ботанике. -М.: Наука, 2000. -128с.