

За допомогою цього методу отримують інформацію щодо присутності мутагенних факторів у питній воді, а дослідження частоти зустрічальності мутацій у популяціях рослин, що ростуть у областях з різним ступенем забруднення дозволяє надати кількісні оцінки небезпеки і для людини, проте дослідити мутагенність промислових відходів за цим способом неможливо, бо використання водних витяжок з промислових відходів у якості середовища для росту призведе до загибелі насіння *Allium* *sera* та зробить неможливим урахування хромосомних аберацій.

В основу винаходу поставлено задачу удосконалення способу визначення мутагенності речовин, в якому шляхом введення нових технологічних операцій та параметрів досягається можливість достовірного визначення класу мутагенності надзвичайно токсичних речовин, особливо промислових відходів, і за рахунок цього досягається можливість уніфікувати процедуру віднесення відходів до класів екологічної небезпеки, виключити порушення гігієнічних вимог щодо поводження з небезпечними відходами та підвищити рівень екологічної безпеки територій складування промислових відходів.

Задача вирішується тим, що у відомому способі визначення мутагенності, що включає урахування структурних аберацій хромосом в анафазах і телофазах клітин цибулі ріпчастої (*Allium* *sera* L.), пророщеної у середовищі, що досліджується, та порівнянні отриманого рівня мутагенності з контролем, згідно винаходу, у якості середовища для пророщування насіння *Allium* *sera* L. використовують водну витяжку з промислових відходів, що досліджуються, яку розводять чистою водою з коефіцієнтом розведення від 1:1 до 1:20, визначають кількість хромосомних аберацій у клітинах цибулі, враховуючи також профазу та метафазу, а потім встановлюють залежність частоти зустрічальності хромосомних патологій в усіх фазах мітозу від кратності розведення витяжки з відходів, порівнюють з контролем та визначають клас їх небезпеки за показником мутагенності.

Спосіб реалізується наступним чином. Готують водний екстракт з промислових відходів за таких умов: відходи заливають водопровідною водою у відношенні 1:1 [1], ретельно змішують та залишають на 2 доби. Потім витяжку відфільтровують через фільтрувальний папір.

На першому етапі дослідження проводять попереднє тестування з метою визначення ступеню агресивності витяжки з промислових відходів до біооб'єктів. Задля цього в чашку Петрі кладуть лист фільтрувального паперу, зволожують його 5 мл водного екстракту витяжки та висаджують по 50 насінин цибулі. Дослід має бути представлений у трьох повторюваностях. Через кожні шість годин проводять провітрювання, відкриваючи на кілька хвилин чашки. Дослід триває 72 години при температурі 25°C в умовах термостату. В якості контролю використовується дистильована вода.

При появі первинних корінців цибулі довжиною 7-9 мм, їх фіксують в ацетоалкоголі протягом 1 години, а потім переносять у етанол 70° концентрації для зберігання. Фіксатор готують шляхом змішування 96° етилового спирту і крижаної оцтової кислоти у співвідношенні 3:1 безпосередньо перед фіксацією біооб'єктів.

Фарбування корінців проводять реактивом Шиффа за Фьольгеном з попереднім гідролізом у 0,1 н соляній кислоті при температурі 60°C. Після фарбування біопроби промивають у трьох порціях сірчаних вод і закріплюють фарбування в проточній воді. Пофарбовані корінці зберігають у 70° етиловому спирті. Цитологічні препарати готують з 1 мм кінчиків корінців (меристем), поміщених у краплю 45%-ної оцтової кислоти. Препарат накривають покривним склом, роздавлюють меристеми до отримання моношару клітин. Краї покривного скла заливають розплавленим парафіном. Приготовлений таким чином препарат використовують для мікроскопічного аналізу на мікроскопі.

При дослідженні структурних мутацій хромосом у клітинах використовували тільки препарати, що відповідали наступним вимогам: аналізували одношарові цілі клітини з неушкодженими клітинними стінками; хромосоми всередині клітини були добре пофарбованими та лежали на тлі прозорої цитоплазми.

Під час поділу клітина є дуже чутливою до дії різних факторів навколишнього середовища, тому протягом мітозу можлива поява численних порушень: фрагментації, злипання і відставання хромосом, утворення мостів. Крім того, окремі забруднювачі можуть блокувати процес клітинного поділу та викликати порушення генетичного матеріалу на ранніх стадіях мітозу, а саме у профазі та метафазі. Також незначні порушення можуть виправлятися системами репарації ДНК, що в свою чергу призводить до зменшення кількості хромосомних аберацій у ана- та телофазі. Тому для комплексного врахування мутагенної дії всіх забруднювачів, присутніх у досліджуваних середовищах, необхідно додатково враховувати наявність аберацій у метафазі.

На цитологічних препаратах враховують усі фігури мітозу: профазу, метафазу, анафазу, телофазу, що зустрічаються серед 5-6 тис. переглянутих меристематичних клітин.

Загальну абераційність хромосом визначають у відсотках за формулою:

$$A^{\%} = \frac{G}{m} \cdot 100, \% \quad (1)$$

де G - кількість абераційних клітин;

m - кількість клітин, що діляться.

Потім встановлюють кратність перевищення частоти зустрічальності хромосомних аберацій у досліді у відношенні до контролю і у відповідності до класифікації, що наведена у таблиці 1, встановлюють клас небезпеки промислових відходів за показником мутагенності [2].

Таблиця 1

Критерії віднесення відходів до класу небезпеки

Показник небезпеки	Клас небезпеки			
	I	II	III	IV
	Надзвичайно небезпечні	Високо небезпечні	Помірно небезпечні	Мало небезпечні
Мутагенна активність (кратність перевищення дослід/контроль)	>15	11-15	4-10	2-3

У випадку, якщо загибель насінин цибулі у досліді з нерозбавленою витяжкою з відходів становить 10% і більше, необхідно провести додаткові дослідження шляхом розведення витяжки чистою водою. Для цього готують ряд розведень витяжки, використовуючи коефіцієнт розведення від 1:1 до 1:20 у залежності від токсичності промислових відходів. На зразках розведеної витяжки пророщують насіння *Allium* сера вищевказаним чином та обраховують кількість хромосомних патологій у клітинах біоіндикатора. Після цього будують графік залежності аберантності хромосом від кратності розведення витяжки, який дозволяє шляхом апроксимації результатів експерименту встановити ступень мутагенності нерозведеного екстракту відходів, та визначити клас їх небезпеки за цим показником.

Таким чином, даний спосіб дозволяє уніфікувати процедуру визначення мутагенних властивостей промислових відходів та порядок їх віднесення до класів екологічної небезпеки, що у свою чергу, дозволить попередити порушення гігієнічних вимог щодо поводження з небезпечними відходами та підвищить екологічну безпеку у цій сфері.

Приклад. У якості об'єкта дослідження обрали відходи Дніпропетровського сміттєспалювального заводу - золу-унос.

Приготувавши водний екстракт з золи, провели попереднє тестування, яке показало 100% загибель насінин біоіндикатора. Тому з водної витяжки були приготовлені варіанти розведення з коефіцієнтом 5; 10; 15 і 20 та проведено дослідження мутагенності золи вищевказаним чином.

Результати дослідів представлені у таблиці 2 та на Фіг., з яких видно, що залежність ступеню мутагенності цих відходів A^x від кратності розбавлення водного екстракту ER має лінійний характер та адекватно описується рівнянням виду $A^x(ER) = -0,43 \cdot ER + 23,19$ ($R^2 = 0,98$).

Отримана модель дозволяє встановити ступінь мутагенності нерозбавленої витяжки із золи-унос - $A^x(0) = 3,19\%$, що перевищує частоту зустрічальності аберантних фігур мітозу у контролі у 13,5 разів. Таким чином, за даним показником зола-унос відноситься до II класу небезпеки - високо небезпечні відходи та має зберігатися та транспортуватися тільки у закритій тарі, що запобігає проникненню цих відходів у довкілля.

Таблиця 2

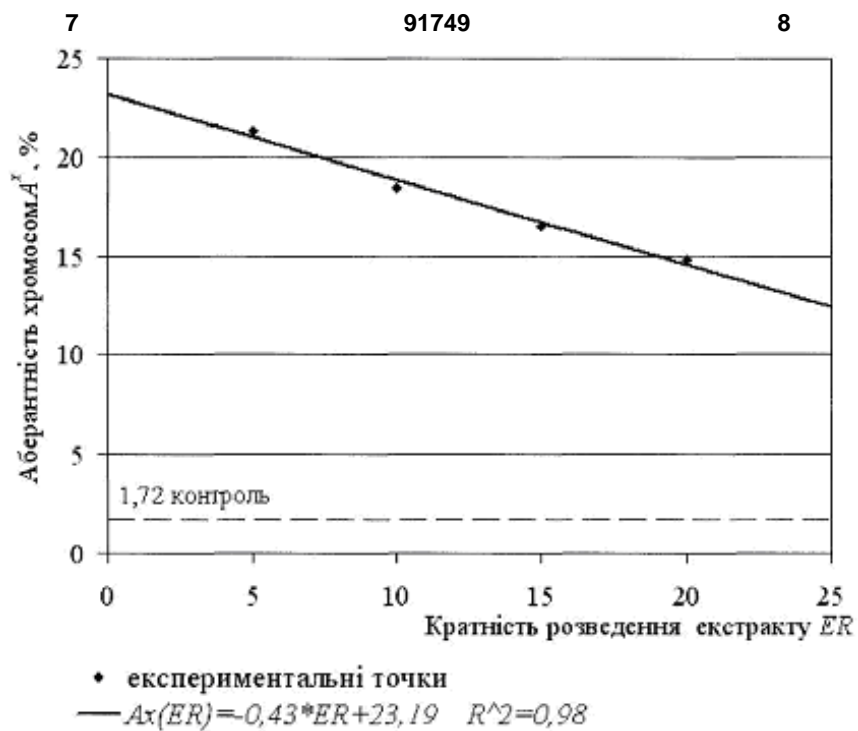
Результати тесту
на визначення класу небезпеки золи-унос за показником мутагенності на тест-культури *Allium* сера

Варіант	Кратність розведення, разів	Частота зустрічальності аберантних фігур мітозу, %	t_{st}
Варіант 1	5	21,39±3,12	10,60
Варіант 2	10	18,44±2,31	10,16
Варіант 3	15	16,52±2,48	9,06
Варіант 4	20	14,83±2,31	8,39
Контроль	-	1,72±0,46	-

Джерела інформації:

1. НД №3897-85. Предельное количество токсичных промышленных отходов, допускаемое для складирования в накопителях (на полигонах) твердых бытовых отходов. - Утв. 30.05.85.

2. СП 2.1.7.1386-03. Санитарные правила по определению класса опасности токсичных отходов производства и потребления. Введ. 16.06.03.



Фіг.