

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБЩЕОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ГОРОДА МОСКВЫ «ШКОЛА № 1575»

**СОЗДАНИЕ МЕТОДИКИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА
ИЗУЧЕНИЯ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ПОЧВ
НА ОСНОВЕ «*Allium test*».**

Автор работы:

Юрьев Даниил Андреевич 11 кл.
ГБОУ Школа № 1575

Руководитель:

Навроцкая Зоя Николаевна
Преподаватель биологии.
ГБОУ Школа № 1575

Москва, 2022г.

Введение.

К 21-ому столетию все острее становится проблема загрязнения почв радиоактивными и канцерогенными веществами. Принимая этот факт к расчёту, становится очень важной возможностью эффективно определять генотоксичность почв. Генотоксичность почв — способность загрязненной почвы влиять на структурно-функциональное состояние генетического аппарата почвенной биоты, включая микроорганизмы, растительность и почвенную фауну. Химические вещества способные вызывать такого рода мутации объединяют в отдельную группу (канцерогены). Эта группа включает в себя широкий спектр веществ, таких как:

- ✓ Полициклические ароматические углеводороды ПАУ, представителем которых является 3,4-бензпирен — образуются при жарке и при приготовлении пищи на вертеле, а также поступают в окружающую среду как побочные продукты ряда технологических процессов. Их много в табачном дыме. Продукты пиролиза белков образуются при длительном нагреве мяса в духовке. Найдены также в продуктах пиролиза древесины и некоторых других органических продуктов.
- ✓ Пероксиды — образуются в прогорклых жирах и при сильном нагреве растительных масел.
- ✓ Диоксины — хлорорганические соединения, образующиеся при сжигании бытового мусора.
- ✓ Винилхлорид — вещество является чрезвычайно огнеопасным и взрывоопасным. Продукты его горения токсичны. Оказывает на организм человека канцерогенное, мутагенное и тератогенное действие.
- ✓ Бензол и его производные — токсичное и канцерогенное вещество. Пары бензола могут проникать через неповрежденную кожу. Если организм человека подвергается длительному воздействию бензола в

малых концентрациях, последствия также могут быть очень серьёзными. В этом случае хроническое отравление бензолом может стать причиной лейкемии (рака крови) и анемии (недостатка гемоглобина в крови).

- ✓ Формальдегид — токсичен и оказывает сильное отрицательное воздействие на центральную нервную систему. Формальдегид внесён в список канцерогенных веществ ГН 1.1.725-98 в разделе «вероятно канцерогенные для человека», при этом доказана его канцерогенность для животных.
- ✓ Кадмий — кумулятивный яд (способен накапливаться в организме до опасных для здоровья количеств). Канцерогенен. Соединения кадмия ядовиты.
- ✓ Мышьяк — ядовитое и канцерогенное вещество. Все соединения мышьяка также ядовиты.
- ✓ Шестивалентный хром — является признанным канцерогеном при вдыхании.
- ✓ Никель — соединения никеля токсичны, канцерогенны, аллергенны.
- ✓ Асбест — среди канцерогенов стоит особняком. Канцерогенность асбеста, напротив, выражается в том, что живой организм не в состоянии избавиться от микроскопических, химически крайне инертных, частиц этого вещества.

Также хромосомные aberrации способны вызывать радионуклиды естественного и техногенного происхождения такие как:

^{137}Cs , ^{131}I , ^{140}Ba , ^{89}Sr , (239-241 изотопы Pu). Изотопы техногенного происхождения образуются при работе ядерных реакторов и подрывах атомных боеприпасов.

Радионуклиды естественного происхождения находятся в почве, и составляют немалую часть среднегодовой дозы радиации для человека, но в некоторых случаях они могут накапливаться в опасных количествах. Они в большей степени представлены: ^{226}Ra , ^{232}Th , ^{238}U , ^{40}K .

Канцерогенные вещества и радионуклиды своим действием способны вызывать злокачественные опухоли, то есть рак. И эта проблема касается не только одного конкретного человека, но всего человечества в целом.

Эти вещества опасны не только для человека, но и для самой жизни, они способны при помощи, упомянутых выше механизмов разрушать целые экосистемы, что крайне пагубно влияет на биосферу.

В таких условиях важнейшей частью исследования почв для прогноза экологических последствий, планируемой хозяйственной деятельности становится возможность быстро и эффективно проверить опасность данных почв, что и привлекло меня к идее создания методики работоспособного, дешёвого в проведении теста. Подходящими для этого возможностями и характеристиками обладает вышеназванный Allium-тест. Его главными плюсами можно назвать - простоту проведения теста, дешевизну, признание ВОЗ.

Цели и задачи.

Цель: Разработка и апробация эко-бокса для оценки генотоксичности почв на основе Allium test, с проведением тестовых экспериментов на примере почв Петровского парка.

Задачи:

- 1) Изучить общеизвестные методы оценки генотоксичности почв и провести их сравнительный анализ.
- 2) Выявить недостатки современных методик.
- 3) Адаптировать методику проведения биотестирования почв.
- 4) Провести полевую работу с усовершенствованной методикой на территории Петровского парка с методикой из книги Прохорова И.М.
- 5) Провести сравнительный анализ результатов разработанной методики с результатами, полученными в ходе применения методики из книги Прохорова И.М. по Р критерию Стьюдента.

6) Разработать эко-бокс для оценки генотоксичности почв на основе модифицированного в ходе работы *Allium test*.

7) Протестировать эко бокс на собственной даче, и на дачах одноклассников, а также почвы на территории (д. Соларьево, Руменцево).

8) Проанализировать данные, полученные при анализе 5 дачных участков.

Обзор литературы

Удобство «*Allium*-теста» определяется коротким жизненным циклом и экономичностью тест-культуры. Продолжительность клеточного цикла составляет примерно 14-17,8 часа. Для *Allium cepa* продолжительность митоза в разных тканях корня одинакова и не меняется в зависимости от длины корня. Время фиксации не оказывает воздействия на соотношение различных фаз митоза. Как отмечают авторы, понятие «тест-система» подразумевает ограниченную в пространстве совокупность чувствительных биологических элементов, а понятия «тест- объект» и «тест-культура» применяются для обозначения основных элементов, составляющих тест-систему. С помощью *Allium*-теста возможно регистрировать различные типы хромосомных мутаций, индуцируемых как прямыми мутагенами, так и промутагенами, в связи с особенностью приобретать в процессе метаболизма генетическую активность.

Фиксация биоматериала проводится фиксатором Кларка. Он состоит из 96-процентного этилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1. Приготовление проводится строго в вытяжном шкафу. Флаконы для фиксации должны плотно закрываться, поэтому для этой цели удобно использовать пенициллиновые флаконы. От корней отрезается лезвием 1 см - точка роста. Сами флаконы ставят в холодильник и держат при 3-4 °С. При данных условиях материал можно хранить до 2 недель. Для более длительного хранения материал требуется поместить в 70%

этиловый спирт. Согласно методике, материал нужно промыть 2-3 раза 70% этиловым спиртом. Для этого фиксатор выливают и вместо него наливают такой же объем этилового спирта. Спустя 20-30 минут старый спирт заменяют новой порцией. В последней порции спирта биоматериал может храниться до 1 года. При помощи микроскопа с увеличением 200-400 раз (Veber 160x-200x LED) производится подсчёт клеток с аберрациями.

Оценка экологических рисков

Благодаря данному проекту люди, нуждающиеся в данном методе, узнают не только о детектировании генотоксичности почв на основе *Allium test-a*, но также узнают много нового и об опасности канцерогенного воздействия и о техногенных авариях, как причинах загрязнения среды.

Это позволит сильно снизить экологический риск того, что кто-нибудь из них совершит неправильный поступок, связанный не столько с канцерогенными веществами, но и другими загрязнителями. Ведь вряд ли в обычной жизни в городе вы столкнетесь с большими объёмами данных веществ, но как-бы то ни было, каждый день, выходя на улицу в крупном городе, мы с большой долей вероятности можем подвергнуться воздействию канцерогенных веществ. Это может быть огромный спектр соединений, которые выделяются в ходе работы двигателей внутреннего сгорания, работы мусоросжигательных заводов и многого другого. Это привлечёт внимание людей к рискам сопутствующим работам с таким типом веществ, что в будущем позволит сократить риск выброса еще большего количества вредных веществ.

Материалы и методы

С самого начала этой работы было понятно, что количество той информации, которую придётся обработать и проанализировать огромно. В первой части своей работы я пользовался информацией, полученной из книг и методических работ по теме: «Детектирование генотоксичности почв на основе «Allium test». На основе, полученной из этих источников информации, мною был разработан план проведения полевого исследования, с целью лично ознакомиться и изучить на практике все тонкости использования данного метода детектирования очагов загрязнения канцерогенными веществами.

В ходе работы над данным проектом был произведён забор проб почвы на анализ, для проверки эффективности данного теста.

Схема методики, которой я пользовался в своем проекте:

1. Проведение лабораторной работы, сопряжённой с проведением теста.
2. Создание на основе проведённого опыта методики и рекомендаций по её проведению на основе вышеуказанного теста.

Экспериментальная часть.

После забора проб почв производится проращивание семян Allium сера, то есть лука обыкновенного. Через неделю производится отделение фрагмента корешка длиной 1 см- точка роста. Фиксация биоматериала проводится фиксатором Кларка. Он состоит из 96% этилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1. Флаконы для фиксации должны плотно закрываться, поэтому для этой цели удобно использовать

пенициллиновые флаконы. Сами флаконы ставят в холодильник и держат при 3-4 °С. При данных условиях материал можно хранить до 2 недель. Для более длительного хранения материал требуется поместить в 70% этиловый спирт. Согласно методике, материал нужно промыть 2-3 раза 70% этиловым спиртом. Для этого фиксатор выливают и вместо него наливают такой же объем 96% этилового спирта. Спустя 20-30 минут старый спирт заменяют новой порцией. В последней порции спирта биоматериал может храниться до 1 года. Для подсчёта аберрантных клеток зафиксированный и окрашенный фрагмент корня помещается на предметное стекло и под микроскоп с увеличением в 200-400 раз (Veber 160x-200x LED и др.). После чего производится визуальный подсчёт аберрантных клеток в 5-ти повторностях.

Результаты экспериментальной части.

Во время эксперимента в Петровском парке, расположенном в САО г. Москвы, получены данные по определению генотоксичности почв из проб, взятых на разном удалении от трассы, при помощи методики из книги Прохорова И.М. и моей.

Сравнение двух методик по Р критерию Стьюдента, результаты которого были равны: 0,5; 0,11; 0,21; 0,21; 0,21 - для 5-ти повторений. Но в отличие от методик из книги Прохорова И.М. моя методика требует на 2 часа меньше времени, а также общедоступные расходники.

По окончанию работ был разработан эко-бокс, содержащий в себе: инструкцию на бумажном носителе, семена лука репчатого (либо других культур с высокой всхожестью), фиксатор Кларка (или фукорцин), предметное стекло и микроскоп с увеличением в 200-400 раз (Veber 160x-200x LED и др.). Проведённые испытания эко боксов на 4 дачных участках не показали серьёзных значений количества аберрантных клеток, оставаясь в диапазоне от 2-3 единиц в среднем. Это говорит о низком уровне

загрязнения почв или его отсутствие на территории объектов проведения испытаний экобокса.

Обсуждение результатов.

В результате проведенной работы был получен ряд данных практического характера по использованию данного метода вне лабораторных условий. Это позволило создать максимально полную методологию для данного теста, что впоследствии должно упростить понимание способов работы при использовании данного теста. Сам метод представляет собой документ содержащий в себе весь ход применения данного теста, а также фото и вырезки моего собственного анализа почв, для наглядности.

Проектные рекомендации.

На основе разработанной и апробированной в полевых условиях методики создан эко-бокс содержащий в себе: инструкцию на бумажном носителе, семена лука репчатого (либо других культур с высокой всхожестью), фиксатор Кларка (или фукорцин), предметное стекло и микроскоп с увеличением 200-400 раз (Veber 160x-200x LED и др.).

Выводы.

1) Были изучены и апробированы классические методики (Прохорова И.М. Растительные тест-системы для оценки мутагенов [1]; Тарасов В. А. Принципы количественной оценки генетической опасности химических загрязнителей биосферы) [2].

2) Методика из книги Прохорова И.М.[1] оказалась требовательной к условиям проведения и проводится на протяжении большего количества времени в отличие от созданной мною методикой.

3) Удалось создать простую в применении, но при этом точную методику.

4) На территории Петровского парка в ходе экспериментов были получены данные геннотоксичности почв при помощи двух методик.

5) Данные двух методик были сравнены по Р критерию Стьюдента результаты, которого были равны: 0,5; 0,11; 0,21; 0,21; 0,21. для 5-ти повторностей.

6) Был разработан эко бокс для оценки геннотоксичности почв.

7) При помощи эко-бокса были проанализированы почвы моей дачи (Солнечногорский район), а также почвы на территории (д. Соларьево, Руменцево).

8) По итогу эксперимента на территориях дачных участков не было обнаружено геннотоксичности.

Благодарности.

За помощь в создании данного проекта хочу поблагодарить:

1. Столбову Валерию Владимировну, К.б.н., ст.препод. кафедры радиоэкологии и экотоксикологии Факультета почвоведения МГУ им. М.И. Ломоносова.
2. Гурееву Марию Владимировну, главного тренера Сборной Москвы по экологии.
3. Навроцкую Зою Николаевну, моего руководителя класса и учителя биологии.

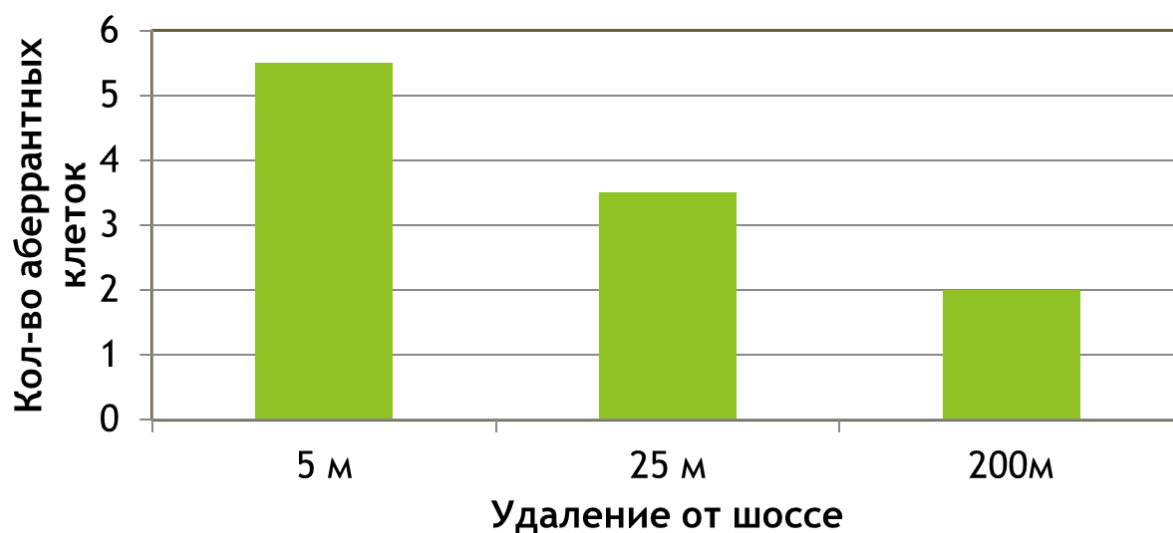
Литература:

1. Прохорова И.М. Растительные тест-системы для оценки мутагенов / Сост. И.М. Прохорова. — Ярославль: ЯрГУ, 1988.

2. Тарасов В. А. Принципы количественной оценки генетической опасности химических загрязнителей биосферы // Мутагены и канцерогены в окружающей среде: новые подходы к оценке риска для здоровья. — СПб, 1998.

Приложение:

Таблица с данными, полученными по итогу работы:



Фотографии, иллюстрирующие ход работы.

Место сбора проб почв в Петровском парке.



Место сбора проб на даче.



Процесс сбора проб.



Ещё одна точка сбора в парке.



Пророщенные, готовые к посадке в пробы почв семена.



Высаженные в пробы почв семена.



Семечко зафиксированное в фиксаторе Кларка.



Микроскопия зафиксированного семечка и последующий поиск aberrantных клеток.

