ВИЗНАЧЕННЯ ТОКСИЧНОГО ВПЛИВУ ГЕРБІЦИДІВ НА ТЕСТ-ОРГАНІЗМИ У ВОДІ

Верголяс М.Р.

Приватний вищий навчальний заклад
«Міжнародна академія екології та медицини»
Харківське шосе, 121, 02000, м. Київ
vergolyas@meta.ua

Проведено оцінку еколого-токсикологічного впливу гербіцидів методом біотестування. Досліджуваними гербіцидами були обрано гліфосат – найбільш поширений гербіцид у світі, та клетодим – хлороорганічний гербіцид селективної дії. Метод полягає у визначенні дії токсикантів на спеціально вибрані організми в стандартних умовах з реєстрацією змін на поведінкових, фізіологічних, клітинному і субклітинному рівнях. Особливу увагу приділено оцінці ризику для здоров'я людини тих факторів і речовин, токсичність і цитотоксичність, яких виявляються за допомогою біомаркерів рослинних і тваринних клітин. Для оцінки негативного впливу агрохімікатів на агроекосистему сучасний рівень досліджень передбачає широке застосування методів біотестування, тобто використання відповідної реакції організму на вплив факторів середовища. Цей підхід до оцінки екологічного стану агроекосистеми є найоб'єктивнішим. Він базується на тому, що реалізація процесів, які відбуваються в організмі, зумовлена специфікою як організму, так і навколишнього середовища. Організм залежить від середовища передусім через характер його ресурсів і факторів, які впливають на метаболізм. Забруднення гербіцидами має глобальний характер, оскільки вони передаються трофічними ланцюгами від рослин до тварин, у тому числі і до людини. Отримані дані свідчать про високу токсичність гербіцидів у воді. Для оцінки водних зразків з гербіцидами при використанні тест-об'єкту рослинного походження *Allium cepa* відмічене інгібування ростових процесів та виявлена аномалія ядер у всіх концентраціях клетодиму, навіть на рівні ГДК. На організменному рівні *Ceriodaphnia affinis*, *Hydra attenuate* і на рибках *Poecilia reticulata*, *Danio rerio* отримали дані гострої та хронічної токсичності від 10% до 100% на рівні ГДК. Використання класичних тест-об'єктів при дослідженні токсичності води з гербіцидами є більш перспективним, зручним, доступним, експресивним та інформативним.

Ключові слова: гербіциди, токсичність, цитотоксичність, вода, тест-організми, біотестування.

Determination of the toxic effects of herbicides on test organisms in water. Vergolyas M. An estimation of ecotoxicological influence of herbicides by biotesting method is conducted. Investigated herbicides were selected glyphosate - the most common herbicide in the world, and clethodim – a chloro-organic herbicide of selective action. The method consists in determining the action of toxicants on specially selected organisms under standard conditions with the registration of changes at behavioral, physiological, cellular and subcellular levels. Particular attention is paid to assessing the risk to human health of those factors and substances whose toxicity and cytotoxicity are detected using biomarkers of plant and animal cells. To assess the negative impact of agrochemicals on the agroecosystem, the current level of research involves widespread use of biotesting methods, that is, the use of an appropriate reaction of the organism to the influence of environmental factors. This approach to assessing the ecological state of the agro ecosystem is the most objective. It is based on the fact that the implementation of processes that occur in the body, due to the specifics of both the organism and the environment. The organism depends on the environment, primarily because of the nature of its resources and factors that affect metabolism. Contamination with herbicides is global because they are transmitted by trophic chains from plants to animals, including humans. The obtained data testify to the high toxicity of herbicides in water. In order to evaluate the water samples with herbicides, using the test-object of plant *Allium cepa*, inhibition of growth processes was noted and nuclear abnormalities were detected in all concentrations of clethodim, even at the MAC level. At the organic level *Ceriodaphnia affinis*, *Hydra attenuate*, and *Poecilia reticulata*, *Danio rerio* fish received acute and chronic toxicity data of 10% to 100% at MAC level. The use of classical test objects in the study of water toxicity with herbicides is more promising, convenient, accessible, expressive and informative. **Key words:** herbicides, toxicity, cytotoxicity, water, test organisms, biotesting.

Постанова проблеми. На сьогодні людство використовує велику кількість різноманітних гербіцидів у сільському господарстві. Більшість гербіцидів вимиваються у водойми з поверхневим стоком талих, дощових та ґрунтових вод, зливом з сільськогосподарських угідь та колекторно-дренажні води. Внаслідок потрапляння у водойми, гербіциди порушують гомеостаз екосистеми (пригнічується фотосинтез та синтез білку, порушуються процес обміну через мембрани тощо), спричиняючи загибель живих організмів. Це виявляється у зменшенні чисельності видів [1, с. 2].

Гербіциди можуть мати прямий негативний вплив на продуцентів, але не прямий вплив на травоїдних тварин або хижаків, представляючи небезпеку як для людей, так і для тварин. Окрім того, вони являють собою кумулятивні отрути, тобто, токсичність їх дії залежить не тільки від концентрації, а й від тривалості дії. Чим вище трофічний рівень, тим в більшій мірі на ньому концентруються гербіциди [2]. Тому, нераціональне використання пестицидів стає причиною гострих отруєнь від 3,5 до 5 млн осіб щорічно (США, 2010–2014 роки).

Надійний контроль якості довкілля тільки хімічними методами практично неможливий, тому що ці методи не завжди чутливі і не дозволяють оцінювати токсичність водойми в цілому, до того ж присутність одних речовин заважає визначенню інших, а токсичні сполуки у воді можуть змінюватися, стаючи більш токсичними [3]. Актуальність роботи обумовлена появою безлічі небезпечних гербіцидів в Україні і необхідність визначення їх наявності у водоймах стоїть дуже гостро.

Постановка завдання. Виникає необхідність у розробці експрес-тестування для їх швидкого виявлення у водоймах, що полягає у інтегральній оцінці ступеня токсичності середовища. Таку інформацію можуть забезпечити методи біотестування. Оскільки вона може бути використано як для оцінки токсичності забруднених вод, так і для контролю токсичності стічних вод, цей метод знаходить широке застосування в токсикологічному контролі. Для екоотоксикологічної діагностики питного водопостачання дедалі частіше застосовують біотестування, де за допомогою набору тесторганізмів та їхніх клітин оцінюють різні типи токсичності водного середовища. Біотестування, поєднане з хімічним і мікробіологічними методами, дає найбільш об'єктивну характеристику якості питних вод [4; 5].

Біотестування – це експериментальне визначення, оцінка дослідним шляхом впливу факторів (фізичних, хімічних, фізико-хімічних) або групи шкідливих факторів на живі організми шляхом реєстрації змін того чи іншого біологічного показника (фізіологічного, біохімічного, цитогенетичного та ін.), що спостерігається в піддослідному тест-об'єкті (індикаторі) порівняно з контрольним у чітко заданих (тобто стандартних, лабораторних) умовах [6; 7].

Для оцінки негативного впливу агрохімікатів на агро екосистему сучасний рівень досліджень передбачає широке застосування методів біотестування, тобто використання відповідної реакції організму на вплив факторів середовища. Цей підхід до оцінки екологічного стану агро екосистеми є найоб'єктивнішим. Він базується на тому, що реалізація процесів, які відбуваються в організмі, зумовлена специфікою як організму, так і навколишнього середовища. Організм залежить від середовища передусім через характер його ресурсів і факторів, які впливають на метаболізм [4–7].

У свою чергу, про стан середовища можна судити за кількістю або інтенсивністю розвитку різних видів, популяцій і цілих угруповань певних організмів. Чутливішими до впливу факторів середовища є види з низьким ступенем толерантності, які належать до кстенобіонтів, тобто організмів з вузьким діапазоном життєвих можливостей при зміні певного фактора середовища, у тому числі антропогенного характеру. Ю. Одум (1976 р.) підкреслював, що організм часто перебуває під впливом не одного, а кількох лімітуючих факторів середовища і саме тому

методи біоіндикації дають змогу врахувати не лише адитивні ефекти (як це відбувається при нормуванні впливу за рівнем ГДК), а і сумарні ефекти, завжди присутні у природних екосистемах.

Метою роботи було дослідження токсичного впливу розчинів гербіцидів гліфосата та клетодима за допомогою методів біотестування.

Матеріали та методи досліджень. Для вивчення різних концентрацій гербіцидів гліфосата та клетодима за допомогою методів біотестування були взяті три модельних зразка води. Гліфосат 0,01 мг/дм³; 0,02 мг/дм³; 0,03 мг/дм³ (ГДК у воді 0,02 мг/дм³) та клетодим 0,001 мг/дм³; 0,002 мг/дм³; 0,003 мг/дм³ (ГДК у воді 0,002 мг/дм³).

Гліфосат – контактний гербіцид, має частково системну дію. Передбачається, що гліфосатом пригнічується біосинтез фенілаланіну, інгибується хлорізатмутаза або префенатдегідратаза. При впливі на бур'янисту рослинність гербіцид всмоктується через листя, пересувається по всій рослині. Запобігання речовиною синтезу амінокислот призводить до загибелі рослин. Залишки препарату можуть бути змиті опадами з рослин в ґрунт. У ґрунті гліфосат, залежно від умов навколишнього середовища, стійкий до дії сонячного світла, хімічному руйнуванню, у воді препарат стійкий. В лабораторних і польових умовах не було встановлено здатності гліфосату накопичуватися в ракоподібних і рибі.

Велика частина гербіциду, яка виявляється в поверхневих водних джерелах, з'явилася в результаті змиву з поверхні обробленої рослинності, знесення при лісогосподарському або сільськогосподарському застосуванні, а також ненавмисної або умисним обробки гліфосатом водних джерел для боротьби з водними бур'янами. Гербіцид може переноситися водним потоком вниз за течією від місця обробки на кілька кілометрів [8].

Клетодим – селективний гербіцид системної дії для знищення однорічних та багаторічних злакових бур'янів. Препарат поглинається бур'янами через стебла та листя накопичуючись в точках росту блокуючи процеси синтезу ліпідів. Видимі симптоми з'являються через 3-5 днів після обробки, а повне відмирання настає через 10-15 днів.

У ґрунті препарат практично відразу руйнується Т50 – через 1-3 доби. В анаеробних умовах період напіврозкладу може зростати до 240 діб. Зв'язування речовини з ґрунтом незначне, внаслідок чого гербіцид може легко з неї вимиватися [8].

Контрольну воду готували в лабораторних умовах згідно з рекомендаціями ДСТУ 4174: 2003.

Для виявлення токсичності гербіцидів на організменному рівні, було використано наступні тест-об'єкти: цибуля ріпчаста (*Allium cepa*); періодафнія (*Ceriodaphnia affinis*); гідра (*Hydra attenuata*); риби (гупі (*Poecilia reticulata*) та даніо репіо (*Danio rerio*).

Оцінка якості водних зразків з гербіцидами за допомогою рослинного тест-об'єкту цибулі ріп-

частої враховувала організменний і клітинний рівень – морфометричні та морфологічні показники. На кожний дослідний розчин із різними концентраціями гербіцидів поміщалися по 10 цибулини на 7 діб при температурі 24° С. Для проведення досліджень використовували одну з модифікацій *Allium*-тесту. Повторюваність експериментів двократна.

Для фіксації і подальшого приготування цитологічних препаратів відбирали коріння які проростали у дослідних розчинах. Критерій довжини корінців обумовлений необхідністю фіксації саме перших мітозів, з метою виключення дії систем репарації у подальших поділах клітин кореневої меристеми та елімінації більшості фрагментів та окремих аберантних клітин. Фіксацію корінців проводили протягом доби у розчині Кларка, який являє собою охолоджені $C_2H_5OH:CH_3COOH$ у співвідношенні 3:1. Приготування тимчасових давлених цитологічних препаратів з кореневої меристеми цибулі проводили за загальноновживаною методикою [9; 10].

Аналіз цитологічних препаратів проводили за допомогою світлового мікроскопа марки „Carl Zeiss”, при збільшенні об’єктива 40. Для аналізу мітотичного індексу в полі зору мікроскопа серед загальної кількості клітин (3000) підраховували кількість клітин на різних стадіях мітозу. Кількість

мікроядер та подвійних ядер визначали окремо по корінцям на кожні 500 клітин. З кожного препарату було проаналізовано 2,5-3 тис. клітин.

На заключному етапі досліджень проводили аналіз та статистичну обробку результатів за допомогою стандартного пакету програм XL (для Windows XP) та STATISTICA '99 Edition Version 5.5 (StatSoft. Inc., 1984-1999). Отримані результати наведено в таблиці 1.

За отриманими результатами виявили дозозалежне пригнічення схожості цибулі ріпчастої *Allium* сера внаслідок впливу розчинів гліфосату і клетодиму різних концентрацій, при цьому клетодим проявляв помітно більшу дозозалежну токсичну дію на схожість цибулі ніж гліфосат.

Спостерігали закономірне зменшення кількості мітотичних клітин у кореневій меристемі цибулі ріпчастої *Allium* сера культивованого на розчинах гліфосату і клетодиму різних концентрацій в порівнянні з контролем. Також виявляли мікроядра та подвійні ядра в розчинах клетодиму.

Отримані результати свідчать про цитотоксичну дію гліфосату та цито-генотоксичну дію клетодиму на клітини кореневої меристеми цибулі *Allium* сера.

Для визначення токсичності різних концентрацій гербіцидів гліфосата та клетодима на орга-

Таблиця 1

**Вплив гліфосату і клетодиму в різних концентраціях на кореневі системи
цибулі ріпчастої *Allium* сера**

Концентрація гербіциду	Довжина корінців (мм)	Маса корінців (г)	МІ	МЯ%	2Я%
Контроль, n=10	37,91	0,52	192	0	0
Гліфосат					
0,01 мг/дм ³ , n=10	37,20 (-2%)	0,48 (-8%)	190 (-1%)	0	0
0,02 мг/дм ³ , n=10	36,71 (-3%)	0,44 (-14%)	184 (-4%)	0	0
0,03 мг/дм ³ , n=10	35,13 (-7%)	0,44 (-14%)	184 (-4%)	0	0
Клетодим					
0,001 мг/дм ³ , n=10	32,13(-15%)	0,46 (-12%)	184 (-4%)	0	1
0,002 мг/дм ³ , n=10	36,45 (-4%)	0,49 (-6%)	182 (-5%)	0	1
0,003 мг/дм ³ , n=10	36,71 (-3%)	0,48 (-8%)	175 (-9%)	2	2

МІ – мітотичний індекс, МЯ – мікроядра, 2Я – подвійні ядра.

Рис. 1. Залежність між концентрацією гліфосату 0,01 мг/дм³; 0,02 мг/дм³; 0,03 мг/дм³ (ГДК у воді 0,02 мг/дм³) та виживанням тест-організмів: церіодафнія, гідра, риби (%)

Рис. 2. Залежність між концентрацією клетодиму 0,001 мг/дм³; 0,002 мг/дм³; 0,003 мг/дм³ (ГДК у воді 0,002 мг/дм³) та виживанням тест-організмів: церіодафнія, гідра, риби (%)

нізменному рівні використовували тест-об'єкти: церіодафнія (*Ceriodaphnia affinis*); гідра (*Hydra attenuata*); риби (гупі (*Poecilia reticulata*) та даніо реріо (*Danio rerio*). Показником токсичності на рівні організму виступала смертність гідробіонтів. У кожному досліджуваній розчин гербіцидів поміщали по 10 особин і спостерігали за їх поведінкою і фізіологічним станом.

Було обрані такі ж дози гербіцидів, як і в досліді з рослинним тест-об'єктом, цибулею. Використання широкого діапазону концентрацій не дало б змогу прослідкувати чітку тест-реакцію, оскільки вже при значення ГДК деякі тест-організми показали 100% смертність. Результати представлено на рисунках 1, 2.

Під час проведення дослідження найвищу чутливість показали представники виду церіодафній, смертність яких складала 100% вже при досягненні 0,02 мг/дм³. Інші тест організми – гідри та риби показали майже схожі лінійні залежності. При концентрації гліфосату 0,03 мг/дм³ у гідр загальна токсичність складала 20%, у риб 30%.

При дослідженні водного розчину клетодиму у випадку тест-об'єктів гідр та риб отримано схожу лінійну залежність, як і при використанні гліфосату. Для риб клетодим виявився більш токсичним ніж для гідр, при концентраціях 0,002 мг/дм³ загальна токсичність для риб складала 10%, а при 0,003 мг/дм³ 20%. У гідр, які показали найвищу стійкість в розчинах гліфосату, 25% смертність наступила у концентрації 0,002 мг/дм³, при 0,003 мг/дм³ майже 40%. В даному гербіциді смертність церіодафній спостерігали при концентраціях вище ГДК, а при 0,002 мг/дм³ складала 70%. Дані результати дають змоги впевнено сказати, що їх можна застосовувати

для виявлення токсичності гербіцидів у воді.

Головні висновки. В роботі проведено оцінку еколого-токсикологічного впливу гербіцидів методом біотестування. Досліджуваними гербіцидами були обрано гліфосат – найбільш поширений гербіцид у світі, та клетодим – хлороорганічний гербіцид селективної дії.

Отримані дані свідчать про високу токсичність гербіцидів у воді. Забруднення гербіцидами має глобальний характер, оскільки вони передаються трофічними ланцюгами від рослин до тварин, у тому числі і до людини. Нераціональне використання пестицидів стає причиною гострих отруєнь від 3,5 млн. людей щороку.

В роботі для оцінку водних зразків з гербіцидами при використанні тест-об'єкту рослинного походження цибулі ріпчасті *Allium cepa* відмічене інгібування ростових процесів у обох розчинах гербіцидів та виявлена мікроядра, подвійні ядра у всіх концентраціях клетодиму, навіть на рівні ГДК. Викликає необхідність у подальших дослідженнях, адже цибуля не є цільовим бур'яном для гліфосату і не повинна була зазнати суттєвих змін.

У визначенні токсичності різних концентрацій гербіцидів гліфосата та клетодима на організменному рівні церіодафнія (*Ceriodaphnia affinis*); гідра (*Hydra attenuata*); риби (гупі (*Poecilia reticulata*) та даніо реріо (*Danio rerio*) отримали дані гострої та хронічної токсичності від 10% до 100% на рівні ГДК.

Перспективи використання результатів дослідження. Таким чином, використання класичних тест-об'єктів при дослідженні токсичності води з гербіцидами є більш перспективним, зручним, доступним, експресивним та інформативним.

Література

1. Isenrin R. Pesticide reduce the biodiversity / Richard Isenrin // Pesticides News 88, June 2010, P. 4-7.
2. Крук Л.С. Екотоксична дія пестицидів в агроценозах України як функція фізико-хімічної будови їх молекул : Автореф. дис. ... канд. с.-г. наук. К., 2001. 19 с.
3. Maya Vergolyas. Assessment of drinking water quality at the cellular level // MedCrave. Advances in Tissue Engineering and Regenerative Medicine Open Access. 2019; 5 (2), 53–55.
4. Верголяс М.Р., Трахтенберг И.М., Дмитруха, І.М. Оцінка цитотоксичної активності води з різних джерел водопостачання // Довкілля та здоров'я Киев, 2016 г.
5. Верголяс М.Р. Альтернативный метод оценки качества питьевых вод при помощи биотестирования // Актуальные проблемы транспортной медицины. 2016 г. № 4 (46), С. 159-167.
6. Dziock F. Life-history data in Bioindication Procedures / Franck Dziock // International Review of Hydrobiology 91 (4), 2006, pp. 341-364.
7. Jozwiak A. Bioindication as challenge in modern environmental protection / Anna Jozwiak, Marek Jozwiak // Ecological Chemistry and Engineering S. 2014, 21 (4), P. 577-591.
8. Логвинский В.Д. Пестициды. Современные проблемы природопользования / В.Д. Логвинский, О.П. Негрбов, Т.В. Логвинская, Воронежский государственный университет. 2010. 32 с.
9. Fiskesjo G. The Allium test as a standard in environmental monitoring // Hereditas. 1985. Vol. 102. P. 92. 112.
10. Vergolyas M.R., Lutsenko T.V., Goncharuk V.V. Cytotoxic effect of chlorophenols on cells of the root meristem of welsh onion (*Allium fistulosum* L.) seeds // Cytology and genetics. 2013. 47 (1). С. 34-38.