

БИОТЕСТИРОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ПЕСТИЦИДОВ НА КЛЕТОЧНЫХ И ОРГАНИЗМЕННЫХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ

Н.Е. Шувалова, М.Г. Сульман, Е.А. Прутенская

Тверской государственный технический университет», Тверь, Россия

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время сложно представить сельское хозяйство без средств химической защиты культурных растений, которые применяются для борьбы с насекомыми, болезнями и сорной растительностью [1]. Наибольшую опасность представляет применение гербицидов в качестве десиканта в предуборочный период [2,3]. Как результат, пестициды обнаруживаются в объектах окружающей среды, кормах, продуктах питания, в тканях животных и биоматериале людей [2]. Остаточные количества глифосата идентифицированы в сельскохозяйственных культурах на уровне от 0,7 до 33 мг/кг [3]. С целью оценки токсичности загрязняющих веществ применяют биотестирование. Достоинство биологических тест-систем – возможность в короткие сроки дать представление об опасности загрязняющих веществ для организмов и окружающей среды [4, 5].

Развитие биотестирования привело к изучению многих тест-систем на клеточном и организменном уровне и их тест-функций [5]. К основным тест-функциям относят интегральные параметры тест-объектов: выживаемость, плодовитость, рост, изменение морфологических параметров и др. Требованиями к тест-объектам являются генетическая однородность, распространенность в окружающей среде и значимость для развития экосистемы, чувствительность к загрязняющим веществам, безвредность, возможность культивирования в лабораторных условиях, отсутствие мутагенных свойств, возможность микробиотестирования [6], чувствительность к начальным экологическим изменениям и экономичность [5].

При выборе тест-объектов следует учитывать естественную среду обитания организма. Дождевые черви являются почвенными организмами, характеризующие почву как среду обитания, поэтому их активно применяют при биотестировании почв, загрязненных пестицидами при выращивании сельскохозяйственных культур, муниципальными и промышленными отходами, хозяйственно-бытовыми сточными водами. Биотестирование на червях основано на контактном и кишечном воздействии ксенобиотиков [7]. Ответная реакция определяется по выживаемости, репродуктивности и поведенческим реакциям червей на воздействие загрязняющих веществ [7 – 9]. В работе [8] показано воздействие гербицида ДНОК на дождевых червей при концентрациях от 4 до 16 г./л. Пестицид при концентрациях 4, 8 г/л воздействовал на поведенческие реакции животных, угнетая двигательную активность, повышение содержания ДНОК до 16 г./л вызывало смертность животных до 75 %. В работе [9] описаны опыты по определению токсичности гербицидов с использованием модельного вида компостного червя и энхитрейд. Так, для глифосата максимально безвредная концентрация составляет 400 мг/кг почвы, минимально вредная концентрация – 500 мг/кг.

Биотестирование с использованием рыб, дафний *D. magna* широко применяется в мировой практике с целью определения токсичности водных объектов. В работе [10] изучено хроническое воздействие гербицида Раундап в ряду поколений *D. magna* при концентрации действующего вещества от 0,02 до 2,0 мг/л. При содержании глифосата 0,2 и 2,0 мг/л отмечено угнетение репродуктивной системы, уменьшение размеров рачков и негативное воздействие на формирование пигментного комплекса, выраженное в потере интенсивности окраса особей. В ряде работ [11 – 13] исследовано воздействие пестицидов на пищеварительные ферменты рыб. Автором работы [12] показано, при увеличении содержания глифосата от 0,1 до 100 мкг/мл наблюдалось снижение активности пептидаз.

С целью определения воздействия токсикантов на отдельные органы и организм в целом широкое применение в биотестировании получили млекопитающие, как тест-объекты. При использовании экспериментальных животных возможно оценить характер поражения ткани печени при токсическом воздействии [14], влияние ксенобиотиков на показатели иммунной системы [15] и изменение биохимических и морфологических параметров крови [16, 17].

Цель работы – исследование влияния токсического действия гербицидов (клопиралида, глифосата, 2,4 – Д) на клетки простейших и на организм млекопитающих.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали простейшие *Stylonychiamytilus* в качестве тест-объектов. Культивирование стилонихий и подготовка тест-объектов описаны в статье [18].

Экспериментальные исследования провели по определению уровня токсичности следующих химических веществ: клопираллида, глифосата, 2,4–Д. В качестве источников пестицидов были использованы государственные стандартные образцы.

В эксперименте использовали модельные водные растворы гербицидов в диапазоне от 2 до 200 мг/л, которые готовили методом последовательного разведения из основного раствора. Для проведения биотестирования использовали блок луночных микроаквариумов, изготовленного из органического стекла. Суточную культуру при помощи микродозатора помещали в лунки блока. Вносимый объем питательной среды с инфузориями составлял 100 мкл. После учета количества стилонихий под микроскопом, в каждую лунку добавляли по 100 мкл гербицида определенной концентрации, в контрольную лунку добавляли 100 мкл дистиллированной воды. Для предотвращения испарения блок с лунками накрывали стеклом. Подсчет клеток простейших осуществлялся под световым микроскопом через 2, 6, 24, 72 часа, параметрами токсичности приняли изменения численности инфузورий в опыте со временем экспозиции 24 часа относительно численности клеток в начале опыта (0 часов).

В исследовании по изучению хронической токсичности были использованы лабораторные мыши. Опыт выполнен на 48 белых лабораторных мышах, 12 самцах и 36 самках в возрасте 2-х месяцев средней стандартной массой 25–30 г. Все животные были здоровы, состояние оценивали визуально. Вода подавалась из стационарных поилок круглосуточно, кормление осуществлялось раз в сутки без ограничения. Содержание животных осуществлялось в соответствии с требованиями ГОСТ 33216–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами», Приказа Министерства Здравоохранения СССР от 12 августа 1977 года № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных». Лабораторные животные содержались по схеме № 1, 2. Кормление животных осуществляли зерном овса, обработанным водными растворами глифосата с содержанием 7, 14, 28 мг/кг. Эксперимент выполняли в два этапа.

На первом этапе животные были распределены на 16 групп, и помещены в индивидуальные клетки следующим образом: четыре клетки по 3 самца, двенадцать клеток по 3 самки. Продолжительность скормливания мышей обработанным зерном при отдельном содержании составлял 1 месяц. Схема № 1 кормления и содержания животных представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Схема № 1 кормления и содержания животных в первый период исследования

№ клетки	Схема содержания животного	Схема кормления
1	Самцы	Зерно овса, необработанное препаратом
2	Самцы	Зерно овса, обработанное препаратом (7 мг/кг)
3	Самцы	Зерно овса, обработанное препаратом (14 мг/кг)
4	Самцы	Зерно овса, обработанное препаратом (28 мг/кг)
5–7	Самки	Зерно овса, необработанное препаратом
8–10	Самки	Зерно овса, обработанное препаратом (7 мг/кг)
11–13	Самки	Зерно овса, обработанное препаратом (14 мг/кг)
14–16	Самки	Зерно овса, обработанное препаратом (28 мг/кг)

На втором этапе исследования проводили формирование семей из половозрелых мышей. В индивидуальные клетки помещали 3 самки и 1 самца. Животные были распределены на 12 групп (семей), схема № 2 кормления и содержания животных представлена в таблице 2.

Для наблюдения динамики воздействия гербицида на животных по истечении 3 месяцев ½ часть лабораторных животных умерщвлялась методом декапитации, другая часть – через 5 месяцев после содержания по схеме № 2.

После завершения исследования проводили отбор крови для морфологического анализа, визуальный осмотр внутренних органов при патологоанатомическом вскрытии, взятие патологического материала для приготовления гистологических препаратов.

Таблица 2 – Схема № 2 кормления и содержания животных второго этапа

№ клетки	Схема содержания животного	Схема кормления
X(1)	1 самец, 3 самки	Зерно овса, необработанное глифосатом
X(2)	1 самец, 3 самки	Зерно овса, необработанное глифосатом
X(3)	1 самец, 3 самки	Зерно овса, необработанное глифосатом
7(1)	1 самец, 3 самки	Зерно овса с содержанием гербицида 7 мг/кг
7(2)	1 самец, 3 самки	Зерно овса с содержанием гербицида 7 мг/кг
7(3)	1 самец, 3 самки	Зерно овса с содержанием гербицида 7 мг/кг
14(1)	1 самец, 3 самки	Зерно овса с содержанием гербицида 14 мг/кг
14(2)	1 самец, 3 самки	Зерно овса с содержанием гербицида 14 мг/кг
14(3)	1 самец, 3 самки	Зерно овса с содержанием гербицида 14 мг/кг
28(1)	1 самец, 3 самки	Зерно овса с содержанием гербицида 28 мг/кг
28(2)	1 самец, 3 самки	Зерно овса с содержанием гербицида 28 мг/кг
28(3)	1 самец, 3 самки	Зерно овса с содержанием гербицида 28 мг/кг

В ходе эксперимента осуществлялся ежедневный визуальный осмотр состояния животных. Критериями хронической токсичности служили изменение поведенческих реакций, воспроизводство и жизнеспособность потомства, число павших животных и сроки их гибели, патологические изменения в тканях и органах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью определения необходимых концентраций гербицидов при биотестировании, произвели анализ наиболее часто используемых гербицидов в сельском хозяйстве, и рассчитали фактически возможное содержание действующих веществ в почве.

Гербициды могут применяться двумя способами, путем опрыскивания вегетирующих растений или применяться, как почвенные гербициды. В первом случае до 30 % гербицида попадает на вегетативную часть растения, все остальное проникает в почву. Во втором случае химическое вещество используют для обработки непосредственно почвы [19]. Расчет проводили с учетом рекомендаций к применению на основании данных регламента применения гербицидов, указанных в «Справочнике пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации 2017». Содержание действующих веществ коммерческих препаратов в почве принимали для глифосата от 219 до 292 мг/кг, 2,4 – Д от 174 до 280 мг/кг, клопиралидот 14 до 58 мг/кг.

Использование простейших при биотестировании объясняется наличием стандартных методик культивирования, возможность проверки чувствительности к токсичным веществам, генетическая однородность.

Первым этапом исследований стало изучение токсичности пестицидов на простейших и разработка метода биотестирования. Опытным путем выбрали оптимальные условия пробоподготовки гербицидов. Полное растворение стандарта происходит на водяной бане при температуре $(60 \pm 0,1)^\circ \text{C}$ в течении часа, или при температуре $(60 \pm 0,1)^\circ \text{C}$ в течении 45 минут с использованием ультразвука с рабочей частотой 35 кГц. Установлено, что ультразвуковая обработка стандартных растворов пестицидов не оказывает влияния на развитие простейших. Экспериментальным путем определили оптимальное количество клеток простейших при биотестировании. Исследование проводили при численности инфузорий в лунке от 6 до 9 шт.

В ходе проведения биотестирования установлены токсичные концентрации гербицидов, при которых происходит полная гибель клеток. Глифосат показывает высокую токсичность при концентрациях 90, 100 мг/л, 2,4 – Д и клопиралид в диапазоне от 60 до 100 мг/л. Кроме того, гербициды при различных концентрациях оказывали влияние на морфологические параметры клетки, наблюдалось большое количество особей стилонихий в 10 – 15 раз меньше, чем материнские.

Следующим этапом работы было определение хронической токсичности глифосата при биотестировании на белых мышах. Присутствие глифосата в остаточных количествах в продуктах питания и кормах для животных объясняет актуальность изучения воздействия остаточного количества гербицида на млекопитающих.

При наблюдении за лабораторными животными зарегистрированы следующие данные. Воспроизводство потомства в контрольных и опытных подгруппах животных существенно отличались. В опытных подгруппах лабораторных животных, кормление которых осуществлялось зерном овса, содержащего гербицид 7, 14 мг/кг, потомство воспроизвела одна самка в каждой подгруппе, продолжительность жизни потомства составляло от 1 до 4 дней, период до воспроизводства потомства 68 и 80 дней, с задержкой в среднем от 47 до 59 дней по сравнению с контрольной подгруппой лабораторных животных соответственно. В опытной подгруппе лабораторных животных, кормление которых осуществлялось зерном овса с содержанием гербицида 28 мг/кг, в ходе эксперимента потомство отсутствовало.

Результаты опыта показали количественное изменение форменных клеток периферической крови у опытных животных по сравнению с контрольными. Среднее уменьшение количества лейкоцитов в крови в опытных подгруппах у животных кормление, которых осуществлялось зерном с содержанием гербицида 7, 14 мг/кг, составило в среднем 30 % через 4 месяца, 60 % через 6 месяцев. У животных кормление, которых осуществлялось зерном с содержанием гербицида 28 мг/кг, составило 38 % и 73 % через 4 и 6 месяцев соответственно.

Качественные и количественные изменения эритроцитов, также наблюдались в ходе всего опыта. Увеличение концентрации гербицида в зерне приводило к уменьшению количества эритроцитов от 23 до 43 % через 4 месяца, и от 38 до 59 % через 6 месяцев. Кроме того, в крови всех опытных животных наблюдались анизоцитоз и пойкилоцитоз, которые выражались в изменениях величины и формы эритроцитов.

При патологоанатомическом исследовании лабораторных животных наибольшие изменения обнаружены в печени, тонком и толстом отделе кишечника. У всех опытных животных печень увеличена в размерах, дряблой консистенции, светло коричневого цвета. Стенки тонкого и толстого отделов кишечника серого цвета, дряблой консистенции, слизистая оболочка светло коричневого цвета, местами слущивается. Увеличение концентрации гербицида в зерне способствует более тяжелым повреждениям, в виде точечных кровоизлияний под слизистой оболочкой тонкого кишечника. Исследования гистологических препаратов печени показали расширение синусоидных капилляров, изменение размеров и формы гепатоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных можно сделать вывод, что пестициды негативно воздействуют на тест-объекты на клеточном и организменном уровнях. Разработана методика по биотестированию пестицидов с помощью стилонихий. Выявлено, что пестициды показывают высокую токсичность по отношению к инфузориям в диапазоне от 60 до 100 мг/л. Установлено, что глифосат в остаточных количествах (7, 14, 28 мг/кг) оказывает негативное воздействие на организм млекопитающих.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов А.И., Гринько А.В. Влияние гербицидов на засорённость и урожайность ярового ячменя // Известия Оренбургского государственного аграрного университета, 2014, № 6(50), с. 35–37.
2. Meriel Watts, et al.. Glyphosate, Journal of PAN, 2016.
3. Кузнецова Е.М., Чмиль В.Д., Глифосат: поведение в окружающей среде и уровни остатков. // Современные проблемы токсикологии, 2010, № 1, с. 87–94.
4. Цаценко Л.В. Оценка фитотоксичности почвы на посевах подсолнечника с помощью биотеста ряски малой (*LemnaminorL.*) // Научный журнал КубГАУ, 2010, № 59(05), с. 1–9.
5. Олькова А.С., Фокина А.И. *Daphniamagna* Straus в биотестировании природных и техногенных сред // Успехи современной биологии, 2015, Т. 135, № 4, с. 380–389.
6. Захаров И.С., Алешин И.В. Методы и средства микробиотестирования токсичности водных сред // Фундаментальная и прикладная гидрофизика, 2015, Т. 8, № 2, с. 75–95.
7. Терещенко П.В. Действие гербицидов на дождевых червей // Известия ТСХА, 1997, № 3, с. 99–107.

8. Эмирова Д.Э., Баличиева Д.В. Биотестирование острой токсичности препарата ДНОК с использованием дождевых червей // Ученые записки Таврического национального университета имени В.И. Вернадского, 2011, Т. 24, № 1(63), с. 159–163.
9. Ганин Г.Н. Биотестирование некоторых ксенобиотиков почвенными олигохетами. // Агрохимия, 2008, № 11, с. 79–85.
10. Панченкова Г.А. Исследование хронической токсичности гербицида Раундап в ряду поколений *Daphnia magna* // Токсикологический вестник, 2007, № 5, с. 14–17.
11. Голованова И.Л., Аминов А.И. Влияние некоторых экологических факторов на чувствительность гликозидаз рыб к действию гербицида Раундап *in vitro* // Труды Карельского научного центра РАН, 2016, № 12, с. 96–105.
12. Кузьмина В.В., Тарлева А.Ф., Шептицкий В.А. Влияние гербицида Раундап на активность пептидаз в кишечнике у рыб разных видов // Вопросы ихтиологии, 2017, Т. 57, № 5, с. 607–613.
13. Голованова И.Л., et al.. Влияние гербицида Раундап на активность гликозидаз в кишечнике молоди теплолюбивых видов рыб в зависимости от температуры акклимации // Вестник АГТУ, 2015, № 2, с. 90–97.
14. Муфазалова Н.А., et al.. Эффективность применения тактивина, миелопида и токоферола для коррекции иммунотоксических эффектов гербицида 2,4 – ДА // Башкирский экологический вестник, 2010, № 1, 14–15.
15. Чеснокова Л.А., Михайлова И.В., Карманова Д.С. Влияние органических и неорганических экотоксикантов на некоторые показатели иммунной системы крыс // Известия Оренбургского государственного университета, 2015, № 6(56), с. 252–254.
16. Плотникова О.М., Матвеев Н.Н., Корепин А.М., Дуплякина И.В. Биохимические показатели лабораторных мышей в зависимости от времени интоксикации метилфосфонатом // Терретическая и прикладная экология, 2010, № 1, с. 81–86.
17. Максимовских С.Ю., et al. Изменение морфологических и биохимических параметров крови мелких млекопитающих под влиянием глифосата // Известия Оренбургского государственного аграрного университета, 2015, № 54, с. 93–95.
18. Шувалова Н.Е., et al. Оценка безопасности гербицидов с помощью стилонихий // Актуальная биотехнология, 2018, № 3(26), с. 221–224.
19. Куликова Н.А., Лебедева Г.Ф. Гербициды и экологические аспекты их применения: Учебное пособие. М.: Книжный дом «ЛИБРОКОМ», 2010, 152 с.

УДК 63.631

ВТОРИЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ

Г.П. Шуваева, Т.В. Свиридова, О.Л. Мещерякова, В.Э. Дробных

Воронежский государственный университет инженерных технологий», Воронеж, Россия

В настоящий момент получение новых антибиотиков практически приостановлено по ряду причин: мишень большинства антибиотиков – это один из трех ключевых прокариотических метаболических путей или процессов, а именно: биосинтез белка; репликация ДНК; биосинтез клеточной стенки бактерий; спонтанные мутации бактерий могут за несколько дней уничтожить труд нескольких лет и, наконец, примерно один миллион новых продуцентов необходимо проанализировать, чтобы найти всего лишь один новый антибиотик. В связи с этим, целесообразно использование вторичных метаболитов микробных культур, обладающих бактерицидными и бактериостатическими свойствами (бактерицинов). Исследование и выбор продуцента проводили на тест культуре, которая по мнению ВОЗ, является одной из наиболее устойчивых к воздействию уже известных антибиотиков – *Escherichia coli*. В ходе эксперимента был отобран штамм *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 122, пригодный для промышленного синтеза антибиотического препарата. Опытным путем установлен оптимальный состав питательной среды и время культивирования, способствующие максимальному накоплению целевого продукта – лейкоцидина. Исследования свидетельствуют о наличии в супернатанте культуральной жидкости антибиотического компонента. Диаметр зон задержки роста тест-культур достигал 26–28 (мм). Это позволяет говорить о продуценте как о перспективной альтернативе использованию уже известных антибиотиков, вызывающих резистентность бактерий.