

ОЦЕНКА ИНТЕГРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ФУНГИЦИДА НА ОСНОВЕ МЕТАМИТРОНА В БАТАРЕЕ ТЕСТОВ

Дудчик Н. В., Дроздова Е. В., Емельянова О. А., Фираго А. В., Суровец Т. З.

*Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены»,
г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. В соответствии с основным принципом лабораторного биотестирования проведена оценка интегральной токсичности действующего вещества фунгицида на основе метамитрона в батарее тестов, составленной из трех краткосрочных тестов: по кинетическим параметрам развития консорциума *Pseudomonas* spp., на тест-культуре одноклеточных протококковых водорослей с оптическим принципом детекции и в аггравированном тесте с использованием тест-культуры *Daphnia magna* (Straus). Обоснована целесообразность батареи тестов, основанной на биологической роли разных видов организмов, обладающих различной чувствительностью к химическим контаминантам, в сложных эутрофических системах.

Ключевые слова: экспресс-методы, интегральная токсичность, гидробионты, экспериментальное моделирование, факторы среды обитания.

Введение. В соответствии с основным принципом лабораторного биотестирования целесообразно проведение лабораторного моделирования для оценки показателя интегральной токсичности в батарее краткосрочных тестов. Тест-

объекты должны представлять различные уровни организации биологических систем (прокариоты и эукариоты) и различные трофические группы экосистемы: рыбы, беспозвоночные, водоросли, бактерии. Такой концептуальный подход основан

на биологической роли разных видов организмов, обладающих различной чувствительностью к химическим контаминантам, в сложных эутрофических системах [1–8].

Для оценки интегральной токсичности объектов окружающей среды целесообразно использование «батареи тестов» (набора тестов), состоящей из нескольких тест-систем, поскольку отдельно взятый тест не позволяет получить репрезентативные объективные данные о токсичности [4, 9–12]. При составлении батареи тестов необходимо учитывать следующие основополагающие критерии: биотесты должны дополнять друг друга по чувствительности к различным группам химических веществ, маркеры оценки интегральной токсичности должны основываться на разных принципах детекции токсического воздействия и критериях оценки токсического воздействия (биохимические, физиологические, репродуктивные, поведенческие параметры жизнедеятельности и другие).

Разработка, валидация и последующее внедрение релевантных методов качественного выявления и количественной оценки факторов среды химической природы обеспечивает получение новых знаний о механизмах их воздействия на биологические структуры разного уровня организации, позволяет выявить и определить характер и выраженность их воздействий, обосновать и осуществить гигиеническое регламентирование неблагоприятных факторов среды обитания [4].

Для высокой степени стандартизации экспериментов используют тест-объекты из синхронизированной тест-культуры – генетически и физиологически однородной. Синхронизацию тест-культур применяют с целью нормирования тест-системы по стадии жизненного цикла тест-объектов. Она может осуществляться разнообразными методами, при использовании гидробионтов чаще применяют механический (селективный), предусмотренный в международных руководствах.

Для ракообразных он заключается в получении необходимого количества особей в 3-м поколении от одной самки, размножающейся партеногенетическим путем. Механический метод синхронизации достаточно эффективен и прост в использовании, а его пригодность в практическом применении служит весомым аргументом при выборе тест-организма для постановки биологических тестов.

Одной из последних тенденций совершенствования системы тестирования и оценок объектов среды обитания является максимальное

приближение методических подходов биотестирования к естественным условиям.

Это позволяет увеличить достоверность получаемых результатов исследований с позиции учета межвидовых взаимодействий. Обозначены несколько тенденций в данном направлении. Наиболее актуальным является разработка подходов по тестированию с применением стандартизованных тест-моделей и тест-моделей на основе видов организмов, характерных для местных экосистем.

Таким образом, научное обоснование концепции моделирования и оценки характера и выраженности биологического действия факторов среды различной природы на релевантных тест-моделях, методологии разработки на их основе адекватных и чувствительных методик с целью гигиенической оценки, регламентации и нормирования факторов среды является актуальным и приоритетным, но вместе с тем недостаточно изученным направлением профилактической медицины [1, 2, 4, 11].

Цель работы – обоснование целесообразности оценки показателя интегральной токсичности химического вещества 4-амино-3-метил-6-фенил-1,2,4-триазин-5-он (метамитрон) в батарее тестов, составленной из 3 краткосрочных тестов: по кинетическим параметрам развития консорциума *Pseudomonas* spp., на тест-культуре одноклеточных протококковых водорослей с оптическим принципом детекции и в аггравированном тесте с использованием тест-культуры *Daphnia magna* (Straus).

Материалы и методы. Объектом исследования являлся 4-амино-3-метил-6-фенил-1,2,4-триазин-5-он (метамитрон) — действующее вещество, которое используется в качестве регулятора роста растений. Метамитрон способствует уменьшению скорости роста стеблей и листьев растений, также может применяться для увеличения устойчивости растений к стрессовым условиям, таким как засуха, холод или жара.

В работе использовали следующие средства измерений, реактивы и оборудование: анализатор потенциометрический (рН-метр), автоклав вертикальный, аппарат для встряхивания, бактерицидные лампы, баня водяная с терморегулятором, весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г, гигрометр психрометрический типа ВИТ-1, дистиллятор, климатостат, спектрофотометр Hitachi U-5100, микробиологический анализатор с электрохимическим (импедансным) принципом детекции, микроскоп световой биологический с увеличением 900–1000.

Среда для культивирования *Pseudomonas* spp. (на 1000 мл воды): глюкоза – 3,2 г; кукурузный экстракт – 1,5 г; пептон – 0,5 г; натрий хлористый – 5,0 г; pH 7,2–7,4. Вода дистиллированная – до 1000 мл, pH среды 6,8. Стерилизация автоклавированием при 121 °C в течение 30 мин.

Тестирование проводили при температуре воздуха в лаборатории от 18 °C до 25 °C. Относительная влажность воздуха (80 ± 5 %). Атмосферное давление 84–106 кПа (630–800 мм рт. ст.). Проверку лабораторных культур на пригодность проводили тестированием растворов эталонных (референсных) веществ, на основании чего рассчитывают показатель эффективной концентрации ЭК₅₀. Тест-объект должен реагировать на воздействие таких веществ в установленном диапазоне. Референсное вещество, длительность теста и стандартный диапазон реагирования на референсное вещество установлены для каждого метода индивидуально. Если величина ЭК₅₀ находится в установленном диапазоне реагирования тест-объекта, культура тест-объекта пригодна для биотестирования.

Результаты и их обсуждение. Проведена оценка интегральной токсичности препаративной формы фунгицида метамитрона в диапазоне концентраций в батарее тестов.

Метод оценки интегральной токсичности водных объектов на тест-культуре одноклеточных протококковых водорослей с оптическим принципом детекции устанавливает методику определения интегральной токсичности с использованием тест-культуры пресноводных одноклеточных протококковых водорослей *Scenedesmus subspicatus* и основан на изучении динамики роста численности популяции оптическим методом. Метод биотестирования с использованием тест-культуры пресноводных одноклеточных протококковых водорослей *Scenedesmus subspicatus* основан на установлении различия между интенсивностью роста водорослей в анализируемой пробе (опыт) и культуральной среде (контроль).

Для количественной оценки интегральной токсичности обоснован показатель интегральной токсичности ИТ, рассчитываемый по формуле (1):

$$\text{ИТ} = (T_{s2} - T_{s1}) / T_{s1} \cdot 100 \% \quad (1),$$

где T_{s1} – время наступления стационарной фазы в контроле, с внесением образца, ч; T_{s2} – время наступления стационарной фазы в опыте, без внесения образца, ч.

Мы предлагаем следующую количественную шкалу оценки ИТ: менее 25 % – низкая

токсичность, от 25 до 50 % – умеренно выраженная токсичность; от 50 до 75 % – выраженная токсичность, более 75 % – сильная токсичность.

Для биотестирования используют лабораторную альгологически чистую культуру одноклеточных протококковых водорослей *Scenedesmus subspicatus*, находящуюся в экспоненциальной стадии роста (3-суточную). Для поддержания экспоненциальной стадии роста водорослей пересев осуществляется регулярно 1 раз в 7 суток. Во время проведения эксперимента проводят измерения оптической плотности культуры путем отбора 2 см³ в начале опыта и через каждый час, соблюдая правила асептики. Измерения проводят на спектрофотометре Hitachi U-5100 при длине волны $\lambda = 540$ нм, длина оптического пути 1 см. За окончательный результат измерения принимают среднее арифметическое значение результатов 3 параллельных измерений. Метод оценки интегральной токсичности водных сред по кинетическим параметрам развития консорциума *Pseudomonas* spp. устанавливает методику определения токсичности с использованием в качестве тест-объекта консорциум водных микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa* 31-02102015 и *Pseudomonas mirabilis* 34-02102015. Изоляты получены в ходе гигиенического мониторинга водных объектов в зонах рекреации Минского района в весенне-летний период 2015 г. При тестировании используются кинетические маркеры консорциума микроорганизмов *Pseudomonas* spp. Для оценки роста тест-штамма выбирают параметр детекции таким образом, чтобы кривая роста тест-культур на соответствующих питательных средах имела характерный вид: стабильную базовую линию, выраженную фазу быстрого роста культуры и значительные значения изменений электрохимических показателей среды.

Величину лаг-периода (длительность начальной фазы роста) определяют с использованием показателя Impedance Detection Time (IDT) микробиологического анализатора.

С учетом этого нами выполнена модификация ростового теста с оптической детекцией с использованием инструментального высокоточного импедиметрического способа детекции. Для оценки токсических воздействий целесообразно определение продолжительности лаг-фазы кривой роста тест-штамма микроорганизма. Оценка степени токсического воздействия основывалась на сравнении параметров времени детекции IDT в контроле (IDT_к) и опыте (IDT_о), полученных с помощью программного обеспечения прибора.

Чувствительность к интегральному токсическому (Т) воздействию для тест-культуры рассчитывали по формуле (2):

$$T = \frac{IDT_o}{IDT_k} \quad (2).$$

При Т = 1 считали штамм нечувствительным, при Т = 1,1–1,5 – умеренно чувствительным, при Т = 1,6 и более – чувствительным к интегральному токсическому воздействию, при Т < 1 считали тест-организм устойчивым к токсическому воздействию.

Экспресс-методика определения интегральной токсичности в экспресс-тесте основана на использовании в качестве тест-объекта низших ракообразных *Daphnia magna* (Straus) и определении их иммобилизации при воздействии химических веществ, присутствующих в исследуемой водной среде, по сравнению с контрольной культурой в пробах, не содержащих токсические вещества (контроль). В токсикологических исследованиях, в частности при биотестировании, редко принимается во внимание температурный фактор, существенно влияющий на результаты биотестов. Критерии к выбору диапазона варьируемых температур основываются на представлении о том, что ферментные системы водных

организмов наиболее активно функционируют и, соответственно, наиболее уязвимы для действия токсикантов при температурное в пределах 18–25 °С. Температура денатурации белка, как правило, ограничивает допустимый интервал изменения температуры. От температуры зависят скорость поступления и выделения токсиканта, реакции, вызывающие повреждения, процессы, определяющие обезвреживание ксенобиотиков, и процессы репарации. При повышении температур на 4–15 °С различия в эффективности действия токсикантов могут выражаться резким возрастанием чувствительности в исследуемой пробе при условии, что в контрольном эксперименте иммобилизация не превышает 10 %.

Результаты экспериментальных исследований интегральной токсичности препаративной формы фунгицида метамитрон в батарее тестов, составленных из теста оценки интегральной токсичности водных сред по кинетическим параметрам развития консорциума *Pseudomonas* spp., теста оценки интегральной токсичности водных объектов на тест-культуре одноклеточных протококковых водорослей с оптическим принципом детекции и теста оценки интегральной токсичности в аггравированном тесте с использованием тест-культуры *Daphnia magna* (Straus), представлены в таблицах 1–3.

Таблица 1 – Результаты анализа токсичности фунгицида метамитрон по кинетическим параметрам развития консорциума *Pseudomonas* spp.

Тест-организм	Маркеры		
	Концентрация, мг/л	Длительность лаг-фазы, ч	Td, ч
<i>Консорциум Pseudomonas</i> spp.	Контроль	4,7±0,3	–
	1	5,5±0,7*	1,17
	8	6,0±0,5*	1,28
	32	6,3±0,6*	1,34
	64	7,05±0,4*	1,48
	100	7,99±0,4*	1,7

Примечание: * – статистически значимое различие средних значений в опыте и контроле p<0,05.

Таблица 2 – Результаты анализа интегральной токсичности фунгицида метамитрон на тест-культуре одноклеточных протококковых водорослей с оптическим принципом детекции

Тестируемая концентрация, мг/л	Снижение N/N ₀ по отношению к контролю, %	Интегральная токсичность
Контроль	–	–
1	15,5	Умеренно выраженная токсичность
8	30,4	Умеренно выраженная токсичность
32	45,3	Выраженная токсичность
64	58,3	Выраженная токсичность
100	70,3	Сильная токсичность

Таблица 3 – Интегральная токсичность фунгицида метамитрон в отношении *D. magna* (Straus) в экспресс-тесте при температуре 25 °C

Тестируемая концентрация, мг/л	Число дафний в тесте	Иммобилизация дафний в эксперименте		
		48 ч экспозиции		
		Число	%	Выраженность проявления
Контроль	20	0	0	–
1	20	1	5	Низкая
8	20	4	20	Низкая
32	20	6	30	Умеренно выраженная
64	20	10	50	Выраженная
100	20	15	75	Сильная

Таким образом, полученные в эксперименте данные тестирования позволили оценить динамику токсичности водного раствора фунгицида метамитрон на тест-культуре одноклеточных протококковых водорослей с оптическим принципом детекции в диапазоне концентраций по показателю интегральной токсичности. Показатель демонстрировал умеренно выраженную токсичность в концентрациях 1 и 8 мг/л, выраженную — в концентрациях 32 и 64 мг/мл и сильную токсичность — в концентрации 100 мг/мл.

При изучении водного раствора фунгицида метамитрон в аггравированных условиях получено значение сильной интегральной токсичности для концентрации метамитрона 100 мг/л, однако диапазон концентраций 32–64 мг/л выявил умеренно выраженную и выраженную токсичность. Полученные результаты свидетельствуют, что препарат токсичен для рыб, беспозвоночных и водорослей.

Поскольку гигиенические нормативы и экологические нормативы содержания действующих веществ препарата в воде объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования в воде поверхностных водных объектов не установлены, можно сформулировать следующие рекомендации.

Учитывая токсикологические характеристики препаративной формы средства защиты растений, препарат не рекомендуется для

применения в водоохранной зоне поверхностных водных объектов рыбохозяйственного значения. Рекомендуется не допускать бесконтрольного попадания продукта в окружающую среду, загрязнения почвы, природных и технических водоемов и источников питьевой воды остатками препарата и водой, использовавшейся для промывки тары и оборудования. Запрещается выливать остатки препарата в канализацию. Избегать попадания препарата в корма.

Заключение. Проведена оценка интегральной токсичности фунгицида на основе метамитрона в батаре тестов.

Результаты экспериментальных исследований интегральной токсичности препаративной формы фунгицида метамитрон в батаре тестов, составленных из теста оценки интегральной токсичности водных сред по кинетическим параметрам развития консорциума *Pseudomonas spp.*, теста оценки интегральной токсичности водных объектов на тест-культуре одноклеточных протококковых водорослей с оптическим принципом детекции и теста оценки интегральной токсичности в аггравированном тесте с использованием тест-культуры *Daphnia magna* (Straus) подтвердили умеренно выраженную токсичность фунгицида на основе метамитрона в концентрациях 1 и 8 мг/л, выраженную — в концентрациях 32 и 64 мг/мл и сильную токсичность — в концентрации 100 мг/мл.

Список цитированных источников

1. Дроздова, Е. В. Медико-экологические риски в контексте устойчивого развития / Е. В. Дроздова // Здоровье и окружающая среда : сб. науч. тр. / Респ. науч.-практ. центр гигиены, М-во здравоохранения Респ. Беларусь ; редкол. : С. И. Сычик [и др.]. – Минск, 2019. – Вып. 29. – С. 168–177.
2. Дудчик, Н. В. Кинетические и культурально-морфологические особенности чувствительных культур микроорганизмов при токсическом воздействии / Н. В. Дудчик, В. П. Филонов, И. П. Щербинская // Медицинский журнал. – 2010. – № 3 (33). – С. 143–145.

3. Дудчик, Н. В. Изучение свойств консорциума почвенных микроорганизмов как тест-объектов для оценки интегральной токсичности / Н. В. Дудчик // Гигиена и санитария. – 2012. – Т. 91, № 5. – С. 82–84.
4. Оценка интегральной токсичности факторов и объектов среды обитания с использованием альтернативных биологических тест-моделей: методология и технологии / Е. В. Дроздова [и др.]. – Минск : Белорус. науч.-исслед. ин-т трансп. «Транстехника», 2017. – 216 с.
5. Шевцова, Н. С. Туристско-рекреационный потенциал малых рек Витебской области / Н. С. Шевцова, Г. И. Марцинкевич, Е. В. Дроздова // Природные ресурсы. – 2013. – № 2. – С. 42–51.
6. Bacterial profiles and phenotypic biomarkers of microbiota isolates in habitat: hazard identification factors / N. V. Dudchik [et al.] // Health Risk Analysis. – 2020. – № 2. – P. 92–100.
7. 1-Deaza and 3-deazapurines in the reaction of microbiological transglycosylation / I. A. Mikhailopulo [et al.] // Biotechnology Letters. – 1992. – Vol. 14, N 10. – P. 885–890.
8. Dudchik, N. V. Prokaryotic test models for environmental ecotoxicological research: prospects and classification / N. V. Dudchik, S. I. Sychik, V. V. Shevlyakov // Theoretical and Applied Ecology. – 2018. – N 4. – P. 12–16.
9. Microbial community structure and function in sediments from e-waste contaminated rivers at Guiyu area of China / J. Liu [et al.] // Environ. Pollut. 2018. – Vol. 235. – P. 171–179.
10. Parmar, T. K. D. Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution / T. K. D. Parmar, Y. Rawtani, K. Agrawal // Frontiers in Life Science. – 2016. – Vol. 9, № 2. – P. 110–118.
11. Response of soil microbial communities and microbial interactions to long-term heavy metal contamination / X. Li [et al.] // Environ. Pollut. – 2017. – Part 1. – P. 908–917.
12. Synthesis of 2'-deoxythymidine by an enzymatic transdeoxyrinosylation / A. J Zinchenko [et al.] // Biotechnology Letters. – 1990. – Vol. 12, N 5. – P. 341–346.

Assessment of the integral toxicity of the fungicide metamidon in a battery of tests

*Dudchik N. V, Drazdova A. V., Emeliyanova O. A., Firaho H. V., Suravets T. Z.
Scientific Practical Centre of Hygiene, Minsk, Republic of Belarus*

In accordance with the basic principle of laboratory biotesting, the integral toxicity of the active substance of the fungicide Metamidon was assessed in a battery of tests composed of three short-term tests: according to the kinetic parameters of the development of the *Pseudomonas* spp. consortium, on a test culture of unicellular protococcal algae with an optical detection principle, and in an aggravated test with using a test culture of *Daphnia magna* (Straus). The feasibility of a battery of tests based on the biological role of different types of organisms in complex eutrophic systems and different sensitivities to chemical contaminants is substantiated.

Keywords: express methods, integral toxicity, hydrobionts, experimental modeling, environmental factors.

Поступила 05.06.2024