УДК 574.24:632.95

ВЕМБЕР В. В., к.б.н., с.н.с.; ДІТЯШОВА І. Г., магістрант
Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»

ВПЛИВ ГЕРБІЦИДНИХ ПРЕПАРАТІВ НА КАТАЛАЗНУ АКТИВНІСТЬ ELODEA CANADENSIS MICHX

Установлено можливість використання каталазної активності як чутливого тесту на присутність у водному середовищі гербіцидних препаратів. Як тест-об'єкт вибрана Elodea canadensis Michx. (елодея канадська), оскільки ця рослина протягом життєвого циклу занурена у водне середовище і найбільш повно контактує з усіма присутніми у воді токсикантами. Виявлена реакція на вплив досліджених гербіцидів дозволяє рекомендувати розроблений тест для проведення комплексного моніторингу водних об'єктів.

Ключові слова: *біотестування, гербіциди, чутливість, специфічність, елодея канадська.*

© Вембер В. В., Дітяшова І. Г., 2016.

Постановка проблеми. Серед численних екологічних проблем, які загострилися останнім часом, проблема забруднення водного середовища набуває все більшого розголосу. Майже всі поверхневі джерела водоспоживання піддаються впливу шкідливих забруднень антропогенного характеру. Виняткове місце серед забруднювачів посідають пестициди, поширені в сільськогосподарській практиці у світі та Україні [1, 2]. У загальному обсязі пестицидів, що використовуються в світовому масштабі, доля гербіцидних препаратів і дефоліантів наближається до 70 %. Одним із найнеприємніших наслідків їхнього використання є те, що більшість гербіцидів можуть не лише концентруватися в межах оброблюваних ділянок, але й поширюватися на значні території й тривалий час циркулювати в біосфері. У водойми вони надходять із поверхневими і підґрунтовими стоками із сільськогосподарських угідь [2, 3]. Одним з напрямів підтримання екологічної безпеки в цій ситуації є неперервний моніторинг цих полютантів в об'єктах довкілля й, особливо, в поверхневих джерелах води, потрапляння й накопичення в яких гербіцидів знищує водяну рослинність і призводить до прискореної деградації аквальних систем.

Враховуючи широкий спектр і різні механізми дії сучасних гербіцидів, методи, за допомогою яких можна виявити їхні понаднормові концентрації в об'єктах навколишнього середовища, мають забезпечувати високий рівень чутливості й невисоку специфічність.

Сучасні тенденції в екологічному контролі шкідливих впливів усе більше відображають біотичний підхід. Хімічний аналіз засвідчує лише наявність «маркерів» – певних концентрацій забруднювачів, проте не дозволяє оцінити стан і перспективи розвитку різних компонентів біоти та екосистеми в цілому в разі забруднення [4, 5]. Тому гострою та актуальною проблемою екологічного контролю є вибір інформативних біологічних показників та адаптація біологічних методів для екоконтролю. Для своєчасного відслідковування забруднення водойм гербіцидами необхідно впроваджувати методи біоіндикації та біотестування, які вирізнялися б експресністю, дешевизною, простотою, гарною відтворюваністю й достатнім рівнем специфічності.

Аналіз попередніх досліджень. Загальною науковою проблемою при біотестувані є вибір тест-організмів, що будуть задіяні в дослідженнях, оскільки вони мають задовольняти низці вимог. Окрім вибору біотеста суттєву роль відіграє вибір тест-реакції – того параметра організму, який вимірюють під час тестування. Найбільш інформативними вважають інтегральні параметри, які характеризують загальний стан живої системи відповідного рівня. Із підвищенням рівня інтегральності тест-реакції підвищується «екологічний реалізм» тесту, але знижується його оперативність та чутливість. Функціональні параметри виявляються більш лабільними, аніж структурні. Параметри клітинного й молекулярного рівня програють із точки зору екологічної інформативності, але виграють у чутливості, оперативності й відтворюваності [4–6].

Методи біотестування, що використовуються для оцінки стану навколишнього природного середовища, мають відповідати таким умовам: бути придатними для оцінки будь-яких екологічних змін середовища; характеризувати найбільш загальні й важливі параметри життєдіяльності біоти; буди достатньо чутливими для виявлення навіть початкових змін; бути зручними не лише для лабораторного моделювання але й польових досліджень; бути достатньо простими і не надмірно вартісними для широкого використання.

Отже, **невирішеною та дискусійною частиною наукової проблеми** залишається підбір комплексу тест-об'єкта й тест-реакції, які б найповніше задовольняли умовам екологічного моніторингу водних об'єктів.

Після аналізу літературних даних і пошукових досліджень [7], авторами запропонована тест-система, що задовольняє наведеним вище умовам. Вона складається з рослини-макрофіта – елодеї канадської *(Elodea canadensis* Michx.), що належить до видів-гідатофітів, контакт яких із водним середовищем і розчиненими в ньому речовинами є більш повним, аніж у вищих рослин, що використовують нині для біотестування (цибуля, крес-салат). Окрім цього, елодея є видом-космополітом, область її існування охоплює величезні території, що є важливим фактором при обранні організму як біоіндикаторного виду.

Як системний біомаркер на токсичний вплив гербіцидів авторами запропонована ферментативна активність каталази. Каталаза є одним із найпоширеніших ферментів у тканинах усіх аеробних і мікроаерофільних організмів. Вона належить до оксидоредуктаз і розкладає на воду й молекулярний кисень

перекис водню, що утворюється під час окиснення органічних речовин і є токсичним для клітин [8]. Обрання цього тесту пов'язане з тим, що основною функцією каталази є запобігання нарощуванню окиснювального стресу в клітині, отже вона може бути інтегральним показником, що чутливо реагує на токсичний вплив хімічних речовин [8, 9]. Окрім цього, система біохімічних перетворень є однією з найчутливіших ланок підтримання гомеостазу клітини.

Метою статті є виявлення специфічних змін у каталазній активності елодеї канадської (*Elodea canadensis* Michx.) під час біотестування гербіцидів різних груп шляхом дослідження динамічних змін каталазної активності елодеї під час її контакту з гербіцидами різного механізму дії, присутніх у середовищі культивування в широких діапазонах концентрації.

Методика роботи. Гербіциди, що використовували, характеризуються різним механізмом дії.

Перший – гліфосат ($C_3H_8NO_5P$) – є фосфорорганічним контактним гербіцидом і має яскраво виражену системну дію. Використовували розчини калієвої солі гліфосату – найпоширенішої за обсягами використання. Препарати гліфосату, проникаючи в усі вегетативні органи, накопичуються в меристематичних тканинах, зонах активного росту, де порушують фізіолого-біохімічні процеси, що призводить до загибелі рослин. Припускається, що гліфосат пригнічує біосинтез фенілаланіну, інгібує хлоризматмутазу або префенатдегідратазу. У воді препарат є стійким. Зменшення рівня гліфосату у водній системі відбувається, в основному, завдяки адсорбції діючої речовини донними відкладеннями, впливу водної мікрофлори та ультрафіолетового випромінювання. Гранично допустима концентрація (ГДК) для води водойм – 0,02 мг/дм^3.

Як гербіцид, що має відмінний механізм дії, вибрано клетодим $C_{17}H_{26}ClNO_3S$ – хлорорганічний гербіцид, що є інгібітором біосинтезу жирів. Після потрапляння на поверхню листа речовина абсорбується поверхнею і рухається флоемою до меристемних регіонів. Препарат накопичується в тканинах, порушує біосинтез ліпідів, призводячи до загибелі рослин. Нестабільно розкладається за підвищеної температури, під дією УФ випромінення, за екстремальних pH. Піддається окисленню й розкладанню за аеробних умов, період напіврозпаду 1…3 доби. Клетодим є стійким за відсутності сонячного світла у водних розчинах із pH 7…10. ГДК для води водойм – 0,002 мг/дм^3.

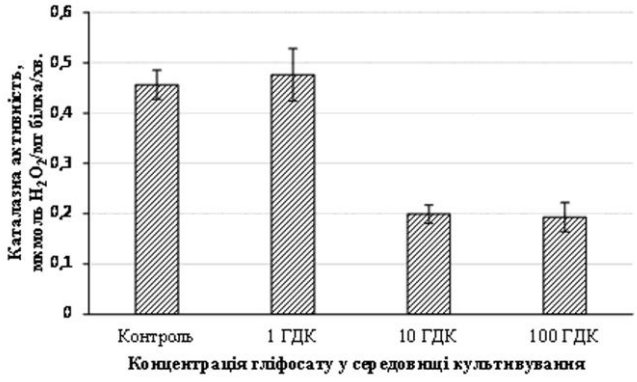
Під час тестування піддослідні рослини елодеї утримували в розчинах, виготовлених шляхом додавання до еталонної води гербіцидних препаратів до отримання концентрацій діючої речовини 1, 10 і 100 ГДК. Умови утримання контрольних і піддослідних груп тест-організмів за фізико-хімічними параметрами не відрізнялися (за винятком відсутності чи наявності гербіциду). Тривалість експозиції елодеї в розчинах гербіцидів становила від однієї (для визначення гострої токсичності) до семи діб (хронічна токсичність). Досліди повторювали 3…5 разів.

Для визначення каталазної активності використовували безклітинні екстракти рослини, для отримання яких частину стебла елодеї разом із листками після експозиції в модельному розчині тричі відмивали в розчині 0,9 % NaCl і подрібнювали. Відмиту від модельного розчину рослинну біомасу піддавали гомогенізації, ступінь якої контролювали мікроскопічно. Усі операції виконували за температури 4 °С. Отриманий гомогенат центрифугували 10 хв. за швидкості 3000 хв$^{-1}$. Осад відкидали, а супернатант використовували як безклітинний екстракт. Екстракти заморожували й зберігали у замороженому вигляді до використання – для визначення в них біохімічних показників.

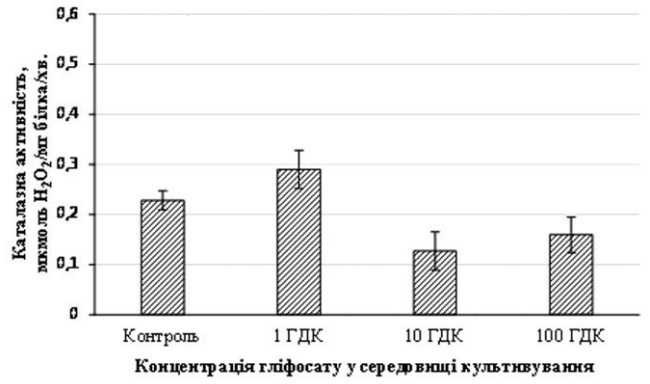
Ферментативну активність ендогенної каталази КФ 1.11.1.6 визначали за зниженням екстинкції розчину, що містив H_2O_2 як субстрат, при додаванні до нього безклітинного екстракту протягом 1 хв. за температури 25±2 °С і довжин хвиль 240 нм [10]. Для вимірювань використовували двопроменевий спектрофотометр СФ-26. Каталазну активність виражали у перетворених за 1 хв. мкмолях H_2O_2, віднесених до вмісту білку в реакційній суміші.

Для дослідження впливу гербіцидів на ферментативну активність використовували такі концентрації:

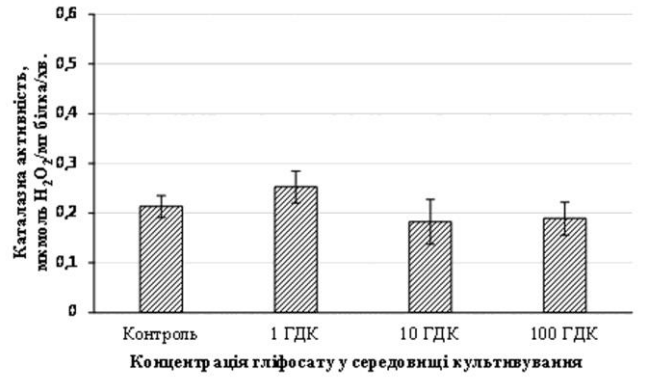
– для гліфосату: 0,02 мг/дм^3 – 1 ГДК, 0,2 мг/дм^3 – 10 ГДК, 2 мг/дм^3 – 100 ГДК;
– для клетодиму: 0,002 мг/дм^3 – 1 ГДК, 0,02 мг/дм^3 – 10 ГДК, 0,2 мг/дм^3 – 100 ГДК.



а



б



в

Рис. 1 – Залежність каталазної активності *Elodea canadensis Michx.* від концентрації гліфосату в середовищі культивування за тривалості експозиції: *а* – 1 доба; *б* – 4 доби; *в* – 7 діб

Виклад основного матеріалу. На рис. 1–3 наведено визначення каталазної активності елодеї канадської після експозиції з гліфосатом протягом однієї, чотирьох і семи діб.

Упродовж першої доби контакту спостерігаються найбільші зміни в активності каталази (див. рис. 1). Концентрація вивченого гербіциду на рівні 1 ГДК статистично достовірно не змінювала ферментативну активність. Із підвищенням концентрації до 10 ГДК, каталазна активність зменшувалась більше, аніж удвічі. Слід також відзначити факт підтримання рослиною однакового рівня каталазної активності під час її взаємодії з гліфосатом на рівні 10 і 100 ГДК.

Схожі результати отримано після експозиції каталази з гліфосатом протягом чотирьох діб (див. рис. 2). Особливість полягає в тому, що відмінність між каталазою активністю в контролі та під впливом 10 і 100-кратного перевищення рівня ГДК є не настільки вираженою, як після добової експозиції, а під впливом гліфосату на рівні 1 ГДК спостерігалася незначна (на межі статистичної достовірності) стимуляція каталазної активності.

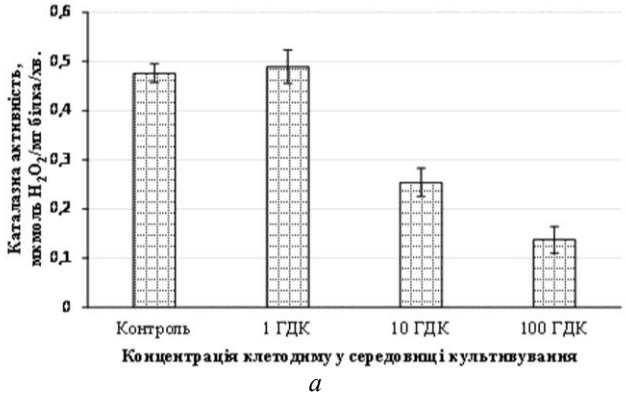
За тривалішої експозиції (див. рис. 3) каталазна активність елодеї не виявила статистично достовірних розбіжностей у разі вирощування її без гербіциду та всьому вивченому концентраційному діапазоні гліфосату. Такий ефект можна пояснити як виснаженням систем антиокиснювального захисту, так і частковою адаптацією метаболічних систем до присутності в розчині для культивування токсиканту. Проте найвірогіднішим поясненням нівелювання різниці у ферментативній активності елодеї за її семидобової експозиції з гліфосатом є поступова деградація гербіцидного препарату у водному середовищі.

Що стосується впливу клетодиму, то цей гербіцид своєрідно вплинув на каталазну активність елодеї (рис. 4–6).

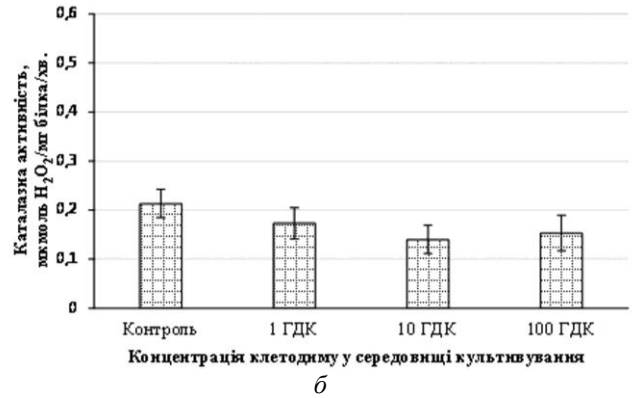
Упродовж першої доби взаємодії з цим гербіцидом, спостерігалася майже лінійна залежність між каталазною активністю й концентрацією пестициду в середовищі культивування (див. рис. 4).

Таким чином, виявлено високу чутливість каталазної активності елодеї канадської до присутності в середовищі її культивування гербіцидів різного механізму дії, що робить можливим використання такого тесту для визначення забрудненості водних об’єктів пестицидами.

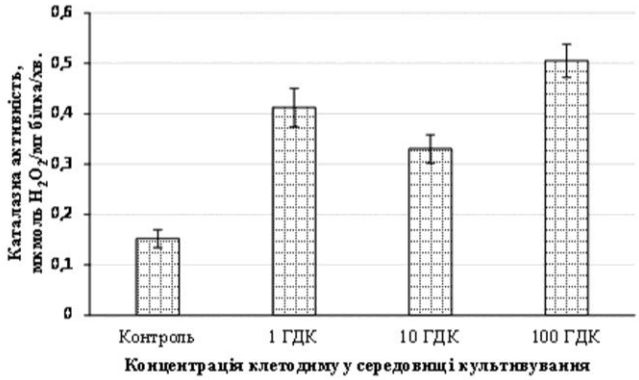
Вивчення динамічних змін ферментативної активності елодеї канадської дозволяє рекомендувати добову тривалість періоду її експозиції з пестицидом.



а



б



в

Рис. 4 – Залежність каталазної активності *Elodea canadensis Michx.* від концентрації клетодиму в середовищі культивування за тривалості експозиції: *а* – 1 доба; *б* – 4 доби; *в* – 7 діб

До переваг розробленого методу біотестування можна віднести його експресність, доступність і чутливість. Відсутність специфічності за таких досліджень у деяких випадках може розглядатися як недолік, але під час скринінгу на широке коло забруднювачів відсутність специфічності можна віднести до переваг.

Висновки. Досліджено зміни динаміки каталазної активності елодеї канадської під впливом гербіцидних препаратів різного механізму дії – гліфосату й клетодиму. Діапазон досліджених концентрацій гербіцидів становив 1…100 ГДК.

Установлено, що найбільші зміни в каталазній активності порівняно з контролем спостерігалися впродовж першої доби контакту елодеї з обома дослідженими гербіцидами, що дозволяє рекомендувати добовий термін експозиції для біотестування з використанням пропонованої системи біотест-біомаркер.

Під час хронічного впливу клетодим стимулював каталазну активність порівняно з контролем. Після семидобової експозиції елодеї з клетомидом за його введення в середовище культивування в кількості 100 ГДК, каталазна активність рослини перевищувала контрольні значення більше, аніж утричі.

Доведено високу чутливість каталазної активності елодеї канадської до присутності у середовищі її культивування гербіцидів різного механізму дії, що уможливлює використання цього тесту для визначення забрудненості водних об'єктів пестицидами.

До переваг розробленого методу біотестування можна віднести його експресність, доступність і чутливість.

Перспективи подальших досліджень. Окрім чітких висновків щодо чутливості використаної системи біотест-біомаркер і можливості її використання в біотестуванні поверхневих джерел, дослідження продемонстрували низку неочікуваних результатів, які потребують подальших досліджень із метою їхнього пояснення. По-перше, гербіциди різного механізму дії виявили різноспрямований вплив на каталазну активність елодеї, що проявився через сім діб експозиції рослини з гербіцидними препаратами. Пояснення потребує також активація каталазної активності елодеї після семидобової експозиції останньої з клетодимом, що характеризується, фактично, лінійним характером залежності відносно дози, в якій гербіцид був присутній у середовищі культивування.

Окрім цього, недослідженим залишається питання стабільності каталазної активності елодеї канадської за різних фізико-хімічних показників водойм, що має місце в природних і техногенно-модифікованих екосистемах.

Список використаної літератури

1. *Relyea R. A.* The Impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities / Rick A. Relyea // Ecological Applications. – 2005. – 15(6). – P. 618–627.
2. Динаміка залишкових кількостей пестицидів у водах сільськогосподарського призначення в умовах Полтавщини / В. В. Коваль, В. О. Наталочка, С. К. Ткаченко, О. В. Міненко // Вісн. Полтавської держ. аграрної академії. – 2011. – № 1. – С. 22–26.
3. *Писаренко В. М.* Агроекологія / В. М. Писаренко, П. В. Писаренко, В. В. Писаренко. – Полтава, 2008. – 255 с.
4. *Біотестування* як метод оцінки якості питних вод // Вісн. НАН України. – 2006. – № 10. – С. 54–57.
5. *Ляшенко О. А.* Биоиндикация и биотестирование в охране окружающей среды / О. А. Ляшенко. – СПб : ГТУРП, 2012. – 67 с.
6. Биотестовый анализ – интегральный метод оценки качества объектов окружающей среды / А. Г. Бубнов, С. А. Буймова, А. А. Гущин, Т. В. Извекова; под общ. ред. В. И. Гриневича. – Иваново : ГОУ ВПО Иван. гос. хим.-технол. ун-т, 2007. – 112 с.
7. *Вембер В. В.* Каталазна активність як індикаторна ознака чутливості тест-рослин до дії гербіцидів / В. В. Вембер, І. Г. Дітяшова // XVIII Міжнар. наук.-практич. конф. студентів, аспірантів та молодих

вчених «Екологія. Людина. Суспільство» (Київ, 27–29 травня 2015 р.) : зб. тез доп. / укл. Д. Е. Бенатов. – К. : НТУУ «КПІ», 2015. – С. 22–23.
8. *Владимиров Ю. А.* Свободные радикалы в живых системах / Ю. А. Владимиров, О. А. Азизова, А. И. Деев // Итоги науки и техники. Биофизика. − М. : ВИНИТИ, 1991. − 274 с.
9. Catalase activity as a potential vital biomarker of fish intoxication by the herbicide aminotriazole / O. Yu. Vasylkiv, O. I. Kubrak, K. B. Storey, V. I. Lushchak // Pesticide Biochem. and Physiology. – 101 (1). – P. 1–5.
10. *Величко А. К.* Методы лабораторного определения общей перекись разрушающей активности ферментов растений / А. К. Величко, В. Б. Соловьев, М. Т. Генгин // Изв. Пензенского гос. пед. ун-та им. В. Г. Белинского. – 2009. – 14 (18). – С. 44–48.
Надійшла до редакції 25.06.2015