

## КОМПЛЕКСНА ОЦІНКА ТОКСИЧНОСТІ ВОДНИХ ЗРАЗКІВ ЗА ДОПОМОГОЮ РОСЛИННИХ І ТВАРИННИХ ТЕСТ-ОРГАНІЗМІВ

Оцінка якості природних вод біологічними методами в останні десятиліття набула особливої актуальності. Використання хіміко-аналітичних методів не дає інформації про можливу дію комплексу забруднювачів на живі організми. Біотестування передбачає цілеспрямоване використання стандартних тест-організмів і методів для визначення токсичності водних зразків [1].

Біотестування не скасовує систему аналітичних й апаратних методів контролю природного середовища, а лише доповнює її якісно новими біологічними показниками. Отримані з його допомогою результати, варто доповнювати даними аналітичної хімії, а при оцінці ризику досліджуваних проб і речовин для здоров'я людини — результатами стандартних санітарно-гігієнічних методик. Використання біологічних тест-систем дозволяє визначити зміни в екосистемах на дуже ранній стадії, коли вони ще не проявляються у вигляді морфологічних і структурних змін й їх не можна виявити іншими методами. Це дає можливість передбачати порушення екосистеми й вчасно вжити заходів. Крім того, стан біоіндикаторів можна використати як додаткову інформацію при оцінці здоров'я населення [1, 2].

Для характеристики структурних і кількісних змін найважливіших компонентів клітинного ядра, що є носіями генетичної інформації, найбільш часто використовують наступні цитогенетичні методи: визначення частоти хромосомних аберацій, сестринських хроматидних обмінів, мікроядер, ушкоджень ДНК (адукти, розриви нитки ДНК, СОМЕТ-тест); а також змін флуоресценції при гібридизації *in situ* (FISH-метод) і кількісних параметрів ядерець та ядерецутворюючих організаторів хромосом [3, 4].

Вищезазначені методи задовольняють сучасні вимоги щодо досліджень токсичності водних розчинів: вони визначають їхні біологічні властивості на (суб-) клітинному рівні, реєструють зміни в генетичного апарату, об'єктивно характеризують віддалені наслідки їхнього впливу. Як оптимальний набір при проведенні експериментів для визначення структурних і функціо-

нальних змін генома клітини внаслідок токсичного впливу запропоновані мікроядерний тест і ядерецьвий біомаркер [3, 5, 6].

Мікроядерний тест є одним з найбільш поширених методів виявлення речовин з генотоксичними властивостями. Цей тест переважає за інформативністю та оперативністю тест на хромосомні аберації, та має ряд інших переваг — меншу кількість артефактів, можливість кращого обліку, крім того, він є менш трудомістким та більш продуктивним [6–8].

Відомі роботи, у яких оцінка дії модифікуючих антропогенних факторів на генетичний апарат клітин виконувалася за допомогою аналізу ядерецьвих характеристик, однак вони мали моніторинговий характер і не пропонували схеми проведення експерименту, необхідного при біотестуванні. Запропонований нами метод передбачає аналіз морфологічних характеристик ядерець в умовах експерименту й дає можливість оцінити вплив досліджуваних факторів на клітини рослин і тварин [8].

У зв'язку з вищесказаним є актуальною розробка оптимального для конкретних умов та одночасно технічно простого та універсального комплексу біотестів і біомаркерів для виявлення токсичних факторів і речовин, для визначення забруднення оточуючого середовища, зокрема, оцінки якості природних і питних вод, як на рівні організму, так і на рівні клітини, її геному.

### Матеріали і методи

При дослідженні впливу токсичних речовин використовували тест-організми: гідру *Hydra attenuata* L., цибулю *Allium cepa* та карась, *Carasius auratus gibelio* L. А в експериментах з дослідження генотоксичності за мікроядерним аналізом — цибулю *Allium cepa* та рибу, карась, *Carasius auratus gibelio*. Цитологічні препарати готували із клітин апікальної меристеми корінців рослин, клітин ектодерми гідри й клітин крові, зябер і хвостового плавця риби.

Цитологічні препарати з клітин кореневої меристеми цибулі та салату готували за стандарт-

ною методикою [9, 10]: корінці забарвлювали ацеторсеїном при температурі 22–25 °С протягом 15 хвилин, після чого їх промивали в 45%-му розчині оцтової кислоти, що запобігає потраплянню часточок барвника на препарат. Відділяючи зону росту корінців, готували давлені препарати. При мікроядерному аналізі для кожного препарату підраховували по три тисячі клітин, визначали мітотичний індекс, кількість клітин з мікроядрами, подвійними ядрами та з іншими патологіями мітозу, якщо такі зустрічались.

Для мікроядерного тесту на клітинах риб, використовували клітини крові, зябер та хвостового плавця. Кров відбирали з хвостової вени, робили мазки, фіксували 96% етиловим спиртом 30 хв., висушували та фарбували 5 хв. розчином азурезину за Романовським [2, 11]. Тканину зябер (зяберні дуги) фіксували в оцтово-гліцериновій суміші, що одночасно є мацеруючим розчином. Фіксація і мацерація матеріалу повинні відбуватись не менш як добу, потім тканина в даній суміші може зберігатись протягом місяця при 4 °С. Готували цитологічні препарати, потім їх сушили і фарбували так само, як і в попередньому випадку. Для приготування препаратів з хвостового плавця використовували регеновану тканину плавця, тобто ту, що утворилась підчас перебування риб в досліджуваному розчині (вона відрізнялась більш світлим кольором). Шматочки тканини, зафіксовані в оцтово-гліцериновій суміші, перенесли на предметне скло і препарувальною голкою гомогенізували тканину, отримуючи суспензію клітин, з якої потім робили мазок. Далі препарати сушили і фарбували протягом 5 хв. розчином азур-еозину за Романовським.

Аналіз препаратів крові, зябер та клітин хвостового плавця проводили так само, як і рослинних препаратів: під світловим мікроскопом підраховували кількість клітин з мікроядрами та іншими патологіями мітозу для три тисяч клітин в кожному випадку.

### Результати та обговорення

Запропоновані для дослідження речовини відомі своїми токсичними властивостями і є токсикантами, що часто згадуються як забруднювачі навколишнього середовища.

Результати гострого токсичного впливу даних розчинів на організменному рівні, отримані в рамках міжнародної програми «WaterTox», наведені в табл. 1 [12]. Проаналізовані розчини не мали чіткого розходження за рівнем токсичності, що виявлялась методами біотестування, тобто всі в різній мірі проявляли токсичні властивості. Так, найбільш токсичними в порядку збільшення були розчини: р, р'-ДДТ, 4-нітрохінолін-N-оксиду, міді, ртуті і пентахлорофенолу; а найменш токсичними: миш'яку, ліндану, метолахлору й аніліну.

Найбільші серед органічних сполук рівні токсичності відзначені в пентахлорофенолу, що характеризується бактерицидною й фунгіцидною активністю [13]. Він мав порівняно високі значення негативних ефектів як для двох рослинних, так і двох тваринних тест-об'єктів табл. 1. Найбільшою токсичністю серед неорганічних речовин відрізнялися розчини солей ртуті й міді, але тільки для тваринних тест-об'єктів.

Цитогенетичний моніторинг антропогенного забруднення навколишнього середовища займає важливе місце в системі екологічного мо-

Таблиця 1

Порівняльний аналіз негативних ефектів\*, зафіксованих у тваринних та рослинних тест-об'єктів у результаті впливу токсичних сполук [14]

| Досліджувані речовини | <i>Allium cepa</i> | <i>Lactuca sativa</i> | <i>Daphnia magna</i> | <i>Hydra attenuata</i> |
|-----------------------|--------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|
| Сульфат міді          | 18,5               | 14,6                  | 982,5                | 750,0                  |
| Сульфат цинку         | 2,1                | 2,4                   | 141,7                | 0                      |
| Метолахлор            | 2,4                | 3,1                   | 5,0                  | 5,0                    |
| Хлорид ртуті          | 11,5               | 24,0                  | 1000,0               | 3200,0                 |
| Нонілфенол            | 2,0                | 0,1                   | 100,0                | 80,0                   |
| Пентахлорфенол        | 97,0               | 43,8                  | 178,8                | 125,0                  |
| Альдрин               | 3,8                | 4,8                   | 395,6                | 0                      |
| Миш'як                | 6,8                | 4,9                   | 12,5                 | 1,1                    |
| р, р'-ДДТ             | 197,1              | 18,0                  | 1000,0               | 0                      |
| Ліндан                | 3,2                | 2,5                   | 10,0                 | 5,0                    |

Примітка: \* — ефект розраховано на одиницю концентрації речовини.

ніторингу. Пріоритетність таких досліджень на клітинному й хромосомному рівнях визначається найбільшою уразливістю цих структур організму при впливі мутагенів.

У зв'язку з цим було визначено мітотичну активність і частоту утворення мікроядер і подвійних ядер у проліферативних клітинах корінців *A. cepa* й *L. sativa*, а також проаналізовано характеристики клітин зазначених рослинних тест-об'єктів й ектодермальних клітин *H. attenuata*, підданих впливу досліджуваних розчинів в умовах токсикологічного експерименту.

Для порівняння ефектів різних речовин при дослідженні токсичності на тваринах та рослинах нами були обрані речовини хлорид ртуті, сульфат міді, пентахлорфенол та при дослідженні впливу цих речовин на цитогенетичні показники тест-об'єктів наведено в табл. 2 та 3.

Реакція рослин і тварин на негативний вплив досліджуваних сполук значно відрізнялася, що свідчить про їхню різну чутливість, і робить необхідним спільне використання в комплексних біотестах як рослин, так і тварин. Показано, що

тваринні організми відрізнялися більшою чутливістю, у порівнянні з рослинними, але для рослинних біотестів спостерігалася більш чітка відтворюваність результатів.

Результати ефектів досліджуваних речовин щодо токсичності, генотоксичності та цитотоксичності наведені в табл. 2. Ртуть, проявила сильний ефект токсичності на тваринах і середній на рослинах та впливала на мітотичний індекс. Стосовно міді було зафіксовано високий ступінь токсичності та суттєву зміну мітотичного індексу й на цьому фоні сильний генотоксичний ефект.

Серед органічних сполук також відмічено ефекти щодо токсичності, цитотоксичності та генотоксичності табл. 3. Сульфат міді та пентахлорфенол, проявив сильну токсичну дію, проявив генотоксичний та цитотоксичний вплив за мітотичним індексом.

### Висновки

Визначено токсичність водних зразків, прослідковано динаміку первинних змін ядерцевих показників клітин тест-організмів при впливі токсичних речовин.

Таблиця 2

#### Порівняння ефектів щодо токсичності, генотоксичності й цитотоксичності речовин неорганічної природи

| Досліджувані речовини | Токсичність       |                   | Мітотичний індекс |       | Генотоксичність |          |           |          |
|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------|-----------------|----------|-----------|----------|
|                       | тваринні біотести | рослинні біотести | цибуля            | салат | мЯ-цибуля       | мЯ-салат | 2Я-цибуля | 2Я-салат |
| Хлорид ртуті          | ++++              | ++                | ++++              | ++    | +               | +        | +         | +        |
| Сульфат міді          | ++++              | ++                | ++++              | ++++  | ++              | ++       | ++        | +++      |
| Пентахлорфенол        | ++                | +                 | ++                | +     | +               | +        | +++       | +        |

Примітки: +: ефект практично відсутній; ++, +++, +++++: слабкий, середній та сильний ефекти відповідно.

Таблиця 3

#### Порівняння ефектів щодо токсичності, генотоксичності й цитотоксичності речовин органічної природи

| Досліджувані речовини | Токсичність       |                   | Мітотичний індекс |       | Генотоксичність |          |           |          |
|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------|-----------------|----------|-----------|----------|
|                       | тваринні біотести | рослинні біотести | цибуля            | салат | мЯ-цибуля       | мЯ-салат | 2Я-цибуля | 2Я-салат |
| Пентахлорфенол        | +++               | +++               | ++                | +     | ++              | ++       | +         | +        |
| Хлорид ртуті          | ++                | ++                | ++                | ++    | +++             | ++       | ++        | ++       |
| Сульфат міді          | ++++              | +++               | +                 | +     | +++             | +        | +++       | +        |

Примітки: +: ефект практично відсутній; ++, +++, +++++: слабкий, середній та сильний ефекти відповідно.

Розроблено схему дослідження цитотоксичності водних проб за допомогою ядерцевого біомаркери на клітинах рослин і тварин. Результати аналізу вказують на реакції ядерця на дію токсичних речовин.

На основі експериментальних даних обґрунтовано доцільність комплексного використання мікроядерного тесту та ядерцевого біомаркери для оцінки цитотоксичності та генотоксичності

водних зразків поряд зі стандартними методами визначення гострої і хронічної токсичності.

Цей метод дозволив виявити вплив вмісту токсикантів у воді на ядра клітин. Під час дослідження спостерігалися генотоксичні дії органічних і неорганічних домішок водного середовища на тест-організми, доведено, що тканина організмів різних органів є чутливим та дозволяє проводити оцінку токсичності, цитотоксичності та генотоксичності водних проб.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Arkhipchuk V. V., Goncharuk V. V., Chernykh V. P., Maloshtan L. N., Vergolyas M. R., Moseychuk T. V. «Use of plant and animal bioassays and biomarkers for complex estimation a general toxicity, genotoxicity and cytotoxicity of drugs» // *Современные проблемы ИИО «Медицина Украины»*. — К., 2005. — С. 17–25.
2. Гончарук В. В., Верголяс М. Р., Веялкина Н. Н. Оценка генотоксического влияния тяжелых металлов на клетки рыб // *Збірник наукових праць Вінницького державного аграрного університету*. — Вінниця, 2008. — 1, вип. 34. — С. 171–176.
3. Ильинских Н. Н., Новицкий В. В., Варгунова Н. И., Ильинских И. Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. — Томск: Изд-во Томского ун-та, 1991. — 272 с.
4. Гончарук В. В., Верголяс М. Р. Спосіб визначення цитотоксичності водного середовища. Патент України № 20001532 від 06.02.2008 р. Бюл. № 6.
5. Hanson N. Utility of biomarkers in fish for environmental monitoring // *Integrated Environmental Assessment and Management*. — 2009. — 5, № 1. — P. 182–186.
6. Верголяс М. Р., Кучеренко Т. В., Архипчук В. В. Сравнительный анализ частоты проявления клеток с микроядрами и двойными ядрами у карася *Carassius auratus* в природных и лабораторных условиях // *Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології*. — К, Логос, 2007. — 1 — С. 203–206.
7. Hernandez-Verdun D. Regulators of nucleolar functions // *Progress in cycle research*. — 2003. — 5. — P. 301–308.
8. Гончарук В. В., Гаранько Н. Н., Архипчук В. В. Некоторые характеристики цитотоксичности и генотоксичности водных растворов полигексаметиленгуанидина // *Доповіди НАН України*. — 2002. — № 3. — С. 167–170.
9. Marciano L. Effect of cadmium on the nucleoli of meristematic cells of onion *Allium cepa* L: an ultrastructural study // *Environmental research*. — 2002. — 8, № 1. — P. 30–35.
10. Arkhipchuk V. V., Malinovskaya M. V., Garanko N. N. Cytogenetic consequences of a toxic impact on cells of *Allium cepa*, *Lactuca sativa* and *Hydra attenuata* // 9th International Symposium on Toxicity Assessment, Pretoria, South Africa, 26 September — 1 October 1999.: book of abstracts. — Pretoria, South Africa, 1999. — P. 2–3.
11. Верголяс М. Р., Безруков В. Ф., Манило Л. Г. Цитологічна характеристика периферичної крові дев'яти видів риб // *Вісник Запорізького національного університету. Біологічні науки*. — Запоріжжя, 2007. — № 1. — С. 10–15.
12. Arkhipchuk V. V., Romanenko V. D., Malinovskaya M. V. Toxicity Assessment of Water Samples with a Set of Animal and Plant Bioassays: Experience of the Ukrainian Participation in the WaterTox Program // *Environmental Toxicology and Water Quality*. — 2000. — 15, N 4. — P. 277–286.
13. Куценко П. Н. Основы токсикологии. — Санкт-Петербург, 2002. — С. 24.
14. Popp W., Wachtler F. Changes in nucleolar structure, number and size in cellular activation and inactivation. Observations in human phytohaemagglutinin-treated lymphocytes // *Cell Tissue Res*. — 1983. — N 234. — P. 377–388.

#### OSMALENYI M.S., HOLOVKOV A.M., NANIIEVA A.V., VERGOLIAS M.R.

*A. V. Dumanski Institute of Colloid Chemistry and Chemistry Water of the National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Vernadskyi blvd., 42, e-mail: vergolyas@meta.ua*

#### COMPREHENSIVE EVALUATION OF TOXICITY OF WATER SAMPLES USING PLANT AND ANIMAL TEST ORGANISMS

**Aims.** Developing effective methods for assessing the quality of natural waters by biological methods. **Methods.** In the study of the influence of toxic substances have used test organisms of plant and animal origin. Determined mitotic activity and frequency of micronuclei formation and double nuclei in cells proliferate roots and *A. cepa*, *L. sativa*, and analyzed ectodermal cells *H. attenuata*, exposed to the test solution conditions toxicological experiment. **Results.** The reaction of plants and animals on the negative impact of the compounds differed significantly, indicating that their different sensitivities and necessitates sharing in complex biotests both plants and animals. It is shown that the animal organism differed greater sensitivity compared with plant, but plant bioassays observed more accurate reproducibility. **Conclusions.** The content and cytotoxicity of water samples using nucleolar biomarker in the cells of plants and animals. The method allows to identify the impact of toxicants in water content in the nuclei of cells. During the study, there was genotoxic action of organic and inorganic impurities aquatic environment of the test organism proved that the fabric of different organisms are sensitive and allows for assessment of toxicity, cytotoxicity and genotoxicity of water samples.

**Keywords:** aquatic environment, test organism toxicity.