

УДК 575.224:575.826

БІЛОКОНЬ С. В.

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
Україна, 65082, м. Одеса, вул. Дворянська, 2, e-mail: lotuss75@mail.ru

ГЕНОТОКСИЧНИЙ ВПЛИВ ДЕЯКИХ ПЕСТИЦИДІВ У ТЕСТАХ НА *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Інтенсивне сільськогосподарське виробництво для одержання високих урожаїв передбачає системне застосування хімічних засобів захисту рослин від шкідників, бур'янів та хвороб. Однак разом з високою господарською та економічною ефективністю широке використання пестицидів створює потенційну небезпеку забруднення ними об'єктів довкілля, загрозу негативного впливу на здоров'я працюючих і населення та порушення екологічної рівноваги у природі [1].

Одним із найбільш пріоритетних напрямків сучасної науки є вивчення несприятливого впливу на біологічні системи ксенобіотиків, у тому числі пестицидів. За даними Мінагрополітики України, щорічно на 40 млн га сільськогосподарських угідь вноситься до 36 тис. тонн пестицидів. Загрозливих масштабів набуло забруднення пестицидами, накопичення яких тільки в південних регіонах України сягає близько 5 тис. тонн [2].

Пестициди неминуче викликають глибокі зміни екосистем, в які їх впроваджують, оскільки вони мають широкий спектр токсичної дії на всі живі організми. Багато яким пестицидам окрім високої токсичності притаманна яскраво виражена кумулятивна дія, наслідки якої проявляються в порушеннях імунологічного статусу організму, в мутагенній та тератогенній дії [3].

В аналізі токсичної дії пестицидів особливе місце займає вплив на генетичний апарат, бо численні дані літератури свідчать, що саме клітинне ядро є вірогідною мішенню їх дії [4, 5]. Багато пестицидів та їх метаболітів, проникаючи в клітинне ядро, змінюють структурно-функціональну організацію ядерного геному. Відзначено, що пестициди викликають збільшення частоти генних мутацій, хромосомних аберацій, а також порушення реплікації і транскрипції ДНК, синтезу РНК, змінюють роботу ферментних систем, пригнічують репаративні системи клітини і т. ін. [6].

Є достатня кількість фактів, які підтверджують реальність генетичної небезпеки нако-

пичення пестицидів у ґрунті, воді й атмосфері. Тому дослідження їх токсичності дуже важливі. Однак генотоксичний вплив нових впроваджених у сільське господарство пестицидів на життєздатність і репродуктивну функцію тваринних об'єктів досліджено недостатньо [7].

У зв'язку з цим метою роботи було вивчення генотоксичного впливу акарицидів і фунгіцидів у тестах на *Drosophila melanogaster*.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень слугувала *Drosophila melanogaster* Mg. (Diptera, Drosophilidae). Дослідження провадили на лінії дрозофіли дикого типу *Canton-S*, якій властиві гарна життєздатність, висока плодючість та добре вивчений рівень мутабельності [8]. Мухи утримувалися при 24–25 °С в термостаті в цукрових стаканчиках зі стандартним середовищем [9] у контролі та з додаванням препаратів пестицидів до кормової суміші у досліді.

Вивчали дію фунгіцидів «Флінт Стар» 0,005%, «Превікур Енерджі» 0,015%, а також акарицидів «Санмайт» 0,001% і «Омайт» 0,003% на такі показники пристосованості дрозофіли, як плодючість та тривалість життя. Саме такі концентрації вибраних пестицидів близькі до рекомендованих виробниками (робочі розчини). Препарати «Превікур Енерджі» й «Омайт» належать до класу малотоксичних препаратів, а «Флінт Стар» та «Санмайт» — до помірно токсичних [10, 11]. В окремій серії дослідів визначали мутагенний вплив фунгіцидів за методом Меллер-5 (Basc) [9].

Тривалість життя мух за однократної дії пестицидів визначали, утримуючи по 10 мух кожної статі в пробірках з живильним середовищем, до якого додавали робочу концентрацію фунгіциду чи акарициду в досліді та дистильовану воду в контролі. Підрахунок живих мух вели щодня. Зміну корму здійснювали кожні три доби, резуль-

тати виражали кількістю діб, необхідних для загибелі 50% особин (Lt_{50}).

Плодючість визначали за кількістю нащадків однієї пари мух. Для цього пару мух утримували в пробірці з живильним середовищем, до якого додавали робочу концентрацію фунгіциду чи акарициду в досліді та дистильовану воду в контролі. Підрахунок нащадків, що виникли за цих умов, вели за кількістю лялечок та імаго. У кожному варіанті досліді було закладено по три повтори у трьох поколіннях.

Стисла характеристика досліджуваних препаратів:

«Флінт Стар» — новий фунгіцид мезостемно-системної дії. Препарат містить діючу речовину трифлорексістробін з класу стробілуринів з мезостемним механізмом дії та піріметаніл з класу анілопіримідинів із системним механізмом дії. Обидві діючі речовини препарату ідеально доповнюють одна одну. Винятковий профілактичний ефект трифлорексістробіну посилюється міцними лікувальними здатностями піріметанілу. Обидві речовини здатні перерозподілятися в газовій фазі по тих частинах рослини, на які препарат не потрапив безпосередньо під час обробки. Різнібічні механізми дії роблять малоімовірною можливість виникнення стійких рас збудників хвороб [10].

«Превікур Енерджі» — фунгіцид повної системної дії з ростостимулюючими властивостями у формі водорозчинного концентрату для захисту овочевих і баштанних культур від патогенів групи несправжніх борошнистих рос та кореневих гнилей. Препарат містить пропамокарб гідрохлорид 530 г/л і фосетил алюмінію 310 г/л. Пропамокарб гідрохлорид відрізняється надзвичайно високою профілактичною активністю проти несправжніх борошнистих рос і кореневих гнилей як за умов обробки рослин безпосередньо, так і шляхом використання через полив ґрунту, в який висаджується насіння або висаджена розсада [10].

«Санмайт» (пірідабен, 200 г/кг) — контактний акарицид, що відрізняється високою активністю при боротьбі з шкідниками на всіх стадіях їх розвитку (яйце — личинка — німфа — дорослий кліщ), ефективний у боротьбі з багатьма видами кліщів. Пірідабен токсичний для птахів, слаботоксичний для бджіл і теплокровних тварин. Помірно небезпечний для людини. За пероральної та термальної токсичності пірідабен

помірно небезпечний, за інгаляційної — небезпечний. Побічні негативні ефекти відсутні. Препарат на основі пірідабену належить до 2-го класу безпеки для людини і 3-го класу безпеки для бджіл [11].

«Омайт» (пропаргіт) за хімічною структурою є ефіром сірчистої кислоти, належить до малотоксичних речовин. Знищує активні стадії розвитку кліщів (личинка, німфа, доросла особина). Не знищує яйця, але залишкова дія знищує личинки.

Облік рецесивних зчеплених зі статтю летальних мутацій (РЗСЛМ) провадили за методом Меллер-5 (Basc) [9, 12]. Цей метод дозволяє здійснювати кількісний облік рецесивних летальних мутацій, що виникають у X-хромосомі зрілих сперматозоїдів самців дрозофіли. Самців, які отримували фунгіцид у кормі, віком 3–5 днів, схрещували з віргінними самицями лінії Меллер-5 (Basc). Схрещування проводили сім'ями, по 2 мухи на пробірку (1♂ і 1♀). Всього піддавали дії фунгіцидів по 20 самців кожного варіанту. Через дві доби мух вилучали з пробірки, оскільки на третій день у заплідненні беруть участь статеві клітини, що знаходилися на стадії сперматид на момент обробки самців. Через 9–10 днів проводили аналіз мух F_1 тільки дводенних яйцекладок. Аналіз РЗСЛМ здійснювали в другому поколінні. Частоту леталей визначали як частку (%) X-хромосом, що несуть летальну мутацію, від загальної кількості проаналізованих X-хромосом.

Статистичну обробку матеріалу проводили з використанням стандартних і спеціалізованих програм (Statistica) за методами, прийнятими в біології [13].

Результати та обговорення

Облік рецесивних летальних мутацій у X-хромосомі самців за методом Меллер-5 (Basc) показав, що після додавання в кормову суміш самців фунгіциду «Превікур Енерджі» серед нащадків F_2 не було самців дикого типу в 10,0% сімей, а при додаванні фунгіциду «Флінт Стар» самців дикого типу не було у 15% сімей (табл. 1).

Отримані дані дають змогу стверджувати, що досліджувані препарати фунгіцидів здійснюють мутагенний вплив на дрозофілу.

Вивчали також здатність досліджуваних препаратів фунгіцидів і акарицидів впливати на адаптивні можливості статевих клітин дрозофіли

Індукція рецесивних зчеплених зі статтю летальних мутацій у *Drosophila melanogaster* за впливу фунгіцидів

Варіант досліджу	Число проаналізованих Х-хромосом ♂	Число Х-хромосом з леталіями	Частота РЗСЛМ, %
Контроль	20	0	0
За додавання «Превікур Енерджі»	20	2	10,0
За додавання «Флінт Стар»	20	3	15,0

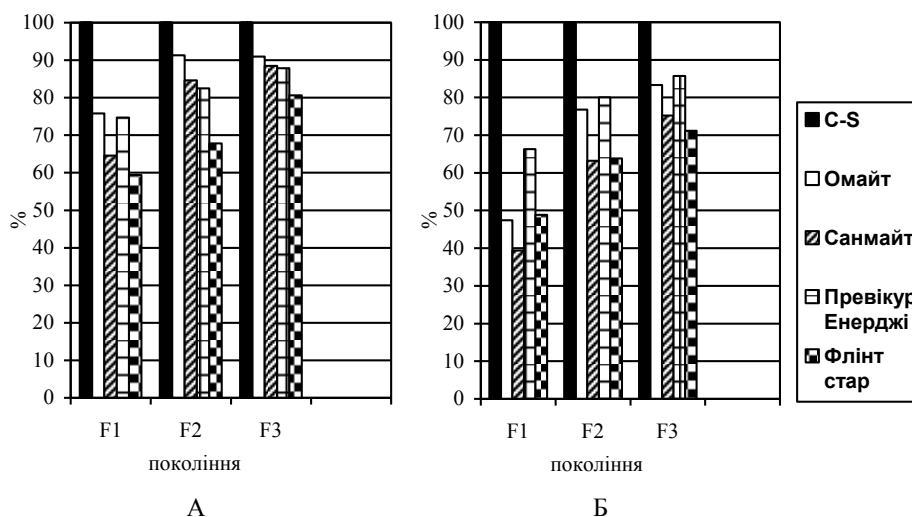


Рис. 1. Плодючість досліджуваних мух за додавання до кормової суміші препаратів пестицидів:

А — за кількістю лялечок, Б — за кількістю імаго

за показником плодючості (за кількістю лялечок та імаго).

Як відомо, найбільш прямою та безпосередньою характеристикою розмноження є плодючість [8]. Існують декілька способів кількісної оцінки здатності дрозофіли залишати нащадків. За одним із них репродуктивну здатність імаго дрозофіли оцінюють шляхом підрахунку кількості нащадків на стадії лялечки. Цей показник залежить від плодючості імаго і виживання нащадків на ембріональній та личинковій стадії розвитку. Автори визначають плодючість за числом лялькових пупаріїв, отриманих від самки після спарювання та відкладання яєць протягом трьох діб. Визначена таким чином репродуктивна здатність більше відповідає поняттю продуктивність, ніж показник плодючості, який оцінюють за кількістю відкладених самками яєць. Тому часто використовують підрахунок потомків за імаго, і цей показник деякі автори називають «реальна плодючість» [8].

Плодючість мух лінії *C-S* за додавання пестицидів досліджували у нащадків F_1 , F_2 , F_3 . Результати досліджень наведені у табл. 2, на рис. 1 (А, Б).

Як видно з таб. 2, плодючість у мух лінії *C-S* за додавання досліджуваних препаратів була вірогідно меншою за контроль як за кількістю лялечок, так і за кількістю імаго, що узгоджується з даними літератури про негативний вплив препаратів пестицидів на організм тварин, людини і довкілля в цілому [14, 15].

Показники плодючості *Drosophila melanogaster* в F_2 і F_3 за додавання препаратів акарицидів «Омайт» і «Санмайт» були вірогідно більшими, ніж в F_1 як за кількістю лялечок, так і за кількістю імаго, що може бути пов'язано з адаптацією дрозофіли до дії токсичних речовин, що входять до складу цих препаратів.

Порівнюючи між собою дію цих препаратів на плодючість дрозофіли, можна відзначити більш жорсткий вплив препарату «Санмайт». Можливо, це пов'язано з тим, що «Санмайт» відрізняється високою активністю при боротьбі з шкідниками на всіх стадіях їх розвитку, а «Омайт» знищує активні стадії розвитку кліщів (личинка, німфа, доросла особина) і не проявляє своєї дії на стадії яйця.

Вважають, що «Омайт» (пропаргіт) належить до малотоксичних речовин. Однак показ-

Показники плодючості *Drosophila melanogaster* за впливу препаратів пестицидів, n = 40–50

Варіанти дослідів	Кількість лялечок		Кількість імаго	
	M ± m	%	M ± m	%
Контроль C-S F ₁	80,91 ± 2,98	100	74,42 ± 1,86	100
F ₂	76,32 ± 3,12	100	68,51 ± 2,83	100
F ₃	81,65 ± 3,25	100	73,64 ± 3,00	100
C-S + «Омайт» F ₁	61,32 ± 2,42*	75,8	35,28 ± 2,08*	47,4
F ₂	69,65 ± 2,64* #	91,3	52,6 ± 2,53* #	76,8
F ₃	74,23 ± 3,02* #	91,0	61,28 ± 1,83* #	83,3
C-S + «Санмайт» F ₁	52,24 ± 2,62* **	64,6	29,35 ± 1,44* **	39,4
F ₂	64,53 ± 2,45 #	84,6	43,31 ± 2,08* ** #	63,2
F ₃	72,25 ± 3,06* #	88,5	55,32 ± 1,44* ** #	75,2
C-S + «Превікур Енерджі» F ₁	60,47 ± 4,27*	74,7	49,37 ± 3,93*	66,3
F ₂	62,96 ± 4,72*	82,5	54,8 ± 3,87*	80,0
F ₃	71,77 ± 3,85* #	87,9	63,1 ± 3,13* #	85,7
C-S + «Флінт Стар» F ₁	48,06 ± 4,31* **	59,4	36,42 ± 4,56* **	48,9
F ₂	51,74 ± 3,67* **	67,8	43,74 ± 4,58* **	63,8
F ₃	65,8 ± 3,97* #	80,6	52,39 ± 3,63* ** #	71,2

Примітки: * достовірність відмінностей у порівнянні з контролем; ** достовірність відмінностей у порівнянні з варіантом дослідів за участю іншого препарату аналогічної дії; # достовірність відмінностей у порівнянні з F₁.

ники токсичності пестициду в роботах різних дослідників відрізняються в два і більше разів. Не повністю розкрито характер і не описано механізми дії препарату. При дослідженні токсико-кінетики більша увага приділялася біотрансформації та виведенню «Омайту» з організму. Проте майже немає даних щодо його розподілення та накопичення в органах і тканинах тварин [16] та рослин [17].

За додавання препаратів фунгіцидів до кормової суміші мух не відзначено різкого збільшення плодючості в F₂, як це відзначалося за впливу акарицидів. Достовірність відмінностей у порівнянні з F₁ зафіксовано тільки у третьому поколінні мух. За впливу фунгіциду «Флінт Стар» плодючість мух була вірогідно меншою, ніж за впливу препарату «Превікур Енерджі».

З літератури відомо, що тривалість життя, тобто здатність підтримувати життєздатність організму тривалий час, є комплексною кількісною ознакою, що вносить певний внесок у пристосованість організмів. Вивчення тривалості життя дрозофіли в умовах стресу — цікава і водночас важлива проблема сучасної генетики та науки в цілому. Якщо організм зміг вижити після дії стресового фактора, то у нього виробляються специфічні адаптації, які пом'якшують наслідки при повторній його дії. Корисний ефект помірному стресу полягає в тому, що він дозволяє організму справитися з подальшим більш жорстким стресом [18].

Таблиця 3

Тривалість життя дрозофіли за впливу препаратів пестицидів, n = 150–200

Варіанти дослідів	Тривалість життя (Lt ₅₀), дні	%
Контроль C-S	21,45 ± 1,35	100,0
За додавання «Омайт»	17,78 ± 2,78	82,9
За додавання «Санмайт»	14,26 ± 2,42*	66,5
За додавання «Превікур Енерджі»	19,15 ± 1,25	89,3
За додавання «Флінт Стар»	13,97 ± 1,36*	65,1

Примітка: * достовірність відмінностей у порівнянні з контролем при P < 0,001.

Тривалість життя мух за впливу препаратів пестицидів наведено в табл. 3.

Відзначено тенденцію до зменшення тривалості життя мух у досліді. Однак достовірні відмінності у порівнянні з контролем було виявлено за додавання до живильного середовища мух препаратів «Санмайт» (на 33,5%) та «Флінт Стар» (на 34,9%).

Висновки

1. Досліджувані препарати пестицидів виявили генотоксичну активність за ознаками плодючості та тривалості життя мух.

2. За методом Меллер-5 встановлено мутагенну дію препаратів фунгіцидів «Превікур Енерджі» та «Флінт Стар».

ЛІТЕРАТУРА

1. Коршун М. М., Карпенко В. В. Гігієнічна оцінка поведінки та екотоксикологічного ризику застосування сучасних сульфонілсечовинних гербіцидів на посівах зернових культур (огляд літератури та результати власних досліджень) // Довкілля та здоров'я.— 2009.— № 2 (49).— С. 56–63.
2. Редька О. Г. Механізм дії хлорфеноксігербіциду 2,4 Д на морфофункціональний стан організму людини та тварин (огляд літератури) [Електронний ресурс].— Режим доступу: <http://sites.znu.edu.ua/bioindication/issues/15-2/Redka.pdf>.
3. Волков О. Г. Правда и вымысел о пестицидах [Електронний ресурс] // Охрана дикой природы.— 2005.— № 3 (33).— С. 13–16.— Режим доступу: <http://biodiversity.ru/publications/odp/archive/33/n33.pdf>.
4. Куриный А. И., Пилинская М. А. Исследование пестицидов как мутагенов внешней среды.— К.: Наук. думка, 1976.— 113 с.
5. Мирахмедов А. К., Мирахмедова П., Сагатов Г. А. Действие факторов внешней среды на клеточное ядро.— Ташкент: ФАН, 1990.— 124 с.
6. Левицкий Е. Л., Марченко А. Н., Губский Ю. И. Механизмы генотоксичности фосфорорганических соединений // Современные проблемы токсикологии.— 1998.— № 1.— С. 47–50.
7. Яблоков А. В. Об отрицательных последствиях применения пестицидов // Сельскохозяйственная биология.— 1987.— № 3.— С. 99–105.
8. Волкова Н. Е., Немчук Н. В., Воробьева Л. И. Влияние возраста родителей на половое поведение *Drosophila melanogaster* // Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія: біологія.— 2005.— Вип. 1–2, № 709.— С. 77–84.
9. Тихомирова М. М. Генетический анализ.— Л.: Изд-во ЛГУ, 1990.— 280 с.
10. Безопасное применение продуктов Bayer CropScience [Електронний ресурс].— Режим доступу: <http://www.bayercropscience.com.ua>.
11. АгроУкраїна [Електронний ресурс].— Режим доступу: <http://agroua.net/plant/chemicaldefence/protect>.
12. Іванов Ю. Н. Определение количества спонтанных доминантных летальных мутаций в геноме *Drosophila melanogaster* // Вавиловский журнал генетики и селекции.— 2011.— 15, № 3.— С. 595–599.
13. Атраментова Л. А., Утевская О. М. Статистические методы в биологии.— Горловка: Ліхтар.— 2008.— 248 с.
14. Пак И. В., Читаева Е. А., Хмелев А. В., Сивков Г. С. Токсико-генетические эффекты малых доз дельтаметрина (дельцида) в опытах с *Rattus Norvegicus* // Вестник Тюменского государственного университета.— 2011.— № 6.— С. 11–17.
15. Кузнецова Т. Ю., Демчук Е. В., Пак И. В. Влияние пестицидов на онтогенетическую изменчивость *Drosophila melanogaster* // Вестник Тюменского государственного университета.— 2009.— № 3.— С. 248–254.
16. Герілович І. О. Щодо аспектів дерматотоксичності омайту для кролів // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і ДНДІ ветпрепаратів і кормових добавок.— Львів, 2005.— Вип. 6, № 3.— С. 100–106.
17. Малінін О. О., Куцан О. Т., Герілович І. О. Динаміка вмісту залишкових кількостей омайту в об'єктах довілля після обробки винограду і яблунь // Вет. мед.: Міжвідомчий тематичний науковий збірник.— 2005.— Вип. 85.— С. 728–732.
18. Rogina V., Helfand S. L. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 2004.— 101, N 45.— P. 158–160.

BELOKON S. V.

Odesa National Mechnykov University, Department of Genetics and Molecular Biology,
Ukraine, 65082, Odesa, Dvoryanska str., 2, e-mail: lotuss75@mail.ru

GENOTOXIC EFFECTS OF SOME PESTICIDES IN TESTS OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Aims. We studied the genotoxic effect of acaricides and fungicides in tests of *Drosophila melanogaster*. **Methods.** The object of the study was to analyze the effect of fungicides «Flint Star», «Previkur Energy» and acaricides «Sanmayt» and «Omayt» on fecundity and longevity of *Drosophila*. Mutagenic effects of fungicides were determined according to Muller-5 (Basc) method. **Results.** Fecundity of C-S line flies was significantly less than the control, both by the number of pupae and the number of adults in case adding drugs. The reduction of life expectancy of flies in the experiment, by adding to the feeding of flies drugs «Sanmayt» and «Flint Star» was marked. By using Muller-5 (Basc) method, the mutagenic effect of fungicides «Previkur Energy» and «Flint Star» was established. **Conclusions.** The genotoxic activity of pesticides in the studied drugs on the basis of fertility and life expectancy of flies was found. By using Muller-5 (Basc) method the mutagenic effect of fungicides «Previkur Energy» and «Flint Star» was set.

Keywords: pesticides, mutagenicity, genotoxicity, fecundity, *Drosophila melanogaster*.