

УДК [631.811.98] [574]

Т.М. СМОЛЬСЬКА¹, М.Т. ГОНЧАРОВА², Л.С. КІПНІС², І.М. КОНОВЕЦЬ²

¹ Інститут сільськогосподарської мікробіології НААН України
вул. Шевченка, 97, Чернігів 14027

² Інститут гідробіології НАН України
пр-т Героїв Сталінграда, 12, Київ 04210

ОЦІНКА ТОКСИЧНОСТІ МЕТАБОЛІТІВ *CLADOSPORIUM SP. 249* МЕТОДАМИ БІОТЕСТУВАННЯ

На підставі результатів гострих і субхронічних дослідів на *Daphnia magna*, *Lemna minor* і *Allium cepa* зроблено висновки про відсутність токсичного впливу культуральної рідини гриба *Cladosporium sp. 249* в розведеннях більше 1:200 (5 см³/дм³), що дозволяє віднести цей препарат до практично нетоксичних для водних екосистем з урахуванням норм його можливого практичного вживання. Відсутність мікроядер і порушень в поділі клітин апікальної меристеми корінців *Allium cepa* у високих концентраціях препарату дозволяє також віднести цю культуральну рідину до безпечних за генотоксичними властивостями.

Ключові слова: біотестування, токсичність, фітогормони, *Cladosporium sp. 249*

Впровадження засобів регуляції росту та розвитку рослин на основі метаболітів вищих водяних рослин – фітогормонів та їх аналогів – є перспективним напрямком сучасної сільськогосподарської практики [5]. Разом з тим, грибні стимулюючі ріст рослин системи поки що не набули широкого застосування. Найчастіше це обмеження пов'язують з токсичністю метаболітів багатьох видів роду *Fusarium* та деяких інших [8, 12]. Тому при випробуваннях у відкритих системах грибних стимулюючих ріст рослин препаратів і культуральних рідин виникає потреба у ретельному дослідженні їх можливого впливу на навколишнє середовище, включно на водні екосистеми. Останнє пов'язане також з недостатнім вивченням шляхів біодеструкції та токсичності метаболітів мікроміцетів на водянні організми.

Сапротрофний гриб *Cladosporium sp. 249* виділений з чорнозему вилугованого неглибокого легкосуглинкового на лесовидних суглинках з ризосфери пшениці ярої в лабораторії мікробіометоду Інституту сільськогосподарської мікробіології НААН (м. Чернігів). Показано [7], що при його вирощуванні у культуральній рідині накопичуються фітогормональні речовини ауксинової, гіберелінової та цитокінінової природи.

Метою цієї роботи є оцінка токсичності культуральної рідини мікроміцету *Cladosporium sp. 249* в гострих та субхронічних дослідах.

Матеріал і методи досліджень

Мікроміцет *Cladosporium sp. 249* вирощували на рідкому живильному середовищі Ролена–Гома методом поверхневого культивування за температури 26–27°C протягом 7–8 діб. Перед проведенням токсикологічних досліджень культуральну рідину фільтрували. Для оцінки її токсичності були проведені досліди на водяних безхребетних і рослинах (табл. 1).

Таблиця 1

Використані тест-об'єкти та критерії токсичності

Тест-об'єкт	Тип дослідів, час експозиції	Показник	Посилання
<i>Daphnia magna</i> Straus	гострий (48, 72 год)	ЛК ₅₀	[3, 4, 10]
<i>Lemna minor</i> L.	субхронічний (10 діб)	ЕК ₅₀ ; НК	[3]
<i>Allium cepa</i> L.	субхронічний (5 діб)	ЕК ₅₀ ; НК	[3, 8, 9]

Примітки: ЛК₅₀ – медіанна летальна концентрація; ЕК₅₀ – медіанна ефективна концентрація; НК – недіяльна концентрація

Як контроль та для приготування серії розведень культуральної рідини *Cladosporium sp. 249* використовували дехлоровану воду з системи питного водопостачання (рН 7,5; твердість 4,6 мг-екв/дм³, розчинний кисень 7,0±0,5 мг/дм³, температура 20 ± 1°C).

При проведенні дослідів з *L. minor* із культури відбирали 10 візуально однакових рослин, що склалися з двох листків, переносили їх у чашки Петрі з досліджуваними розчинами культуральної рідини і залишали при кімнатній температурі (20±1°C) при освітленні люмінесцентними лампами

(2,5 клк). Дослід здійснювали у триразовій повторності впродовж 10 діб. Після експозиції в контрольному і дослідних варіантах підраховували загальну кількість листків [3].

Для біотестування на гіллястовусих ракоподібних використовували синхронізовану генетично однорідну культуру *D. magna*. Молодь дафній віком 24± год переносили у смності об'ємом 100 см³ по 10 у кожному у триразовій повторності. Впродовж експерименту дафній не годували, середовище не аерували, освітлення було відсутнє. Через 48, 72 і 96 год підраховували кількість загиблених протягом експозиції тварин [4, 13].

Дослідження інгібування росту корінців *A. cepa* здійснювали протягом 120 год [3, 11]. Можливу генотоксичну дію оцінювали за впливом на мітотичну активність та утворенням мікроядер. Для цього виготовляли давлені препарати клітин апікальної меристеми корінців, які фарбували оцеторсеїном [10].

Результати досліджень та їх обговорення

Система екологічного нормування шкідливої дії і діагностика екологічної якості водних екосистем базується на даних біотестування, що проводиться в лабораторних умовах з використанням стандартних тест-систем, які дозволяють виявити екологічну токсичність препаратів та їх потенційну небезпечність для природних об'єктів [1, 6]. З метою отримання повнішої характеристики токсикологічних властивостей культуральної рідини *Cladosporium* sp. 249 були проведені гострі та субхронічні дослідження на представниках різних трофічних рівнів і систематичного положення (табл. 1).

При дослідженні токсичного впливу культуральної рідини на *D. magna* чіткої залежності між величинами вітальних та абсолютно летальних розведень та часу експозиції виявлено не було, що може свідчити про відсутність в ній речовин прямої токсичної дії (табл. 2).

Таблиця 2

Смертність *Daphnia magna* Straus у розведеннях культуральної рідини мікроміцету *Cladosporium* sp. 249, $X \pm \sigma$ %, $n = 30$

Варіанти дослідів	Час експозиції, год.		
	48	72	96
Без розведення	100	100	100
10 см ³ /дм ³	20,0±1,0*	33,3±2,1*	33,3±2,1*
5 см ³ /дм ³	13,3±1,2	16,7±1,5	17±1,5
1 см ³ /дм ³	0	0	0
Контроль	0	0	0

Примітка. В цій таблиці та далі: * – різниця середніх величин дослідів і контролю статистично достовірна, $p < 0,05$

Як видно з наведених даних, достовірна негативна дія спостерігалась при концентраціях, які перевищували 5,0 см³/дм³. Згідно класифікації токсичних речовин [2], досліджувану культуральну рідину можна віднести до практично нетоксичних.

Результати дослідження впливу культуральної рідини *Cladosporium* sp. 249 на ріст корінців цибулі *A. cepa* наведено в табл. 3.

Таблиця 3

Інгібування росту корінців *Allium cepa* L. культуральною рідиною *Cladosporium* sp. 249 за 120 год експозиції, $n=5$

Варіанти дослідів	Довжина корінців, мм	Інгібування росту, %
10 см ³ /дм ³	52,9±12,4	7,2%
5 см ³ /дм ³	56,3±11,2	1,6%
1 см ³ /дм ³	56,9±9,3	1,3%
Контроль	57,1±10,1	–

Відсутність достовірної різниці між довжиною корінців *A. cepa* в досліджуваних концентраціях та контролі свідчить про відсутність негативного впливу метаболітів гриба на даний тест-об'єкт. Проте в максимальній з досліджених концентрацій був виявлений негативний ефект, що проявлявся в порушеннях проходження мітозу (табл. 4). Крім того, в концентрації культуральної рідини см³/дм³ спостерігалось достовірне підвищення кількості клітин у стадії мітозу, що є свідченням біологічної активності препарату.

Цитогенетичні показники апікальної меристеми корінців *Allium cepa* L. за дії культуральної рідини *Cladosporium* sp. 249

Варіанти дослідів	Кількість досліджених клітин	ΣМІ, %	Кількість порушених мітозів, %	ΣMN, %
10 см ³ /дм ³	980	17,5±2,3*	1,5	0
5 см ³ /дм ³	1020	38,5±3,5*	0,5	0
1 см ³ /дм ³	950	24,2±2,8	0,3	0
Контроль	960	19,5±2,2	0,2	0

Відсутність токсичності культуральної рідини гриба *Cladosporium* sp. 249 в субхронічному експерименті на *L. minor* у концентраціях нижче 5 см³/дм³ також дає можливість віднести досліджений препарат до практично нетоксичних (табл. 5).

Вплив культуральної рідини *Cladosporium* sp. 249 на ріст *Lemna minor* L. протягом 10 діб експозиції

Варіанти дослідів	Кількість листків $\bar{X} \pm \sigma$	Час подвоєння, діб	Інгібування росту, %	Морфологічні аномалії, %
Без розведення	35,4±7,1*	5,5	50,1%	17,5%
10 см ³ /дм ³	49,5±7,8*	4,3	28,0%	15,1%
5 см ³ /дм ³	73,0±9,9	3,5	5,6%	10,1%
1 см ³ /дм ³	69,5±3,5	3,6	3,0%	9,6%
Контроль	77,5±0,7	3,4	0,0%	3,0%

Висновки

Результати проведених дослідів на ряді тест-об'єктів різних трофічних рівнів свідчать про відсутність токсичного впливу метаболітів культуральної рідини гриба *Cladosporium* sp. 249 в розведеннях нижче 5 см³/дм³, що дозволяє віднести препарат до практично нетоксичних. Відсутність мікроядер і порушень поділів клітин апікальної меристеми корінців *A. cepa* в високих концентраціях препарату дозволили його віднести також до безпечних за цитогенотоксичними властивостями.

1. Брагинский Л.П. Интегральная токсичность водной среды и ее оценка с помощью методов биотестирования / Л.П. Брагинский // Гидробиол. журн. – 1978. – № 1. – С. 77–83.
2. Дудоров П. Токсикологические тесты при регулировании сбросов сточных вод // Влияние загрязняющих веществ на гидробионтов и экосистемы водоемов / П. Дудоров. – Л.: Наука, 1979. – С. 213–221.
3. Методи гідроекологічних досліджень поверхневих вод / під ред. В. Д. Романенка – К.: Логос, 2006. – 408 с.
4. Методика визначення гострої токсичності води на ракоподібних *Daphnia magna* Straus. K., 1997. КНД 211.1.4.054-97.
5. Новые элементы биорегуляции для устойчивого развития в агроэкосистемах / под ред. В.П. Кухаря. – К.: Наук. думка, 2004. – 350 с.
6. Методи біотестування якості водної середовища / под ред. О.Ф. Филенко. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 120 с.
7. Смольська Т.М. Утворення фітогормонів мікроміцетом *Cladosporium* sp. 249 / Т.М. Смольська // Агроєкологічний журнал. – 2008. – Спецвипуск (червень). – С. 222–224.
8. Bryden W.L. Other significant Fusarium mycotoxins. Fusarium / W.L. Bryden, A. Logrieco, H.K., Abbas [et al.]. – APS PRESS, 2001. – P. 360–392.
9. Ecological effects test Guidelines OPPTS 850-1400 Aquatic plant toxicity test using *Lemna* sp. – Tiers I and II. – EPA 712-C-96-156.
10. Fiskesjo G. *Allium* test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters // Plants for environmental studies / edited by Wuncheng Wang, Joseph W. Gorsuch, Jane S. Hughes, Boca Raton / G. Fiskesjo. – New York: Lewis Publisher, 1997. – P. 308–327.
11. Fiskesjo G. *Allium* test I: A 2-3 day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa*) / G. Fiskesjo // Environ. Toxicol. Water. Qual. – 1993. – N 8. – P. 461–470.
12. Levitin M. Distribution and toxicology Fusarium species on cereals in Russia. Occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in plants, food and feed in Europe / M. Levitin / Ed. A. Logrieco. – Belgium, European Communities, 2001. – P. 151–157.

13. *Water quality*—Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). ISO 10706:2000.

Т.М. Смольская¹, М.Т. Гончарова², Л.С. Кипнис², И.М. Коновец²

¹Институт сельскохозяйственной микробиологии НААН Украины, Чернигов

²Институт гидробиологии НАН Украины, Киев

ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ МЕТАБОЛИТИВ *CLADOSPORIUM SP. 249* МЕТОДАМИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

На основании результатов острых и субхронические опытов на *Daphnia magna*, *Lemna minor* и *Allium cepa* сделан вывод об отсутствии токсического влияния культуральной жидкости гриба *Cladosporium sp. 249* в разведениях более 1:200 (5 см³/дм³), что позволяет отнести данный препарат к практически нетоксичным для водных экосистем с учетом норм его возможного практического применения. Отсутствие микроядер и нарушений в делении клеток апикальной меристемы корешков *A. cepa* в высоких концентрациях препарата позволяет также отнести данную культуральную жидкость к безопасным по генотоксичным свойствам.

Ключевые слова: биотестирование, токсичность, *Cladosporium sp. 249*

T.M. Smol'ska¹, M.T. Goncharova², L.S. Kipnis², I.M. Konovets²

¹Institute of Agricultural Microbiology of UAAS, Chernihiv

²Institute of Hydrobiology of NAS of Ukraine, Kyiv

ESTIMATION OF TOXICNESS METABOLITS *CLADOSPORIUM SP. BY 249* METHODS OF BIOTESTING

Acute and sub-chronic tests on *Daphnia magna*, *Lemna minor* and *Allium cepa* do not demonstrate toxic effect of cultural medium of fungi *Cladosporium sp. 249* in dilutions exceeded 1:200 (concentration 5 ml/l). Basing on obtained data conclusion can be made that utilization of the preparation in agriculture practices is safe for aquatic ecosystems considering the norms of its practical implementation.

Key words: biotesting, toxicness, *Cladosporium of sp. 249*.

УДК 556.314+556.388: 543.321

Л.В. СОБКО

Кременецький обласний гуманітарно-педагогічний інститут ім. Тараса Шевченка
вул. Ліцейна, 2, Кременець, 47003, Тернопільська обл., Україна

**ДИНАМІКА ВМІСТУ НІТРАТІВ І НІТРИТІВ У ПИТНІЙ ВОДІ
КРЕМЕНЕЦЬКОГО РАЙОНУ У ВЕСНЯНО-ЛІТНІЙ ПЕРІОД**

Дослідженням вмісту нітритів і нітратів у питній воді Кременецького району впродовж 2005-2009 рр. встановлено, що найменший вміст нітритів був у питній воді на агронавантаженої території, в заповідній і урбанізованій приблизно однаковий, а на техногенно-навантаженої – найвищий. Вміст нітратів найменшим був у воді з заповідника Медобори, а на урбанізованій, агронавантаженої та техногенно-навантаженої територіях зростав, і в останній він є найвищим.

Ключові слова: нітрати, нітрити, питна вода, Кременецький район

Масштабною проблемою сьогодення є прогресуюче забруднення річок, озер та підземних вод. Серед хімічних речовин, що надходять в питну воду і є небезпечними для організмів є нітрати і нітрити. В Україні нараховується майже 29 тис. сільських населених пунктів, в яких мешкає біля 17 млн. осіб. Однак їх благоустрій досить низький, бо лише 17 % населених пунктів мають водогін, 3 % – каналізацію, 24 % сільського населення забезпечено централізованим водопостачанням [2, 7]. Головним джерелом водопостачання в цих поселеннях є колодязі та поверхневі води. Разом з тим, згідно даних Всесвітньої організації охорони здоров'я саме з неякісною питною водою пов'язані 80 % захворювань людей. Одним з найпоширеніших видів забруднень питної води є нітратне. Самі по собі нітрати є нормальним компонентом всіх клітин. Шкідливим є надлишок споживання нітратів,