**УДК [543.393:582.263](574.63)**

# ТОКСИЧНИЙ ВПЛИВ ГЕРБІЦИДІВ НА ЗЕЛЕНУ МІКРОВОДОРІСТЬ *DESMODESMUS SUBSPICATUS*

**Незбрицька І.М., Хижняк С.В.**
Національний університет біоресурсів і природокористування України
вул. Героїв Оборони, 15, 03041, м. Київ
inna_imn@ukr.net
khs2014@ukr.net

Проведено токсикологічну оцінку гербіцидів, що відносяться до хімічного класу хлорацетаніліди, методом біотестування на зеленій мікроводорості *Desmodesmus subspicatus.* Встановлено, що препарати на основі діючої речовини s-метолахлор (960 г/дм$^3$) чи пропізохлор (720 г/дм$^3$ ) характеризуються високою токсичністю щодо представника автотрофної ланки водних екосистем та викликають істотне пригнічення росту та морфологічні зміни культури мікроводорості. Це необхідно враховувати при захисті водної екосистеми від негативного впливу гербіцидних препаратів. *Ключові слова:* гербіциди, токсичність, зелені водорості, ріст.

**Токсическое воздействие гербицидов на зелёную микроводоросль** *Desmodesmus subspicatus***. Незбрицкая И.Н., Хижняк С.В.** Проведена токсикологическая оценка гербицидов, относящихся к химическому классу хлорацетанилиды, методом биотестирования на зелёной микроводоросли *Desmodesmus subspicatus.* Установлено, что препараты на основе действующего вещества s-метолахлор (960 г/дм$^3$) или пропизохлор (720 г/дм$^3$) характеризуются высокой токсичностью по отношению к представителю автотрофного звена водных экосистем и вызывают существенное замедление роста и морфологические изменения культуры микроводоросли. Это необходимо учитывать при защите водной экосистемы от негативного влияния гербицидных препаратов. *Ключевые слова:* гербициды, токсичность, зеленые водоросли, рост.

**Toxic influence of herbicides on the green microalgae** *Desmodesmus subspicatus***. Nezbrytska I., Khyzhnyak S.** The toxicological assessment of herbicides belonging to the chemical class of chlorocetanilides by the method of biotesting on green microalgae *Desmodesmus subspicatus* has been carried out. It has been established that preparations based on the active substance s-metolachlor (960 g/dm$^3$) or propiochlor (720 g/dm$^3$) are characterized by high toxicity with respect to the representative of the autotrophic part of aquatic ecosystems and cause significant growth inhibition and morphological changes in the culture of microalgae. This should be taken into account when protecting the aquatic flora from the adverse effects of herbicide preparations. *Key words:* herbicides, toxicity, green algae, growth.

**Постанова проблеми.** Щороку у світовому сільському господарстві використовують кілька мільйонів тонн пестицидів, що призводить до розповсюдження токсичних речовин у ґрунті та природних водах [3; 4; 7]. Потрапивши до водойм, пестициди включаються у біогеохімічні цикли, у результаті чого водні організми, а також мул накопичують їх у кількості, яка може перевищувати концентрацію у воді [3]. Крім того, при загибелі флори і фауни відбувається десорбція пестициду і його метаболітів, тобто вторинне забруднення водойм. У зв'язку з цим контроль та своєчасне прогнозування можливих наслідків надходження пестицидів у водні об'єкти сприяє безпечному функціонуванню водних систем. Враховуючи широкий спектр та шляхи дії сучасних пестицидів, методи, за допомогою яких можна оцінити їх екотоксичність, повинні володіти високим рівнем чутливості та невисокою специфічністю. Сучасні тенденції в екологічному контролі хімічних речовин усе більше відображають біотичний підхід, зокрема це стосується методу біотестування [1]. Результати чисельних експериментальних досліджень [7; 8; 9; 11] свідчать, що важливим тест-об'єктом для оцінки екотоксичності пестицидів є мікроводорості. Вони характеризуються коротким життєвим циклом, що дозволяє за невеликий термін простежити вплив токсичних речовин на ці організми у ряді поколінь і оцінити його віддалені наслідки. Крім того, висока питома поверхня клітин мікроводоростей сприяє інтенсивному накопиченню токсикантів та, відповідно, швидкій відповіді на їх дію [5].

**Постановка завдання.** У загальному обсязі пестицидів, що використовуються на сьогодні, частка гербіцидних препаратів наближається до 70% [1]. Серед них високою токсичністю для водної біоти характеризуються гербіциди, що відносяться до хімічного класу хлорацетаніліди (аміди, хлорацетаміди) [8] та використовуються до посіву чи сходів культур.

У зв'язку з цим, мета даної роботи – оцінка токсичності сучасних гербіцидних препаратів, що містять діючі речовини класу хлорацетаніліди методом біотестуванням на зеленій мікроводорості *Desmodesmus subspicatus*.

**Матеріал та методи досліджень.** Досліджували два гербіцидних препарати у формі КЕ – концентрат, що швидко емульгується. Для першого препарату вміст діючої речовини s-метолахлор складав 960 г/дм$^3$, а для другого вміст діючої речовини пропізохлор – 720 г/дм$^3$. У табл. 1 наведена фізико-хімічна характеристика діючих речовин гербіцидних препаратів.

Таблиця 1

**Фізико-хімічна характеристика діючих речовин досліджуваних гербіцидів [13; 14]**

| Назва діючої речовини | Хімічна формула | Температура кипіння, °С | Температура плавлення, °С | Розчинність у воді |
|---|---|---|---|---|
| s-метолахлор | $C_{15}H_{22}ClNO_2$ | 334 | -61,1 | при 20°С 480,0 мг/дм$^3$ |
| пропізохлор | $C_{15}H_{22}ClNO_2$ | 277 | 21,8 | при 20°С 90,8 мг/дм$^3$ |

Експерименти проводили згідно з рекомендованою методикою ДСТУ ISO 8692:2010 [2]. У дослідах використовували альгологічно чисту культуру прісноводної одноклітинної водорості *Desmodesmus subspicatus* (=Scenedesmus subspicatus) (Chodat) E.Hegewald & A.Schmidt IBASU-A 303 на логарифмічній стадії розвитку (4-денного віку). Водорість вирощували на стандартному середовищі при температурі 20±2ºС та освітленості 6-6,5 клк (з чергуванням світлового та темнового періодів 16:8) [2].

Основним критерієм стану культури водоростей слугував показник сповільненості росту, який досліджували при 24-, 48-, 72- та 96-годинній експозиції. Препарат із вмістом діючої речовини s-метолахлор (960 г/дм$^3$) додавали у середовище росту культури у концентрації: 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 та 0,5 мг/дм$^3$. Препарат із вмістом діючої речовини пропізохлор (720 г/дм$^3$) додавали у середовище росту культури у концентрації: 0,001; 0,005; 0,01; 0,025 та 0,05 мг/дм$^3$. Контролем слугувала культура водорості, яку вирощували на живильному середовищі без додавання гербіцидів.

Критерієм токсичності є достовірне зниження (на 50% та більше) інтенсивності росту водорості у дослідних варіантах порівняно із контролем [2].

Інтенсивність росту визначали у динаміці шляхом підрахунку чисельності клітин водорості у камері Горяєва за використання методу мікроскопії.

Середню питому швидкість росту обчислювали за формулою:

$$\mu = \ln x_1 - \ln x_0 / t_1 - t_0,$$

де μ– середня питома швидкість росту, $x_0$ – номінальна початкова чисельність клітин; $x_1$ – чисельність клітин, яку вимірювали в період часу $t_1$; $t_0$ – час початку випробувань; $t_1$ – час закінчення випробувань (або час останнього вимірювання).

Відсоток сповільненості росту водорості обчислювали за формулою:

$$I\mu i = ((\mu c - \mu i) / \mu c) \prime 100,$$

де Iμi – відсоток сповільненості росту водорості (швидкості росту) за концентрації проби для випробування і; μс – середня питома швидкість росту у контрольній пробі; μі – середня питома швидкість росту у дослідній пробі.

Середню ефективну концентрацію (ЕС50) розраховували із графіків, які побудовані у координатах (пригнічення росту водорості, % – концентрація препарату мг/ дм$^3$) [2].

Статистична обробка даних проводилася із застосуванням програм MS Excel та STATISTICA 6.0.

Результати досліджень. На рис. 1 представлено чисельність клітин *Desmodesmus subspicatus* у динаміці за впливу гербіциду (діюча речовина s-метолахлор, 960 г/дм$^3$). Отримані результати свідчать (табл. 2), що після внесення до живильного середовища препарату у концентрації 0,01, 0,025 та 0,05 мг/дм$^3$ реєструється тимчасове перевищення кількості клітин відносно контролю (через 24-годинної експозиції), що свідчить про прискорення процесів їх поділу. Однак, надалі спостерігається уже зменшення приросту клітин.

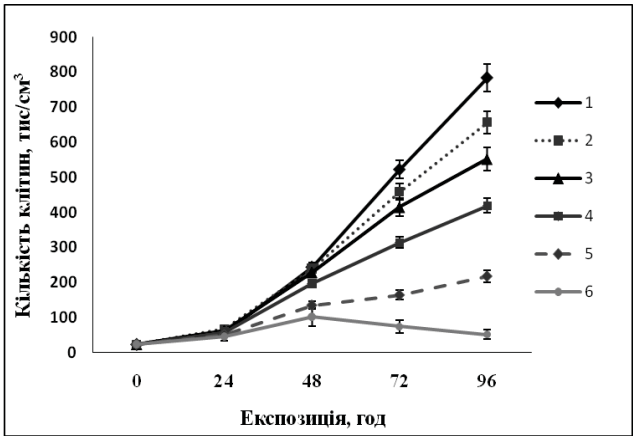


*Рис. 1. Динаміка кількості клітин Desmodesmus subspicatus за дії гербіциду (діюча речовина s-метолахлор, 960 г/ дм$^3$) у різних концентраціях: 1 – контроль; 2 – 0,01 мг/дм$^3$ ; 3 – 0,025 мг/дм$^3$ ; 4 – 0,05 мг/дм$^3$ ; 5 – 0,1 мг/дм$^3$ ; 6 – 0,5 мг/дм$^3$, (M±m, n=5)*

Натомість (рис. 1), із внесенням препарату у концентраціях 0,1 та 0,5 мг/дм$^3$ зменшення чисельності клітин відносно контролю відбувається протягом усього експерименту, особливо на 72- та 96-годинну експозицію ($p \leq 0,01$ за t-критерієм Стьюдента). Згідно з проведеними розрахунками, на 72-гу та 96-ту годину відсоток сповільненості росту культури за концентрації гербіциду 0,5 мг/дм$^3$ становить 63,73 та 77,76 відповідно (табл. 2).

Крім того, за концентрацій 0,05; 0,1 та 0,5 мг/дм$^3$ спостерігаються морфологічні зміни культури (на 72- та 96-годинну експозицію): поява деформованих та знебарвлених клітин, що, очевидно, пов'язано із пригніченням процесів біосинтезу хлорофілу а або посиленням його деградації. Враховуючи те, що мікроводорості є основними продуцентами кисню

та органічної речовини у водоймах, то пригнічення їх функціонування негативно впливатиме на функціонування водної екосистеми у цілому.

Графічно розраховано [2], що медіальна летальна концентрація ($EC_{50}$) гербіцидного препарату (діюча речовина s-метолахлор, 960 г/дм$^3$) для *Desmodesmus subspicatus* протягом експозиції дії препарату зменшується і складає на 72 год – 0,26 мг/дм$^3$, а на 96 год – 0,14 мг/дм$^3$. Згідно з класифікацією СГС [10], він відноситься до високотоксичних речовин (клас небезпечності I).

Таблиця 2

**Пригнічення (%, щодо контролю) росту *Desmodesmus subspicatus* за дії гербіциду (діюча речовина s-метолахлор, 960 г/дм$^3$)**

| Концентрація гербіциду, мг/дм$^3$ | Експозиція, год | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 24 | 48 | 72 | 96 |
| 0,01 | +24,49 | 0,78 | 4,26 | 5,09 |
| 0,025 | +17,08 | 2,81 | 7,45 | 10,09 |
| 0,05 | +9,18 | 9,26 | 16,53 | 18,01 |
| 0,1 | 9,13 | 18,14 | 37,06 | 44,74 |
| 0,5 | 20,74 | 37,59 | 63,73 | 77,76 |

Примітка: знак (+) означає перевищення кількості клітин водорості у дослідному варіанті порівняно з контролем.

Одержані результати щодо високої токсичності s-метолахлору по відношенню до зелених мікроводоростей узгоджуються з даними наукової літератури [8; 10]. Зокрема показано, що s-метолахлор є інгібітором мітозу і за концентрації 0,1 мг/дм$^3$ у культури *Nannochloris oculata Droop* спостерігається пригнічення приросту біомаси на 75%, а також пригнічення біосинтезу ліпідів, оскільки їх вміст зменшується вдвічі порівняно з контролем [8]. Крім того, s-метолахлор характеризується високою токсичністю і для морської діатомової водорості *Ditylum brightwellii* та динофлагеляти *Prorocentrum minimum.* В умовах дії гербіциду для цих водоростей спостерігається істотне пригнічення росту та зниження вмісту основного фотосинтетичного пігменту – хлорофілу а. Медіальна летальна концентрація ($EC_{50}$) s-метолахлор на 72-гу годину експозиції для *Ditylum brightwellii* складає 0,42, а для *Prorocentrum minimum* 0,07 мг/дм$^3$ [9].

Подібні дослідження стосовно росту зеленої водорості *Desmodesmus subspicatus* за дії гербіциду проведено для препарату з діючою речовиною пропізохлор, 720 г/дм$^3$. Перевагою пропізохлору, порівняно з іншими ґрунтовими гербіцидами, є те, що він проявляє високу ефективність незалежно від погодних умов, у тому числі при пониженій вологості ґрунту [14].

Опираючись на отримані результати (рис. 2, табл. 3), можна зазначити, що за концентрації досліджуваного гербіциду 0,001 та 0,005 мг/дм$^3$ істотних змін функціональної активності *Desmodesmus subspicatus* не спостерігається.

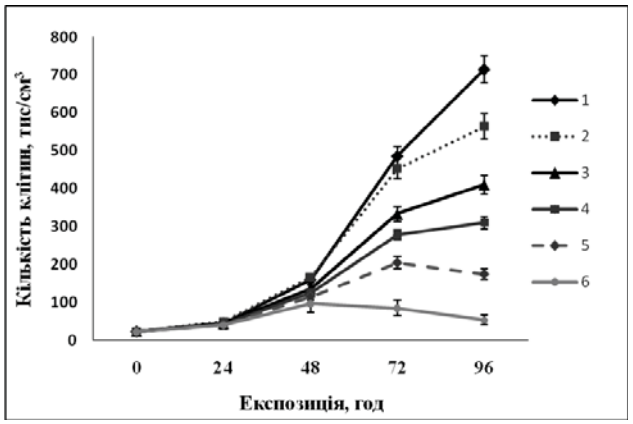


*Рис. 2. Динаміка кількості клітин Desmodesmus subspicatus за дії гербіциду (діюча речовина пропізохлор, 720 г/ дм$^3$) у різних концентраціях: 1 – контроль; 2 – 0,001 мг/дм$^3$; 3 – 0,005 мг/дм$^3$; 4 – 0,01 мг/дм$^3$; 5 – 0,025 мг/дм$^3$; 6 – 0,05 мг/дм$^3$, (M±m, n=5)*

Проте (рис. 2) при концентрації 0,01 мг/дм$^3$ та вище на 72-гу та 96-ту годину експозиції відбувається значне зменшення кількості клітин відносно контрольних значень ($p \leq 0,01$ за t-критерієм Стьюдента). Згідно з проведеними розрахунками, максимальний відсоток сповільненості росту культури реєструється за концентрації гербіциду 0,05 мг/дм$^3$, який на 72-гу та 96-ту годину становить 57,04 та 74,81% відповідно (табл. 3).

Стосовно інших показників стану клітин водоростей, починаючи з 2-ї доби експерименту за дії гербіциду (0,01 та 0,05 мг/дм$^3$ ), спостерігаються морфологічні порушення клітин, які виражаються у появі роздутих та знебарвлених клітин. Під кінець експерименту за концентрації препарату 0,05 мг/дм$^3$ деформація клітин досягала 100%. Отже, негативний ефект дії гербіциду посилюється у залежності від його концентрації.

Таблиця 3

**Пригнічення (%, щодо контролю) росту *Desmodesmus subspicatus* за дії гербіциду (діюча речовина пропізохлор, 720 г/дм$^3$)**

| Концентрація гербіциду, мг/дм$^3$ | Експозиція, год | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 24 | 48 | 72 | 96 |
| 0,001 | +11,46 | +2,01 | 2,35 | 6,87 |
| 0,005 | 2,18 | 7,65 | 12,37 | 16,17 |
| 0,01 | 7,79 | 12,36 | 18,31 | 24,31 |
| 0,025 | 12,43 | 16,79 | 28,33 | 36,47 |
| 0,05 | 19,68 | 25,37 | 57,04 | 74,81 |

Примітка: знак (+) означає перевищення кількості клітин водорості у дослідному варіанті порівняно з контролем.

Графічно розраховано [2], що медіальна летальна концентрація (EC50) гербіцидного препарату (діюча речовина пропізохлор, 720 г/дм$^3$) для *Desmodesmus subspicatus* протягом експозиції його дії зменшується і складає на 72 год – 0,044 мг/дм$^3$, а на 96 год – 0,032 мг/дм$^3$. Згідно з класифікацією СГС [10], препарат можна класифікувати як надзвичайно токсичний, клас небезпечності I.

Отримані результати підтверджують дані наукової літератури, зокрема для зеленої мікроводорості Pseudokirchneriella subcapitata (Korshikov) Hindak EC50 пропізохлору на 72-гу годину експозиції складає 0,0028 мг/дм$^3$ [7].

Таким чином, отримані результати свідчать про високу токсичність гербіцидних препаратів, що містять діючу речовину як s-метолахлор, 960 г/дм$^3$, так і пропізохлор, 720 г/дм$^3$. Причому s-метолахлор за концентрації 0,1 мг/дм$^3$ і вище пригнічує ріст *Desmodesmus subspicatus* та може викликати порушення основних метаболічних процесів у водоростей. Токсичний ефект пропізохлору проявляється при нижчих концентраціях, що може призводити до деформації клітин.

Згідно з даними екотоксикологічних досліджень [11; 12; 15], фітопланктон є основною мішенню ушкоджуючої дії хлорацетанілідів і водорості, порівняно з водними організмами вищих трофічних рівнів, більш чутливі до цієї групи пестицидів. Враховуючи це та опираючись на отримані результати, необхідним є дослідження шляхів впливу гербіцидів на різні групи водоростей, що мешкають як у прісних, так і солоних водоймах для оцінки їх екотоксиксичності.

**Висновки.** Токсичний вплив гербіциду на основі діючої речовини s-метолахлор, 960 г/дм$^3$ проявляється у пригніченні росту та морфологічних змінах культури зеленої мікроводорості *Desmodesmus subspicatus*, а розрахована медіальна летальна концентрація (EC50 ) препарату складає на 72 год – 0,26 мг/дм$^3$, а на 96 год – 0,14 мг/дм$^3$.

Вплив гербіциду на основі діючої речовини пропізохлор, 720 г/дм$^3$ викликає істотне пригнічення росту та морфологічні зміни культури зеленої мікроводорості *Desmodesmus subspicatus*, а розрахована медіальна летальна концентрація (EC50) препарату складає на 72 год – 0,044 мг/дм$^3$, а на 96 год – 0,032 мг/дм$^3$.

Досліджувані гербіцидні препарати, що відносяться до хімічного класу хлорацетаніліди, характеризуються високим ступенем ризику по відношенню до автотрофної ланки водних екосистем. Це потребує проведення екотоксикологічних досліджень гербіцидів на різних групах водоростей.

**Література**


1. Вембер В.В., Дітяшова І.Г. Вплив гербіцидних препаратів на каталазну активність Elodea canadensis Michx. Вісник НТУУ «КПІ». Серія: «Хімічна інженерія, екологія та ресурсозбереження». 2016. № 1. С. 56-60.
2. ДСТУ ISO 8692:2010 Якість води. Визначення сповільненості росту прісноводних одноклітинних зелених водоростей. [Чинний від 2010-12-28]. Київ, 2011. 12 с.
3. Коваль В.В., Наталочка В.О., Ткаченко С.К., Міненко О.В. Динаміка залишкових кількостей пестицидів у водах сільськогосподарського призначення в умовах Полтавщини. Вісник Полтавської державної аграрної академії. 2011. № 1. С. 22–26.
4. Колесник Н.Л. Токсичний вплив пестицидів на біоту прісних водойм України (огляд). Рибогосподарська наука України. 2015. № 4. С. 31–53.
5. Маркина Ж.В., Айздайчер Н.А. Биотестирование воды из залива Петра Великого (Японское море) с помощью микроводоросли Dunaliella salina. Экология. 2008. № 3. С. 196–200.
6. Согласованная на глобальном уровне система классификации и маркировки химической продукции (СГС): Пятое пересмотренное издание. ООН, Нью-Йорк и Женева, 2013. 645 с.
7. Cedergreen N., Streibig J.C. The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae: assessment of predictive factors and hazard. Pest Manag Sci. 2005. 61(12). P. 1152-60.
8. Deng L., Senseman S.A., Gentry T.J. et al. Effect of selected herbicides on growth and lipid content of Nannochloris oculata. Journal of Aquatic Plant Management. 2015. Vol. 53. P. 28–35.
9. Ebenezer V., Ki J.S. Quantification of toxic effects of the herbicide metolachlor on marine microalgae Ditylum brightwellii (Bacillariophyceae), Prorocentrum minimum (Dinophyceae), and Tetraselmis suecica (Chlorophyceae). Journal of Microbiology. 2013. 51(1). P. 136–139.
10. Fairchild J.F., Ruessler D.S., Haverland P.S., Carlson A.R. Comparative sensitivity of Selenastrum capricornutum and Lemna minor to sixteen herbicides. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 1997. 32. P. 353–357.
11. Junghans M., Backhaus T., Faust M., Scholze M., Grimme L.H. Predictability of combined effects of eight chloroacetanilide herbicides on algal reproduction. Pest Manag Sci. 2003. 59. P. 1101–1110.
12. Liu H., Ye W., Zhan X., Liu W. A comparative study of rac- and S-metolachlor toxicity to Daphnia magna. Ecotoxicol Environ Saf. 2006. 63. P. 451–455.
13. PPDB: Pesticide Properties DataBase. S-metolachlor. URL: https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/1027.htm
14. PPDB: Pesticide Properties DataBase. Propisochlor. URL: https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/1380.htm
15. Viegas C.A., Costa C., André S., Viana P., Ribeiro R., Moreira-Santos M. Does S-metolachlor affect the performance of Pseudomonas sp. strain ADP as bioaugmentation bacterium for atrazine-contaminated soils? PLoS One. 2012. Vol. 7(5). P. 1–9.