

УДК 577.34:574.64:504.062

© 2017

*Е.О. Аристархова,**кандидат
біологічних наук**Інститут
агроєкології і природо-
користування НААН*

ВИКОРИСТАННЯ *ALLIUM SEPA* L. ДЛЯ ОЦІНКИ ТОКСИЧНОСТІ ПИТНОЇ ВОДИ

Мета. Удосконалити *Allium* тест (біотест на цибулі), призначений для виявлення токсичності води, завдяки скороченню терміну експозиції цибулин і зниженню трудомісткості тестування. **Методи.** Температурна стимуляція росту листків цибулі та біотестування токсичності питної води за стандартними і власними методиками. **Результати.** Здійснена перед тестуванням стимуляція ростових процесів рослин сприяла підвищенню інформативності біотесту (зокрема зменшенню на 66,67% тривалості експозиції під час визначення коренеутворення) та дала змогу знизити його трудомісткість (завдяки спрощенню визначення тест-реакцій цибулі). **Висновки.** Оцінку токсичності питної води на цибулі звичайній запропоновано проводити після 14-добової температурної стимуляції росту листків з використанням тест-реакцій коренеутворення (за кількістю цибулин із сформованим кореневим пучком після експозиції 1 доба) та листоутворення (за кількістю цибулин з відрослим листям після експозиції 2 доби).

Ключові слова: токсичність питної води, *Allium* тест, температурна стимуляція, коренеутворення, листоутворення, індекс токсичності, гостра токсична дія.

Оцінка токсичності питної води за допомогою біологічних методів досліджень нині є надзвичайно актуальною. Це пов'язано з особливостями вторинного забруднення води під час її знезараження і знебарвлення в умовах водоканалів та очисних станцій. Визнано, що фізико-хімічний аналіз не надає повної інформації про загальну токсичність води [1–5]. Тому у ДСанПіН 2.2.4-171-10 додатково до використання аналітичних методів досліджень рекомендовано включити біотестування як метод, за даними якого розраховується інтегральний показник токсичності питної води — індекс

токсичності, і який пропонується визначати за реакціями окремих тваринних тест-об'єктів (дафній, інфузорій та ін.) [6]. Проте відомо, що тваринні і рослинні організми можуть по-різному реагувати на одні й ті самі компоненти води [4, 5, 7]. Тому доцільно одночасно з тваринними формами тестувати питну воду на рослинах. Найзручнішим у цьому відношенні вважається біотест на цибулі (*Allium sepa* L.). Запропонований у 1937 р. і надалі модернізований, цей тест протягом тривалого часу застосовували для виявлення токсичності стічних і забруднених природних вод, а в останні

десятиліття, через значне погіршення стану джерел водопостачання його почали використовувати і для визначення токсичності питної води [8].

Недоліком біотесту є те, що за стандартом найефективнішим є виявлення гострої токсичності води впродовж 3–5 діб, що пов'язано з фізіологічними особливостями формування кореневої системи цибулі, уповільнення росту якої взято за основну тест-реакцію. Зазначені терміни не зовсім узгоджуються з біотестуванням на уніфікованих організмах нижчих ракоподібних (дафніях і церіодафніях), які є найпоширенішими серед тваринних тест-об'єктів у біотестуванні питної води, і на яких можна тестувати питну воду впродовж 1–2 діб [9]. З огляду на це потрібно удосконалити техніку проведення біотесту на цибулі, адаптувавши його до вказаних термінів.

Мета досліджень — удосконалити *Allium* тест (біотест на цибулі), призначений для виявлення токсичності води, завдяки скороченню терміну експозиції цибулин і зниженню трудомісткості тестування.

Матеріали та методи досліджень. Оцінку гострої токсичності питної води, яка пройшла очистку на КП «Житомирводоканал», проведено у вересні 2014 р. на основі біотесту на цибулі сорту Штуттгартен Різен, методику якого ми удосконалили. Для цього однакові за розміром цибулини ($n=200$) витримували у сухому приміщенні у прозорих скляних ємностях ($0,5 \text{ дм}^3$) за температурної стимуляції ($20 \pm 2,5^\circ\text{C}$) і природної освітленості до відростання листків упродовж 14-ти діб. З них відбирали цибулини-аналоги (з листками завдовжки $3 \pm 0,5 \text{ см}$) для формування трьох дослідних груп. Цибулини ($n=20$) кожної групи вирощували у воді різної якості. Безпосередньо перед проведенням біотестування зрізали відростлі листки до основи цибулин, а також поодинокі сухі корінці. Молоді корінці на цибулі під час пророщування листків не з'являлися.

Для скорочення термінів проведення тестування та зниження його трудомісткості, що є надзвичайно актуальним в умовах водоканалів та очисних станцій, замість вимірювання довжини окремих корінців, визначали кількість цибулин із добре сформованим кореневим пучком і відростлим

після зрізання листям на 1-шу та 2-гу добу. Отримані у досліді дані порівнювали з контролем.

Проби води, відібрані у кількості 1 дм^3 на групу за загальноприйнятими методиками [6, 9], тестували у хімічних ємностях ($0,5 \text{ дм}^3$), у яких щодня замінювали використану воду на воду відповідної якості.

Дослідження проводили за такою схемою:

- контрольна група — проби дехлорованої (24 год) водопровідної води;
- дослідна група D1: проби води — з РЧВ 5000 м³;
- дослідна група D2: проби води — з РЧВ 20000 м³.

Біотестування — за кількістю цибулин зі сформованим кореневим пучком (не менше 10 мм) на 1-шу добу та відростлим після зрізання листям (не менше 5 мм) на 2-гу добу. Тест-об'єкти: цибуля звичайна (*A. cepa*).

Індекс токсичності питної води розраховували за формулою:

$$T = (I_k - I_0) 100 / I_k,$$

де T — індекс токсичності, %; I_k — величина тест-реакції цибулі на контролі; I_0 — величина тест-реакції цибулі у досліді.

Індекс токсичності питної води не має перевищувати 50% [8, 9].

Результати досліджень. Визначення гострої токсичності питної води на уніфікованих рослинних тест-об'єктах упродовж перших двох діб є проблематичнішим порівняно з тваринними, оскільки стандартні умови біотестування за уповільнення росту корінців цибулі передбачають 3–5 діб. Причому тестування саме впродовж 5-ти діб вважається найефективнішим [4]. Тому для виявлення гострого ефекту дії питної води у більш ранні терміни потрібно було активізувати процеси росту та розвитку рослин. Для цього проведено температурну стимуляцію ($20 \pm 2,5^\circ\text{C}$) упродовж 14-ти діб для пророщування листків цибулі за умов перебування їх кореневої системи в анабіотичному стані. Завдяки цьому отримали рослини з листками різної довжини. Серед них відібрали цибулини, що були аналогами не тільки за розміром, а й за швидкістю листоутворення.

Результати досліджень з визначення токсичності питної води за корене-

1. Біотестування токсичності питної води за визначенням коренеутворення у *A. сепа*

Доба дослід/індекс токсичності води (Т)	Кількість цибулин (n=20)					
	Контрольна група		Дослідна група			
			Д1 (РЧВ 5000)		Д2 (РЧВ 20000)	
	шт.	%	шт.	%	шт.	%
1-ша	18	90	8	40	9	50
T ₁			55		50	
Цибуля: з недорозвиненим кореневим пучком	2	10	10	50	8	40
без кореневого пучка	–	–	2	10	1	5
2-га	20	100	12	60	14	70
T ₂			40		30	
Цибуля: з недорозвиненим кореневим пучком	–	–	8	40	6	30

листоутворенням у цибулі, що виявилися досить інформативними показниками та дали змогу підвищити ефективність біотестування і одночасно зменшити витрати часу на його проведення, відображено у табл. 1 і 2.

Отримані у дослідженнях дані свідчать, що температурна стимуляція росту листків цибулі, проведена безпосередньо перед біотестуванням, сприяла швидшому формуванню корневих пучків, ніж у стандартному біотесті (на 66,67% за 1-шу добу). Трудомісткість тестування знизилася завдяки застосуванню як тест-реакції коренеутворення значно простіших для визначення показників: кількості цибулин з нормально сформованою кореневою системою, з недорозвиненим кореневим пучком або зовсім

без нього. В *Allium* тесті потрібно вимірювати довжину кожного корінця, що потребує значно більше часу. До того ж, якщо на непророщених цибулинах біотестування токсичності води впродовж 1-ї доби є малоінформативним, то з пророщуванням листя активізувалися ростові процеси не лише листоутворення, а й коренеутворення, що й виявлено після перенесення цибулин у водні проби.

Найкращі умови для росту та розвитку кореневої системи цибулі — на контролі (див. табл.1). У дослідних групах кількість цибулин з погано розвиненим кореневим пучком після завершення першого тижня досліджень була у 4–5 разів більшою. На 2-гу добу тестування недорозвиненої

2. Біотестування токсичності питної води за визначенням листоутворення у *A. сепа*

Доба дослід/індекс токсичності води (Т)	Кількість цибулин (n=20)					
	Контрольна група		Дослідна група			
			Д1 (РЧВ 5000)		Д2 (РЧВ 20000)	
	шт.	%	шт.	%	шт.	%
1-ша	16	80	9	45	10	50
T ₁			43,75		37,50	
Цибуля: з порушеним розвитком листків	–	–	2	10	2	10
без листків	4	20	9	45	8	40
2	20	100	10	50	11	55
T ₂			50		45	
Цибуля: з порушеним розвитком листків	–	–	3	15	2	10
без листків	–	–	7	35	7	35

кореневої системи у контрольній групі не було, у дослідних групах порушення формування кореневого пучка виявлено у 30–40-ка % цибулин.

Індекси токсичності води, визначені за 1-шу добу досліджень, свідчать про гостру токсичність (50–55%) питної води з РЧВ КП «Житомирводоканал». На 2-гу добу тестування чутливість кореневої системи цибулі до токсичної дії води зменшилась на 15–20%. Тобто компоненти води (головним чином хлорвмісні сполуки, зокрема хлороформ) не стільки затримували ріст корінців, скільки порушували формування кореневого пучка цибулин. Найімовірніше, порушення у кореневій системі цибулі відбувалися також на цитологічному, геномному та/або генетичному рівнях. Тим більше за таких умов немає потреби витрачати час на вимірювання довжини кожного корінця, а доцільніше визначити зміни, за допомогою яких можна виявити цитологічну та генетичну токсичність питної води.

Проведення стандартного *Allium* тесту взагалі не передбачає використання тест-реакції рослин на листоутворення [4], оскільки його тривалість — 3–5 діб, а листя цибулі починає проростати через тиждень від початку тестування. За удосконалення біотесту температурне стимулювання цибулин дало змогу прискорити ріст листків. Для досліджень відбирали рослини з листками довжиною $3 \pm 0,5$ см. Тестування токсичності води було проведене після зрізання листя і перенесення цибулин у проби з водою.

За реакцією листоутворення на 2-гу добу досліджень рослини виявили високу чутливість до токсичності питної води. Установлено, що індекси токсичності, розраховані за 1-шу добу біотестування, мали лише тенденцію до зростання, а за 2-гу добу майже досягли небезпечної межі 45–50% (див. табл. 2).

Компоненти питної води мало впливали на порушення листоутворення цибулі. У значній кількості цибулин з дослідних груп, на відміну від контрольної, ріст листя затримувався. На 2-гу добу тестування на контролі таких рослин взагалі не виявлено, у дослідних групах їх частка становила 35% у кожній. Отже, тест-реакції цибулі за корене- та листоутворенням можуть бути використані для біотестування токсичності води на 1–2-гу добу тільки за умов попередньої температурної стимуляції рослин.

Використання простіших у визначенні тест-реакцій цибулі звичайної дало змогу удосконалити *Allium* тест з виявлення токсичності питної води, що істотно спростило техніку, скоротило терміни та розширило можливості біотестування порівняно з іншими реакціями рослин, які застосовуються для оцінки небезпечності води. Так, визначення тест-реакцій, що відображають формування кореневого пучка та утворення листків за кількісним та якісним складом цибулин, є придатнішим для розрахунку індексу токсичності води, ніж традиційне вимірювання довжини усіх корінців кожної цибулини. За подібного підходу можна відносно швидко (за 2 доби) виявляти гостру токсичну дію води, що добре узгоджується з тестуванням на нижчих ракоподібних (дафніях і церіодафніях) [9, 10]. За цих умов удосконалений біотест на цибулі буде ефективнішим у тест-наборі з уніфікованими організмами, ніж стандартний.

Отже, для оцінки гострої токсичності питної води можливо використовувати тест-реакцію коренеутворення за 1 добу біотестування та тест-реакцію листоутворення за 2 доби. У подальших дослідженнях кореневу систему та листки цибулі доцільно використовувати також для виявлення цито- та генотоксичності води, адже до її складу входять мутагени та канцерогени.

Висновки

Оцінку токсичності питної води на цибулі звичайній запропоновано проводити після 14-добової температурної стимуляції ($20 \pm 2,5^\circ\text{C}$) росту листків з використанням тест-реакцій коренеутворення

(за кількістю цибулин із сформованим кореневим пучком з експозицією 1 доба) та листоутворення (за кількістю цибулин з відрослим листям з експозицією 2 доби).

Бібліографія

1. Пат. 10804 А Україна, МПК G 01 N 33/18; G 01 N 21/76. Спосіб комплексного визначення генетичної безпечності питної води/В.В. Гончарук; заявник та патентовласник В.В. Гончарук; заявл. 5.11.2015, опубл. 11.04.2016, Бюл. № 7.
2. Веялкина Н.Н. Цитогенетические характеристики тест-организмов в комплексной оценке токсичности методами биотестирования/ Н.Н. Веялкина//Актуальные проблемы экологии — 2008: материалы Междунар. науч.-практ. конф., Гродно, 29–31 октября 2008 г.: ГрГУ им. Я. Купалы. — Гродно: ГрГУ, 2008. — С. 128–132.
3. Malik A. Environmental Deterioration and Human Health: Natural and anthropogenic determinants/ A. Malik, E. Grohmann, R. Akhtar. — Dordrecht Heidelberg, London, New York: Springer, 2014. — P. 8–25.
4. Скок С.В. Оцінювання якості питної води м. Херсона методом біотестування/С.В. Скок//Агро-екологічний журнал. — 2015. — № 2. — С. 26–30.
5. Комплексна оцінка токсичності водних зразків за допомогою рослинних і тваринних тест-організмів/М.С. Осмалений, А.М. Головков, А.В. Нанієва, М.Р. Верголяс//Фактори експериментальної еволюції організмів. — 2015. — Т. 16. — С. 74–77.
6. ДСанПІН 2.2.4-171-10 «Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною»/№ 452/17747. — МОЗ України. Державні стандартні норми та правила/[чинний від 1.07.2010 р.]. — 50 с.
7. Аристархова Е.О. Особливості визначення токсичності питної води/Е.О. Аристархова//Агро-екологічний журнал. — 2016. — № 3. — С. 50–55.
8. Fiskesjo G. The Allium test — an alternative in environmental studies : the relative toxicity of metal ions/ G. Fiskesjo//Mutation Res. — 1988. — V. 197. — P. 243–260.
9. Цитофізіологічна експрес-оцінка токсичності води (Біотестування): СТП 17-08. Методика. — Затв. Комунальним підприємством «Житомирводоканал» [дійсний від 10.09.2008 р.]. — Житомир, 2008. — 15 с.
10. ДСТУ 4173-2003 (ISO 6341 : 1996, MOD). Визначення гострої летальної токсичності на *Daphnia magna* Straus і *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (*Cladocera*, *Crustacea*). — Дійс. з 2003-1-07. — К. : Держстандарт України. — 22 с.

Надійшла 19.05.2017.