

УДК 574/577/615

В. Ф. Коваленко<sup>1</sup>, И. А. Злацкий<sup>1,2</sup>**ТОКСИЧНОСТЬ ХЛОРФЕНОЛОВ В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ РЫБ\***

Определены безопасные, сублетальные и летальные концентрации хлорфенольных соединений в водной среде для эмбрионов рыб *Danio rerio* в первые 5—72 часа развития. Установлена степень токсичности хлорфенолов в зависимости от их химического состава. Отмечены особенности токсического действия исследуемых токсикантов на эмбрионы рыб.

**Ключевые слова:** *Danio rerio*, эмбриогенез, хлорфенолы, токсичность.

Проблема определения токсичности хлорфенольных соединений актуальна, поскольку с развитием промышленности они стали широко применяться в различных сферах деятельности человека [10, 15].

Хлорфенолы как экотоксиканты способны накапливаться в тканях и органах гидробионтов, проявляя токсичность для организмов. Биологическая аккумуляция этих соединений является видоспецифической и зависит от дозы и продолжительности воздействия. Точно не установлено, идет аккумуляция хлорфенолов через пищевую цепь или непосредственно из воды. Особенно опасен пентахлорфенол, причем его токсичность для рыб возрастает при снижении рН и содержания кислорода в воде. В свою очередь, повышенное содержание пентахлорфенола значительно снижает содержание кислорода и фитопланктона в водной среде [15]. Концентрация хлорфенолов в естественных водоемах зависит как от природных химических процессов, так и от антропогенного воздействия, они образуются при взаимодействии атомарного хлора (продукта ферментативного и фотолитического окисления хлорид-ионов) и фенолов, входящих в состав гумусовых веществ (в основном гуминовых и фульвокислот). Также хлорфенолы поступают в водные экосистемы со сточными водами целлюлозно-бумажной, химической и фармацевтической промышленности, с хозяйственно-бытовыми стоками [11]. В поверхностных водных объектах они активно сорбируются из воды взвешенными частицами и накапливаются в донных отложениях в значительных концентрациях [7]. Незначительные различия в концентрациях хлорфенолов на входе и выходе из очистных сооружений указывают на очень слабую барьерную роль последних [2]. Хлорирование воды с целью обезза-

\* Публикация подготовлена при поддержке Программы РУДН «5-100».

раживания может повышать ее токсичность в три — шесть раз вследствие образования этих веществ [2].

С увеличением количества атомов хлора в ароматическом кольце возрастает токсичность хлорфенолов, их устойчивость к разложению и способность к биоаккумуляции [17]. Хлорфенолы являются предшественниками более опасных экотоксикантов — диоксинов. Пентахлорфенол и 2,4,6-трихлорфенол обладают выраженными мутагенными и канцерогенными свойствами [9]. В 2003 г. пентахлорфенол включен в список стойких органических загрязнителей [1]. Тем не менее, моно-, ди- и трихлорфенолы широко применяют в производстве азокрасителей и гербицидов, а пентахлорфенол и его натриевая соль — как антисептики для древесины, кожи, целлюлозы и тканей, инсектициды, фунгициды и гербициды.

Нормативные документы разных стран устанавливают разные концентрации хлорфенолов для использования в производстве химических и фармацевтических продуктов [10]. По-видимому, это связано с тем, что особенности их токсического влияния на живые организмы в водной среде не установлены [3, 19].

Эмбрионы рыбы *Danio rerio* рекомендованы как чувствительный биотест, используются в токсикологических исследованиях, фармацевтической токсикологии, молекулярной генетики, биологии развития, нейробиологии и трансгенных исследованиях [4, 6, 8, 13]. Изменения на ранних стадиях при воздействии токсикантов могут приводить к деградации эмбриона, недоразвитости взрослой особи или гибели зародыша. Во многих странах запрещены эксперименты на взрослых особях, поэтому опыты с использованием эмбрионов являются перспективными и весьма информативными [17, 18].

Исходя из выше изложенного, целью нашей работы было оценить степень и характер токсичности моно-, ди-, три- и пентахлорфенолов на эмбриогенез *Danio rerio* в первые 5—72 ч развития.

**Материал и методика исследования.** В экспериментах использовали пентахлорфенол, трихлорфенол, дихлорфенол и монохлорфенол. На основании литературных данных были установлены сублетальные концентрации ( $LC_{50}$ ) исследуемых хлорфенольных соединений для крыс [10]. Согласно этим данным с помощью программы «Пробит-анализа» были подготовлены разведения, кратные 2,15 выше и ниже  $LC_{50}$  для пента- и трихлорфенола и кратные десяти для ди- и монохлорфенола.

В исследованиях использовали половозрелых особей *Danio rerio* (Hamilton, 1822), содержание, кормление и нерест производилось по ранее описанным методикам [4, 13].

На стадиях 4—32 бластомеров оплодотворенную икру отделяли от неоплодотворенной и переносили в чашки Петри ( $d = 7$  см), заполненные водным раствором токсиканта. Каждое разведение тестировалось не менее чем на десяти эмбрионах, из расчета 2 мл раствора на одну икринку. Каждый вариант проводили в трех повторностях. Контролем служили эмбрио-

ны, помещенные в воду без токсиканта. Результаты считали достоверными, если в контроле погибло не более 10% эмбрионов.

Длительность эксперимента составляла 72 ч при температуре инкубирования 26°C, световой режим отвечал смене дня и ночи. Содержание растворенного кислорода было на уровне 5—8 мг/дм<sup>3</sup>, рН — 6,8—8,2. Все исследования проводили в полном соответствии с международными требованиями по этике при работе с живыми организмами, утвержденных директивой ЕС 2010/63ЕС для экспериментов с животными.

На разных стадиях (5, 24, 48 и 72 ч) развития определяли несколько параметров, свидетельствующих о выживании эмбрионов или летальном эффекте токсиканта [6, 12, 15]. Первый признак летальности проявлялся в виде коагуляции яйца, что свидетельствовало о гибели эмбриона. Второй — неотделение хвоста на стадии 24 ч, которое отсрочено также приводит к гибели. На стадии 48 ч должно быть заметное сердцебиение, при его отсутствии эмбрион считается мертвым. Некоторые исследователи обращают внимание также на отсутствие пигментации на стадии 48 ч, что говорит о недоразвитости эмбриона в результате воздействия на него токсиканта [12]. Таким образом, для определения токсичности вещества, мы учитывали количество выживших эмбрионов в определенный период времени.

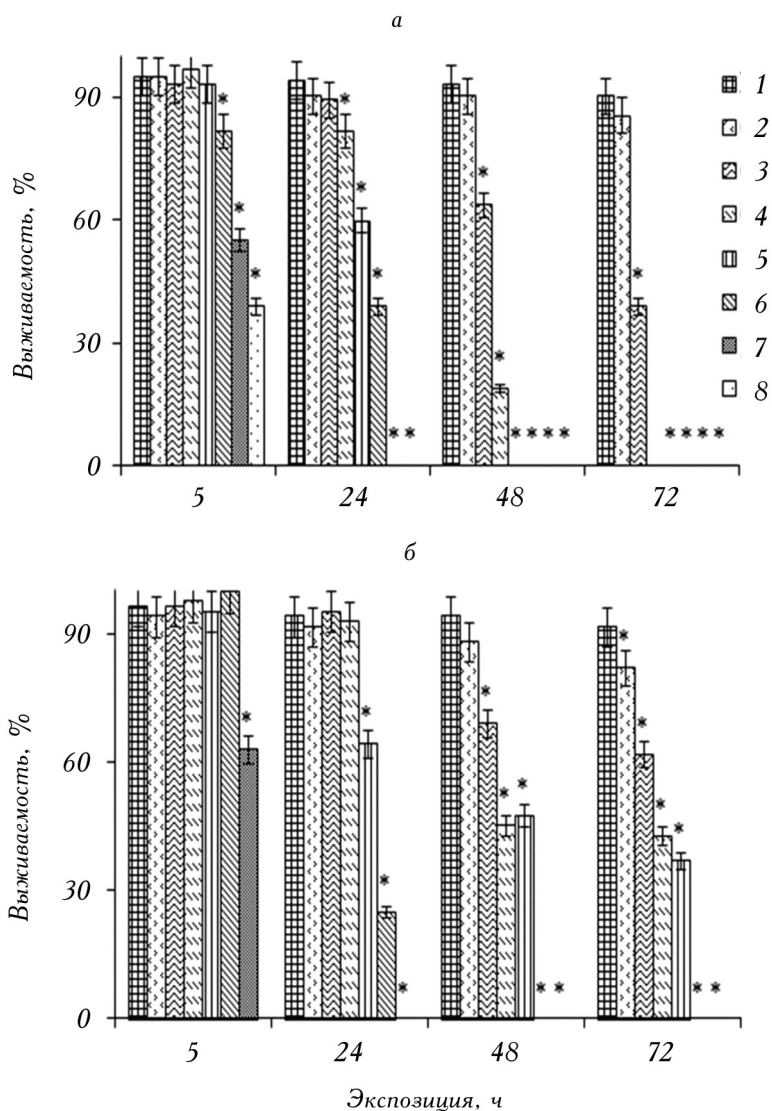
Статистическую обработку результатов исследования проводили общепринятыми методами вариационной статистики [5]. Вероятность разницы между контрольными и опытными измерениями оценивали по *t*-критерию Стьюдента при  $p < 0,05$ . Расчеты и построение графиков выполняли с использованием Microsoft Excel.

### ***Результаты исследований и их обсуждение***

Сублетальная концентрация пентахлорфенола после 72 ч экспозиции установлена в пределах 0,2—0,5 мкМ, концентрации выше 0,5 мкМ оказались летальными (рис. 1, *а*). Следует отметить, что летальное действие токсиканта в концентрациях 0,79, 1,26 и 1,99 мкМ в первые 24 ч не проявлялось, заметные изменения наступили после 48 ч эксперимента. Однако при концентрации 5 мкМ уже после 5 ч выживших эмбрионов было < 50%, при 3,16 и 5 мкМ после 24 ч эмбрионы погибли полностью. Безопасной можно считать концентрацию пентахлорфенола 0,2 мкМ.

Для трихлорфенола после 72 ч действия токсиканта сублетальные концентрации установлены в пределах 0,79—1,26 мкМ (см. рис. 1, *б*). Концентрации выше 1,26 мкМ оказались летальными. При 3,16 и 5,0 мкМ почти все эмбрионы погибли после 24 ч. Трихлорфенол менее токсичен, чем пентахлорфенол, его летальное действие проявилось при меньшем разведении. Его безопасной концентрацией можно считать 0,5 мкМ.

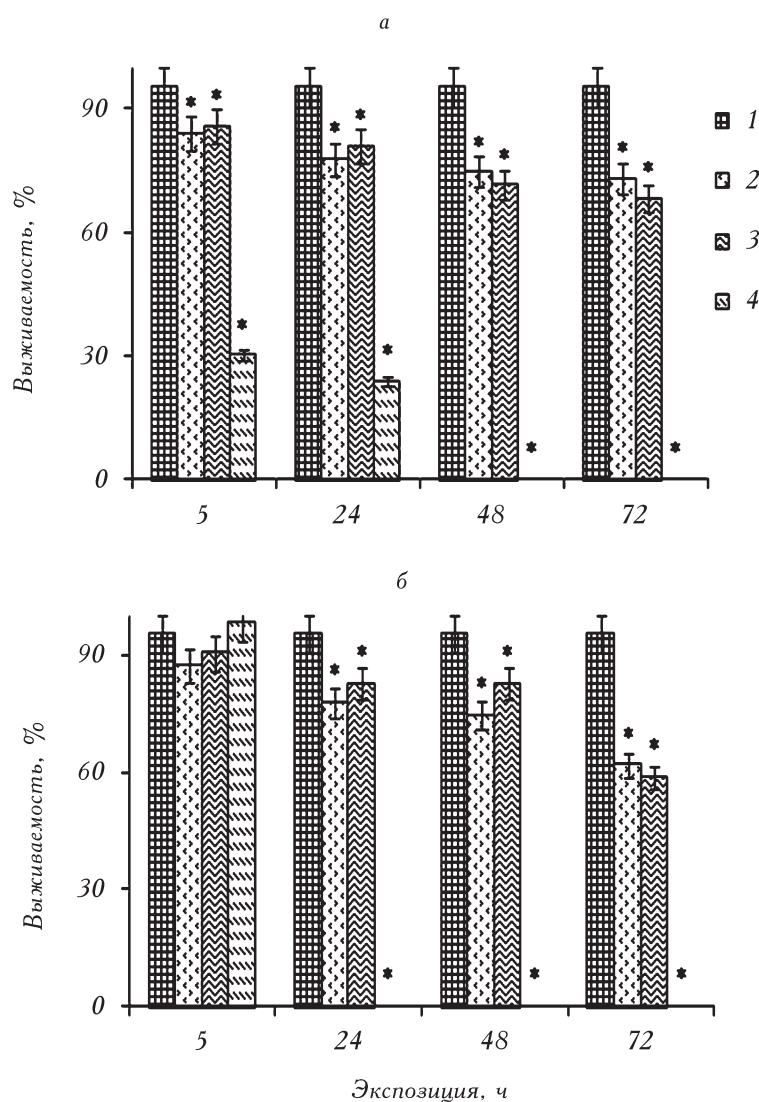
Для дихлорфенола сублетальные концентрации установлены в пределах 1—10 мкМ (рис. 2, *а*), более высокие были летальными. После 5 ч действия при концентрации 100 мкМ выжило менее 40% эмбрионов, а после 48 ч погибли все.



1. Действие пентахлорфенола (а) и трихлорфенола (б) на эмбрионы *Danio rerio* (\*  $p < 0,05$ ). 1 — контроль; 2 — 0,2 мкМ; 3 — 0,5 мкМ; 4 — 0,79 мкМ; 5 — 1,26 мкМ; 6 — 1,99 мкМ; 7 — 3,16 мкМ; 8 — 5,0 мкМ;

Сублетальная концентрация монохлорфенола — 1—10 мкМ (см. рис. 2, б). При концентрации токсиканта 100 мкМ после 5 ч отклонений не регистрировалось, а после 24 ч отмечена полная гибель эмбрионов.

Токсическое действие моно- и дихлорфенолов на эмбрионы рыб *Danio rerio* сходны, но в отличие от предыдущих хлорфенолов они проявляются при меньшем разведении. Скорее всего, это связано с количеством атомов хлора фенольных групп и особенностями биохимического взаимодействия



2. Действие дихлорфенола (а) и монохлорфенола (б) на эмбрионы *Danio rerio* (\* $p < 0,05$ ). 1 — контроль; 2 — 1 мкМ; 3 — 10 мкМ; 4 — 100 мкМ.

на клеточном и молекулярном уровнях, что подтверждается данными и других авторов [7, 9, 14, 16].

### Заключение

Определено токсическое действие хлорфенольных соединений в водной среде на эмбрионы рыб *Danio rerio*. Установлено, что сублетальные концентрации моно-, ди-, три- и пентахлорфенола для эмбрионов *Danio rerio* составляли соответственно 1—10 мкМ, 1—10, 0,79—1,26 и 0,2—0,5 мкМ. Подтверждена прямая

зависимость токсичности хлорфенолов от количества атомов хлора, соответственно наиболее токсичный эффект отмечен у пентахлорфенола. Установлена особенность реакции эмбрионов рыб на исследованные токсиканты, проявляющаяся в их пролонгированном действии, что, по-видимому, связано с их аккумуляцией в эмбрионах.

\*\*

*Визначено безпечні, сублетальні і летальні концентрації хлорфенольних сполук для ембріонів риб *Danio rerio* у перші 5—72 годин розвитку. Встановлено ступінь токсичності хлорфенолів залежно від їх хімічного складу.*

\*\*

*Paper deals with chlorophenols toxicity for the fish embryogenes. Sublethal, lethal and ineffective concentration of chlorophenol for *Danio rerio* embryos were determined. Chemical composition of chlorophenols determined their level of toxicity.*

\*\*

1. Архипчук В.В. Использование методов биотестирования для комплексной оценки качества воды // Экологические аспекты современных технологий охраны водной среды. — Киев: Наук. думка. — 2005. — С. 322—347.
2. Воробьева Т.В., Терлецкая А.В., Кущевская Н.Ф. Стандартные и унифицированные методы определения фенолов в природных и питьевых водах и основные направления их совершенствования // Химия и технология воды. — 2007. — Т. 29, № 4. — С. 370—390.
3. Гангзюра В.П., Грубінко В.В. Концепція шкодочинності в екології. — Тернопіль: Вид-во Терноп. ун-ту, 2008. — 144 с.
4. Злацький І., Гангзюра В. Вплив іонів міді на ембріональний розвиток риб *Danio rerio* (HAMILTON, 1822) // Вісн. Київськ. ун-ту. Біологія. — 2010. — Вип. 13. — С. 43—46.
5. Малков П.Ю. Количественный анализ биологических данных. — М.: Наука, 2005. — 282 с.
6. Hill A.J., Teraoka H., Heideman W. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity // Toxicol. Sci. — 2005. — Vol. 86, N 1. — P. 6—19.
7. Davoren M., Fogarty A.M. Ecotoxicological evaluation of biocidal agents sodium *o*-phenilphenol, sodium *o*-benzyl-*p*-chlorophenol, and sodium *p*-tertiary amylphenol // Ecotoxic. Environ. Saf. — 2005. — Vol. 60, N 2. — P. 203—212.
8. Dergai M., Tsyba L., Dergai O. Microexon-based regulation of ITSN1 and Src SH3 domains specificity relies on introduction of charged amino acids into the interaction interface // Biochem. Biophys. Res. Comm. — 2010 — Vol. 399. — P. 307—312.
9. Dorsey W.C., Tchounwou P.B. Pentachlorophenol-induced cytotoxic, mutagenic and endocrine-disrupting activities in channel catfish, *Ictalurus punctatus* // Int. J. Res. Publ. Health. — 2004. — N 1. — P. 90—99.

10. *Etinosa O. I., Odjadjare E. E., Chigor V. N.* Toxicological profile of chlorophenols and their derivatives in the environment: The public health perspective // *Scientific World J.* — 2013. — 2013. — P. 1—11.
11. *Goncharuk V.V., Syroeshkin A.V., Kovalenko V.F., Zlatskiy I.A.* Formation of a test systems and selection of test criteria in natural waters bioassay // *J. Water Chem. Technol.* — 2016 — Vol. 38, N 6. — P. 349—352.
12. *Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R.* Stages of embryonic development of the zebrafish // *Dev. Dynam.* — 1995. — Vol. 203. — P. 253—310.
13. *Nagel R.* DaT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* — a general model in ecotoxicology and toxicology // *Altex-Alternativen zu Tierexperimenten.* — 2002. — Vol. 19. — P. 38—48.
14. *Repetto G., Jos A.* A test battery for ecotoxicological evaluation of pentachlorophenol // *Toxicol. in Vitro.* — 2001. — Vol. 15, N 4—5. — P. 503—509.
15. *Scott, G.R., Sloman, K.A.* The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity // *Aquat. Toxicol.* — 2004. — Vol. 68. — P. 369—392.
16. *Smith A.D., Bharath A., Mallard C.* The acute and chronic toxicity of ten chlorinated organic compounds to the American flagfish (*Jordanella floridae*) // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* — 1991. — Vol. 20, N 1. — P. 94—102.
17. *Sumpter J.P., Jobling S.* Vitellogenesis as a bio-marker for estrogenic contamination of the aquatic environment // *Environ. Health Persp.* — 1995. — Vol. 103. — P. 173—176.
18. *Vergolyas M.R., Lutsenko T.V., Zlatskii I.A., Goncharuk V.V.* Determination of the quality of artesian waters // *J. Water Chem. Technol.* — 2014. — Vol. 36, N 5. — P. 252—256.
19. *Yen J.H., Lin K.H., Wang Y.S.* Acute lethal toxicity of environmental pollutants to aquatic organism // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* — 2002. — Vol. 52, N 2. — P. 113—116.

<sup>1</sup> Институт коллоидной химии и химии воды НАН Украины, Киев

<sup>2</sup> Российский университет дружбы народов, РФ

Поступила 27.11.17