

Toxikologické a hygienické posouzení krmiv kontaminovaných herbicidem obsahujícím glyfosát s využitím bioluminescenčních mikroorganismů



Kurbatska, O., PhD (veterinární medicína); Orobchenko, O., PhD., doktor věd (veterinární medicína), vedoucí vědecký pracovník
Laboratoř toxikologického monitoringu, Národní vědecké centrum Ústav experimentální a klinické veterinární medicíny, Hryhoriya Skovorody tř. 83, 61000 Charkiv, Ukrajina, e-mail: toxy-lab@ukr.net

ÚČEL STUDIE

Účelem naší práce bylo provést toxikologické a hygienické posouzení krmiv s různým obsahem herbicidu obsahujícího glyfosát na základě studia jeho vlivu na luminiscenci *Photobacterium phosphoreum*.

ÚVOD

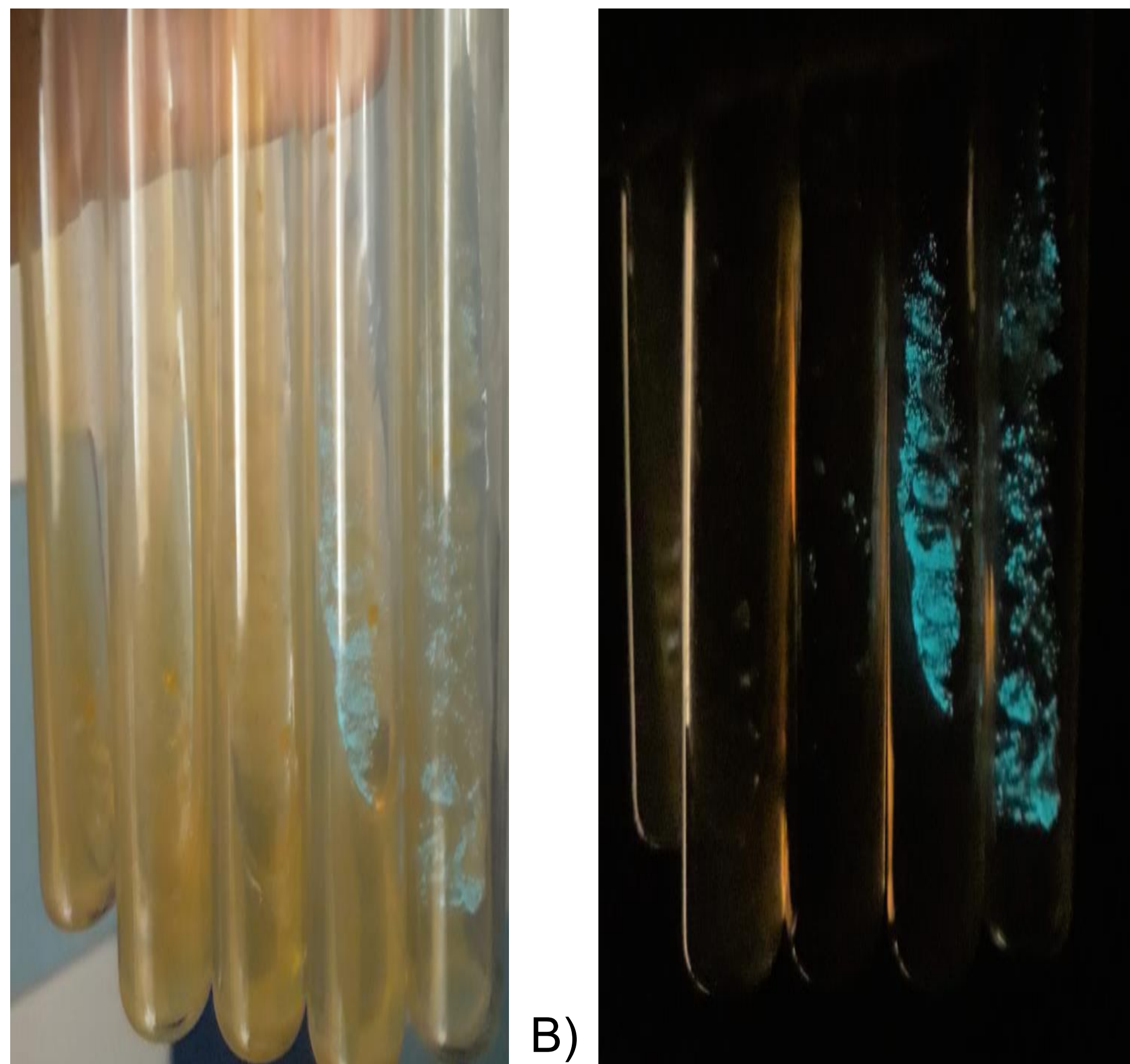
Množství použitých chemických přípravků k hubení plevelů (herbicidů) se neustále zvyšuje a je dominantou moderního průmyslového zemědělství (v současné době se podílí herbicidy 47,5 % na celkovém objemu použitých pesticidů), které představuje závažný ekologický a zdravotní problém v zemědělských systémech po celém světě (Clapp, 2021). Samotný glyfosát představuje 33 % herbicidů používaných v Evropě, přičemž jedna třetina je použita k ošetření jednoletých plodin a polovina k ošetření plodin víceletých (Antier et al., 2020).

Navzdory tomu, že hlavním účelem aplikace herbicidů je ničení plevelů, jejich aktivní látky (AL) mohou mít mnoho přímých i nepřímých účinků na necílové organismy: letální a subletální účinky pro včely medonosné (Straw et al., 2021), žížaly (Zaller et al., 2021) a ptáky (Gill et al., 2018). To znamená, že mohou vstoupit do potravního řetězce a tím také vstoupit do lidského organismu s potravou a vodou. Odborní literatura uvádí tyto informace zejména pro glyfosát, kyselinu 2-methyl-4-chlorofenocetovou a metolachlor (Čech et al., 2022).

K vyřešení tohoto problému v Evropě byla formulována „Strategie z farmy na vidličku“, jejímž hlavním cílem je snížit celkové používání pesticidů a rizik z nich plynoucích do roku 2030 o 50 % (EC COM/2020/381, 2020) a stanoví jejich maximální přípustné množství v krmivech pro hospodářská zvířata (Čech et al., 2022).

Aby nedocházelo ke zkrmování nadměrných množství herbicidů, používá se k jejich screeningu a sledování v krmných surovinách i hotových krmivech řada přesných laboratorních metod a stupeň nebezpečnosti krmiva je v současnosti určován tzv. metodou biotestu na různých modelech: cílová a laboratorní zvířata, hmyz, korýši, nálevníci, bakterie, buněčné kultury atd. (Gerssen et al., 2019).

Světová vědecká komunita je zároveň nakloněna vývoji alternativních testů toxicity pro minimalizaci použití živých organismů v experimentech (3Rs (Replace, Reduce, Refine) (Gorzalczany a Rodriguez Basso, 2021). Slibné je využití fotobiosenzorů v tomto směru: biotesty využívající živé bioluminescenční bakterie, které se od ostatních liší tím, že intenzita jejich luminiscence je měřena jako parametr vitální aktivity (Li et al., 2020).



Obrázek 1: Intenzita luminiscence *Ph. phosphoreum*, A) za normálního osvětlení, B) ve tmě

Tabulka 1. Klasifikace toxicity látky hodnotou T

Úrovně	Hodnota T	Závěr o stupni toxicity
1	méně než 20	maximální stupeň toxicity
2	od 20 do 50	vzorek je toxický
3	je rovno nebo větší než 50	vzorek je vysoce toxický

PODĚKOVÁNÍ

Autoři vyjadřují upřímnou vděčnost Tatianě Golovach, kandidátce biologických věd, vedoucí depozitáře mikroorganismů Ústavu mikrobiologie a virologie pojmenovaného po D. K. Zabolotny z Národní akademie věd Ukrajiny za dodání kmene *Photobacterium phosphoreum* (IMB B –7071; Sq3) ke studiu)

LITERATURA

K dispozici u autorů

MATERIÁL A METODIKA

Herbicid Agroschyt Super (forma přípravku: rozpustný koncentrát) obsahuje jako AL draselnou sůl glyfosátu, 676,0 g/l. Systémový herbicid s celkovým účinkem pro hubení jednoletých a vytrvalých plevelů, pro stromové a keřové vegetace. Jeho použití je na území Ukrajiny povoleno.

V podmínkách studie byla jako „matrice“ použita krmná směs, která neměla toxické vlastnosti a neobsahovala glyfosát. Herbicid byl do matrice přidáván v různých koncentracích (pět úrovní získaných ředěním ethanolem: 0,1; 0,5; 1,0 (maximální přípustný obsah); 2,5 a 5,0 mg/kg krmiva.

Část kontrolních a experimentálních „matric“ o hmotnosti 10,0 g byla přidána do skleněných lahvíček, k experimentálním vzorkům bylo přidáno příslušné množství herbicidů a dále byl pro extrakci přidán 96% ethanol o objemu 20,0 cm³. Následně byly vzorky inkubovány 24 hodin, následovala centrifugace při 1,5-2,0 × 1000 ot./min po dobu 10 minut, poté se odebral supernatant, který se následně přidal v množství 0,02 cm³ do (předem připravené) květy luminometru s kultivační kapalinou o objemu 1,0 cm³.

Jako testovací kulturu jsme použili lyofilizovanou kulturu *Photobacterium phosphoreum* (kmen IMB B-7071; Sq3), získanou z Depozitáře mikroorganismů Ústavu mikrobiologie a virologie pojmenovaného po D.K. Zabolotny z Národní akademie věd Ukrajiny (Kyjev).

Luminiscence *Ph. phosphoreum* byla měřena na luminometru EMILITE-1003 A (BioChemMac, Ruská federace). Během testování byla zaznamenávána doba expozice a změna intenzity luminiscence po 20-25 minutách. Měření byla prováděna ve dvojicích kontrola-experiment. Pro získání spolehlivých hodnot jsme zkoumali šest replikátů kontrolních a experimentálních vzorků. Ke kvantifikaci stupeň toxicity vzorku vzhledem k účinku různých hladin herbicidů na luminiscenci *Ph. phosphoreum* se používá index toxicity (T).

Toxicita herbicidů pro bakterie *Ph. phosphoreum* je stanovena na základě stupně inhibice jejich luminiscence vlivem různých dávek. To znamená, že pokles intenzity bioluminiscence je úměrný toxickému účinku herbicidu.

Index toxicity "T" odráží koncentraci herbicidu, která způsobí zhasnutí luminiscence biosenzoru (bakterie *Ph. phosphoreum*) při fixní době expozice testovaného vzorku. Jako horní limitní ukazatel byl stanoven 50% pokles intenzity luminiscence bakterií oproti kontrole (maximální poloviční efektivní koncentrace, EK₅₀), který se projevuje indexem toxicity 50 a umožňuje klasifikovat vzorky s indexem toxicity 50 a vyšším jako „vysoce toxické“. Spodní hranice indexu toxicity je 20, což znamená, že luminiscence bakterií je snížena o 20 % oproti kontrole a umožňuje nám klasifikovat vzorky s indexem toxicity 20 a nižším jako „netoxické“. Všechny hodnoty "T" mezi 20 a 50 umožňují, aby byly vzorky klasifikovány jako "toxické", u kterých lze při správném naředění snížit toxicitu (Tabulka 1).

Výsledky byly zpracovány variační statistikou za použití analýzy variačního softwarového balíčku (ANOVA) StatPlus 5 (6.7.0.3) (AnalystSoft Inc., USA). Spolehlivost získaných výsledků byla hodnocena Fisherovým kritériem na úrovni spolehlivosti 95,0 % (P<0,05).

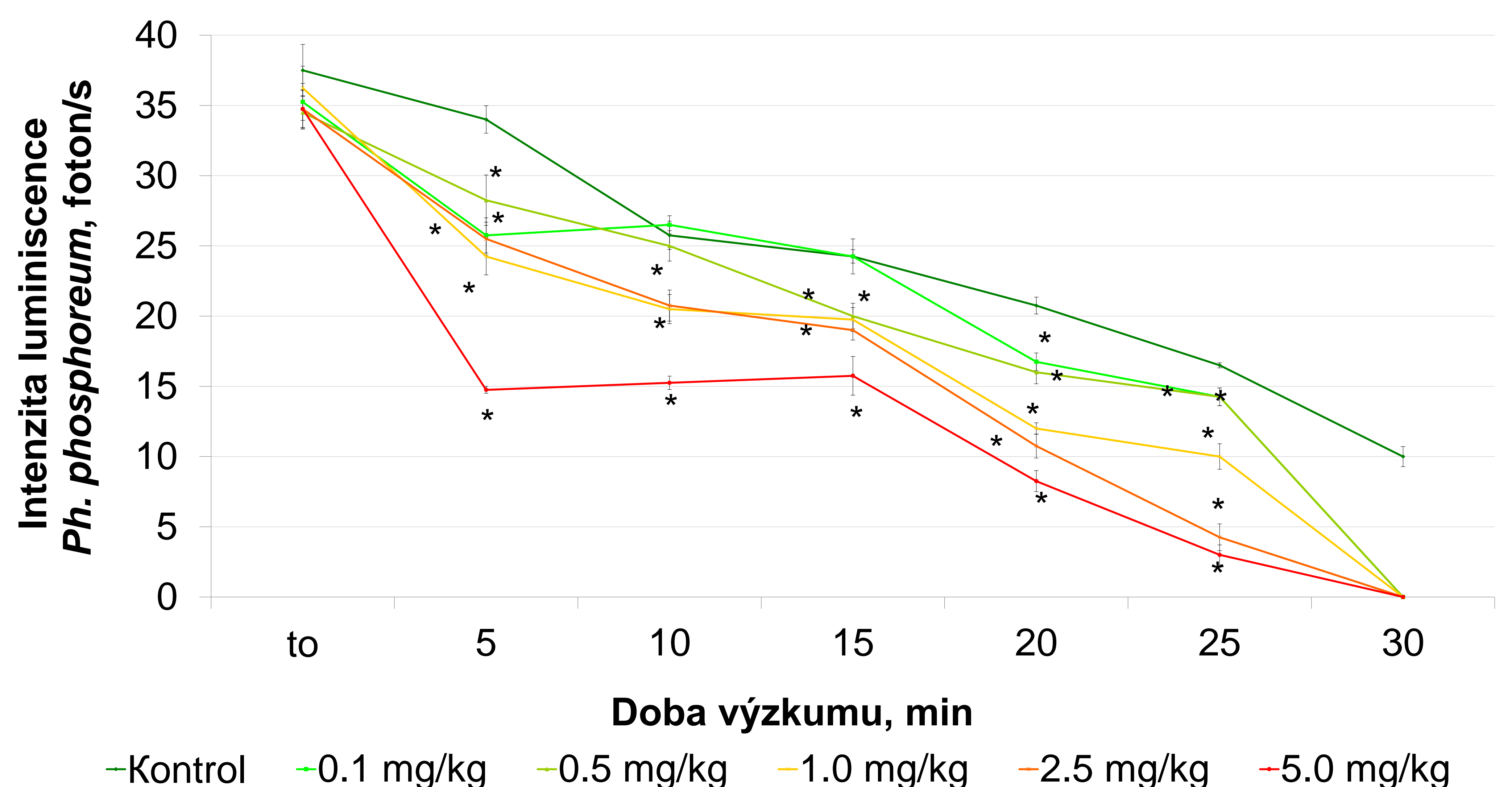
VÝSLEDKY A DISKUZE

Po aplikaci krmných extraktů s různými hladinami herbicidu Agroschyt Super na testovanou kulturu byl 5 minut po aplikaci pozorován pravděpodobný pokles intenzity luminiscence (p<0,05): pro 0,1 mg/kg krmiva – o 24,3 %, u 0,5 mg/kg krmiva – o 16,9 %, u 1,0 mg/kg krmiva – o 28,7 %, pro 2,5 mg/kg krmiva – o 25,0% a pro 5,0 mg/kg krmiva – o 56,6 % vzhledem ke kontrole. Po 10 minutách experimentu při obsahu 1,0; 2,5 a 5,0 mg/kg krmiva se intenzita luminiscence snížila (p<0,05) o 20,4; 19,4 a 40,8 %, v daném pořadí, vzhledem ke kontrole. Po 15 minutách experimentu při obsahu 0,5; 1,0; 2,5 a 5,0 mg/kg krmiva se intenzita luminiscence snížila (p<0,05) o 17,5; 18,6; 21,6 a 35,1%, v daném pořadí, vzhledem ke kontrole. Po 20 minutách experimentu byl pozorován pravděpodobný pokles intenzity luminiscence (p<0,05): pro 0,1 mg/kg krmiva – o 19,3 %; u 0,5 mg/kg krmiva – o 22,9 %; u 1,0 mg/kg krmiva – o 42,2 %; pro 2,5 mg/kg krmiva – o 48,2 % a pro 5,0 mg/kg krmiva – o 60,2 % vzhledem ke kontrole. Podobný vzorec byl pozorován po 25 minutách experimentu: pokles intenzity luminiscence (p<0,05): pro 0,1 mg/kg krmiva byl 13,6 %; pro 0,5 mg/kg krmiva – 13,6 %; pro 1,0 mg/kg krmiva – 39,4 %; pro 2,5 mg/kg krmiva – 74,2 % a pro 5,0 mg/kg krmiva – 81,8 % vzhledem ke kontrole. V posledním období výzkumu, při aplikaci herbicidu Agroschyt super ve všech dávkách, byla pozorována úplná inhibice luminiscence *Ph. phosphoreum* (obr. 2).

Procento snížení intenzity luminiscence *Ph. phosphoreum* odpovídalo indexu toxicity (T), což umožnilo provést toxikologické hodnocení krmiva s různými hladinami super herbicidu Agroschyt Super. Při obsahu léčiva 0,1 mg/kg krmiva byl tedy index toxicity pro 20-25 min (doporučená doba působení fluorescenčních indikátorů) v průměru 16,5; s obsahem 0,5 mg/kg krmiva – 18,3; pro 1,0 mg/kg krmiva (maximální přípustný obsah) – 40,8; pro 2,5 mg/kg krmiva – 61,2 a pro 5,0 mg/kg krmiva byl průměrný index toxicity 71,0. Získaná data umožňují konstatovat, že krmivo obsahující herbicid Agroschyt super v množství nižším než 0,1 až 0,5 mg/kg krmiva včetně je netoxické (index toxicity menší než 20), s obsahem 1,0 mg/kg krmivo toxické (index toxicity od 20 do 50) a při obsahu 2,5 mg/kg a vyšším je krmivo vysoce toxické (index toxicity větší než 50).

Bioluminescenční mikroorganismy jsou dnes poměrně široce používány pro toxikologické hodnocení objektů životního prostředí. Nejpoužívanější je biotest Microtox (Strategic Diagnostics, Inc., Německo, Spojené státy americké) založený na *Ph. phosphoreum*, kmen NRRL-B-11177, někdy také nazývaný *Vibrio fischeri*, kmen NRRL-B-11177, který byl vyvinut první a je široce používán v laboratorních a terénních studiích ke kontrole kvality průmyslových a přírodních vod v několika zemích, ke stanovení stupně toxicity chemických sloučenin a vytvářených farmakologických přípravků (Johnson, 2005).

Vurm et al. (2021) stanovili účinek glyfosátu na luminiscenci *Aliivibrio fischeri*: EK₅₀ byla 0,811 µg/ml. V našich studiích byla EK₅₀ herbicidu Agroschyt Super (AL draselná sůl glyfosátu) přibližně na úrovni 1,0 až 2,5 mg/kg krmiva (procento inhibice 40,8, resp. 61,2 %), což z hlediska konečné koncentrace v extraktu byla v průměru 0,875 µg/ml, to znamená, že námi získaná data jsou v souladu s literárními údaji.



Obrázek 2: Dynamika intenzity luminiscence *Ph. phosphoreum* za podmínek zkrmování různých dávek herbicidu Agroschyt Super (draselná sůl glyfosátu) (M±m, n=6, * – p<0,05 – vzhledem ke kontrole)

ZÁVĚR

Luminiscenci *Photobacterium phosphoreum* lze využít pro rychlé (do 30 minut) toxikologické hodnocení krmiv kontaminovaných herbicidy, které zabrání ekonomickým škodám z nedostatku zemědělských produktů v důsledku otravy a zajistí bezpečnost výsledných produktů pro člověka. Získaná data naznačují potřebu dalšího výzkumu toxikologických charakteristik glyfosát obsahujících herbicidů v těle laboratorních a užitkových zvířat, případně s další revizí (směrem dolů) maximálních přípustných úrovní v krmivech.