

[https://doi.org/10.18524/2077-1746.2024.1\(54\).309035](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2024.1(54).309035)

УДК 575:574.24:574.524:576.08

М. К. Кузнецов, студент; <https://orcid.org/0009-0002-2661-3828>

О. Л. Січняк, к.б.н., доцент; <https://orcid.org/0000-0002-7014-3053>

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
біологічний факультет, кафедра молекулярної біології, біохімії та генетики,
Одеса, вул. Дворянська, 2, 65082, Україна

ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНОТОКСИЧНОГО ВПЛИВУ ГЕРБИЦИДУ «ФЕДЕРАЛ» НА МОДЕЛЬНОМУ ОБ'ЄКТІ *DANIO RERIO*, HAMILTON, 1822. ПОВІДОМЛЕННЯ 1. ВПЛИВ ВИСОКИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ

Досліджували дію гербіцидного препарату «Федерал» у концентраціях 5, 10 та 15 мг/л на модельному об'єкті *Danio rerio* в умовах *in vivo*. Виявлено достовірний вплив досліджуваних концентрацій препарату на збільшення частоти еритроцитів з мікроядрами. Генотоксичний вплив посилювався із збільшенням тривалості обробки до 96 годин. Подальше збільшення тривалості обробки не вплинуло суттєво на збільшення частоти клітин з мікроядрами.

Ключові слова: гліфосат, дикамба, мікроядерний тест, *Danio rerio*

Останні десятиріччя хімізація сільського господарства набуває все більшого розповсюдження та застосування. Незважаючи на проєкти по виробництву органічної сільськогосподарської продукції, цей напрям залишиться лише окремою галуззю для обраних. Потреба забезпечення прогресивно зростаючого населення планети продовольством не залишає альтернативи використанню пестицидів у сільськогосподарському виробництві. На частку гербіцидів приходиться понад 60% усіх пестицидів, що застосовуються у сільському господарстві [38]. Розповсюдження генетично модифікованих організмів, особливо серед технічних культур, сприяє інтенсивному застосуванню гербіцидів. Зокрема, вирощування генетично модифікованих сортів кукурудзи, сої, бавовника, стійких до синтетичних ауксинів спричинило збільшення застосування цих препаратів [20].

Але гербіциди є забруднювачами поверхневих вод та ґрунтів, а їх окремі форми навіть здатні забруднювати повітря. При застосуванні в сільськогосподарських районах гербіциди можуть зазнавати мікробного та небіологічного розкладання, поглинання рослинами, можуть адсорбуватися та переноситися поверхневими водами на відстань від місця застосування. Персистенція цих сполук у довкіллі, зумовлена їхньою ліпофільністю, приводить до біоаккумуляції та біомагніфікації гербіцидів. Це може мати наслідки для здоров'я людей

навіть у віддалених від місць застосування районах. Все це привертає увагу до екологічних наслідків використання гербіцидів [18]. Великою проблемою у застосуванні гербіцидів є їх вплив на нецільові організми. При цьому увага, насамперед, приділяється питанню токсичності для ссавців. Проблема полегшується тим, що зазначені хімічні речовини перешкоджають біохімічним шляхам, які відсутні у ссавців: фотосинтез, біосинтез незамінних амінокислот або біосинтез хлорофілу [30].

Гліфосат є найбільш широко використовуваним гербіцидом. У світі існує понад 750 препаратів на основі гліфосату [12]. Однак постійно обговорюються питання відносно його безпеки, можливі побічні ефекти та вплив на інші організми. З'ясовано, що гліфосат може впливати на мікробіоту траводічних тварин, які живляться нецільовими сільськогосподарськими культурами [11]. Ще однією проблемою широкого застосування гліфосату є набуття бур'янами стійкості до цього препарату. Чисельність стійких до гліфосату бур'янів склала 424 види [13]. Разом з тим, у дослідженнях на культурі лімфоцитів людини з'ясовано, що в діапазоні концентрацій 20–40 мкмоль/л гліфосату не виявлено суттєвих змін ані в мітотичному і проліфераційному індексах, ані в частоті хромосомних аберацій, ані в частоті сестринських хроматидних обмінів. Лише при збільшенні концентрації гліфосату до 200 мкмоль/л спостерігали вірогідне збільшення лише частоти сестринських хроматидних обмінів [33]. Дослідження дії гліфосату та препаратів на його основі, проведені після 2015 року вказують на наявність генотоксичних ефектів. Зокрема, всі сім досліджень *in vivo* на людях пов'язують канцерогенез із дією зазначених препаратів [4].

Раніше також повідомлялося, що Раундап (глифосат) в рослинних (*Crepis capillaris*) і тваринних (культура клітин кісткового мозку миші) тест-системах не викликав хромосомних аберацій або утворення мікроядер [8]. Хоча, на основі аналізу даних спектрального аналізу у *Allium cepa*, висловлювалася думка, що гліфосат на пряму взаємодіє з ДНК і викликає генотоксичні ефекти [36]. Інші дослідження чистого гліфосату і препаратів на його основі у переважній більшості заперечували генотоксичність цих речовин в експериментах на бактеріях та ссавцях. Суперечливі результати отримані при мікроядерному аналізі тварин інших груп. При цьому, можливі негативні ефекти відносять на рахунок поверхнево-активних речовин, які є компонентами комерційних препаратів, а сам гліфосат вважається безпечним для людини та довкілля [16]. Однак є відомості про генотоксичність як самого гліфосату, так і препаратів на його основі, виявлену комет-аналізом в лімфоцитах людини. Більша генотоксичність препаратів на основі гліфосату вказує, на думку авторів, на генотоксичну активність доданих у препарати ад'ювантів [2]. При застосуванні високих концентрацій гліфосату [19] в культурі лімфоцитів *Chaetophraetus villosus* спостерігали достовірне збільшення частоти хромосомних аберацій та сестринських хроматидних обмінів, а також порушення проліферації клітин в діапазоні концентрацій діючої речовини 280–560 мкмоль/л. При збільшенні концентрації до

1120 мкмоль/л живих клітин в культурі не спостерігалось. В проведеному [9] метааналізі з'ясовано, що чистий гліфосат мав меншу генотоксичність, ніж комерційні суміші.

Метою роботи є дослідження впливу високих концентрацій гербіцидного препарату на основі гліфосату «Федерал» на тест-об'єкті *Danio rerio*, Hamilton, 1822. Під високими концентраціями розуміються такі, що набагато перевищують гранично допустиму концентрацію у водному середовищі.

Матеріали та методи дослідження

У дослідженні використовували комбінований системний гербіцид суцільної дії «Федерал» (ТОВ-фірма «Агрохімпак», Україна), до складу якого входять: гліфосат (CAS No. 1071–83–6) у формі ізопропіламіної солі, 480 г/л та дикамба (CAS No. 1918–00–9), 60 г/л. Допоміжні речовини згідно законодавства, на жаль, вважаються комерційною таємницею виробника і не повідомляються.

Як тест-об'єкт в даному дослідженні використовували *Danio rerio*, Hamilton, 1822. Рибки даніо традиційно вважаються потужною тваринною моделлю завдяки їхньої генетиці та ембріології, а в останній час вони стали відігравати важливу роль у дослідженнях навколишнього середовища, фармацевтичному скринінгу та фізіологічному аналізі. Великий обсяг робіт показав, що механізми та гени риб та ссавців дуже консервативні, що відкриває можливості для генетичного або низькомолекулярного скринінгу [14].

Для проведення експерименту з одного стада *D. rerio* було здійснено п'ять закупок по 35 рибок у віці близько трьох місяців. Кожну партію дорощували у маточному акваріумі протягом місяця з метою акліматизації. Умови утримання були стандартними (температура $28 \pm 0,5$ °C, рН 7.0–8.0, фотоперіод – 14 годин світла: 10 годин темряви). Рибок годували один раз на день комерційним пластівчастим кормом. Культуральну воду оновлювали кожні 2 дні попередньо відстояною протягом чотирьох діб водопровідною водою.

Для моделювання генотоксичного впливу із маточного акваріума відбирали дослідні групи в ємності із розрахунку особина / л. Групи піддавали впливу гербіциду протягом 48, 96 та 144 годин у концентрації 5, 10 та 15 мг/л (у перерахунку на гліфосат). Зазначені концентрації відповідають 30, 60 та 90 мкмоль/л гліфосату, відповідно. Для позитивного контролю використовували обробку сульфаніламідом в концентрації 20 мг/л протягом 48, 96 та 144 годин. Для негативного контролю брали інтактних особин з маточного резервуару. В кожному варіанті досліду використано 10 рибок.

Після експозиції усіх особин груп швидко умертвляли у крижаній воді, після чого відбирали зразки крові шляхом відрізання хвостового плавця для приготування тимчасових препаратів еритроцитів. Для фарбування зразків використовували азур-еозин за Романовським (ТОВ “Генезіс”, Україна). Підра-

хунок кількості клітин з мікроядрами виконували з використанням світлового мікроскопу MICROmed XS-2610 LED розраховуючи кількість клітин з мікроядрами на 2000 еритроцитів у одній рибки.

Статистичну обробку виконували, враховуючи середні значення та похибки середніх. Для аналізу результатів використовували критерій Стьюдента [10].

Результати дослідження та їх обговорення

Результати експерименту наведені у табл. 1. При обробці сульфаніламідом суттєво зростала частота клітин з мікроядрами (рис. 1). Це очікуваний результат. Сульфаніламід є конкурентним антагоністом та структурним аналогом пара-амінобензойної кислоти у синтезі фолієвої кислоти, необхідної для подальшого синтезу ДНК у бактерій [37], що в кінцевому підсумку інгібує утворення ди- та тетрагідрофолату, а згодом інгібує синтез ДНК та поділ або реплікацію клітин [26]. У клітинах тварин, які не синтезують фолат, порушень його синтезу немає. Однак вони споживають фолієву кислоту з їжею, а вона виконує свої функції тільки після її перетворення на тетрагідрофолієву кислоту під дією дигідрофолатредуктази [3]. Порушення синтезу тетрагідрофолату сульфаніламідом може викликати аномалії в ДНК через порушення метилювання, що обмежує синтез ДНК [34]. Саме це й зумовило вибір даного препарату у якості позитивного контролю.

Таблиця 1

Частоти клітин з мікроядрами (%) при різних варіантах обробки гербіцидом «Федерал»

Варіант обробки	Тривалість обробітку		
	48 год.	96 год.	144 год.
Негативний контроль	0,14±0,03		
Позитивний контроль	1,01±0,07***	1,05±0,07***	1,13±0,07***
«Федерал» 5 мг/л	0,23±0,03*	0,36±0,04***	0,44±0,05***
«Федерал» 10 мг/л	0,28±0,04**	0,69±0,06***	0,74±0,06***
«Федерал» 15 мг/л	0,73±0,06***	0,91±0,07***	0,97±0,07***

* – відмінність від негативного контролю при $p \leq 0,05$;

** – відмінність від негативного контролю при $p \leq 0,01$;

*** – відмінність від негативного контролю при $p \leq 0,001$

Усі варіанти обробки препаратом «Федерал» також показали наявність достовірних відмінностей від негативного контролю за частотою еритроцитів з мікроядрами.

За 48-годинної обробки препаратом «Федерал» за будь-якої концентрації частота клітин з мікроядрами була достовірно ($p \leq 0,01$) меншою, ніж у пози-

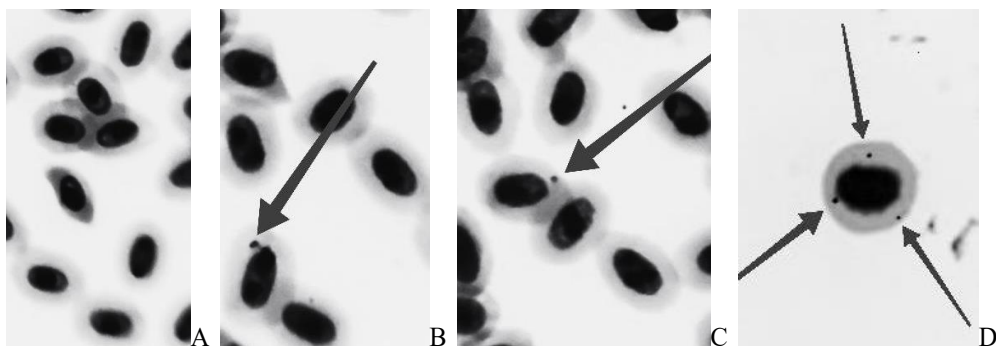


Рис 1. Еритроцити *D. rerio* без мікроядер (А) та з одинарними (В, С) та потрійними мікроядрами (D). Об'єктив $\times 100$, окуляр $\times 10$.

тивному контролі. При збільшенні концентрації гербіциду картина дещо змінювалася. Як при 96-годинній, так і при 144-годинній обробки гербіцидом у концентраціях 5 та 10 мг/л зберігалися достовірні ($p \leq 0,01$) відмінності від позитивного контролю. Але при обробці препаратом у концентрації 15 мг/л за обох термінів тривалої обробки достовірних відмінностей від позитивного контролю не виявлено.

Аналіз впливу концентрацій препарату «Федерал» на частоту мікроядер за 48-годинної обробки виявив достовірні ($p \leq 0,01$) відмінності лише концентрації 15 мг/л від інших варіантів обробки. Із збільшенням тривалості обробки ці відмінності зберігалися між обробкою в концентрації 5 мг/л та іншими варіантами обробки. Що до впливу на частоту еритроцитів з мікроядрами тривалості обробки, то за усіх застосованих концентрацій препарату частота клітин з мікроядрами достовірно ($p \leq 0,01$) зростала при збільшенні тривалості обробки від 48 до 96 годин. Подальше збільшення тривалості обробки не приводило до достовірного збільшення частоти еритроцитів з мікроядрами.

Отримані результати дещо суперечать повідомленням про інертність гліфосату. З'ясовано, що гліфосат не викликав суттєвого збільшення частоти мікроядер у мононуклеарних лейкоцитів людини *in vitro*, за виключенням найбільшої концентрації (100 мкмоль), навіть після 20-годинного впливу. Натомість три препарати на його основі викликали суттєве збільшення частоти мікроядер вже через 4 години [24]. Багато авторів пояснюють це наявністю у препаратах ад'ювантів, які можуть бути більш токсичними, ніж сам гліфосат [7, 21, 23]. Вважають, що ад'юванти підвищують біодоступність гліфосату [25]. Генотоксичність гліфосату [35] пояснюють опосередкованою дією активних форм кисню. Хоча прямих доказів здатності гліфосату індукувати активні форми кисню немає, відомо, що препарати на його основі можуть викликати окиснювальний стрес [5, 6], що вказує на роль супутніх домішок у генотоксичних ефектах.

Дослідження впливу гліфосату в культурі лімфоцитів великої рогатої худоби не виявили дозозалежного ефекту відносно індукції мікроядер. Лише за надвисоких концентрацій (280 і 560 мкмоль) спостерігалось суттєве збільшення частоти клітин з мікроядрами [27]. Дослідження гліфосату та препаратів на його основі в тестах на мутагенність у бактерій, а також в культурі клітин ТК6 людини не виявили суттєвої генотоксичності гліфосату, в той час як комерційні препарати демонстрували різний ступінь цито- та генотоксичності [31].

Отримані нами дані свідчать, що вже при концентраціях 60 мкмоль/л (10 мг/л) і 90 мкмоль/л (15 мг/л) було виявлено достовірне збільшення клітин з мікроядрами. Розбіжності можуть бути зумовлені методами тестування (клітинні культури та організми *in vivo*, різні типи клітин (лімфоцити та еритроцити)), але більш ймовірною нам здається різниця в біології об'єктів, використаних як тест-системи. Дослідження впливу гліфосату на рибах та амфібіях, а також на безхребетних мало схожі результати з нашим дослідженням. Так, у африканського сома (*Clarias gariepinus*) лише при 4,5 і 6 мг/л гліфосату відбувалося збільшення частки еритроцитів з мікроядрами [1]. З'ясовано, що за 96-годинної експозиції коропа (*Cyprinus carpio*) препаратом на основі гліфосату середня частота мікроядер суттєво зростала [15]. У личинок *Rhinella arenarum* 96-годинна обробка препаратами на основі дикамби та гліфосату індукувала у амфібій розриви ДНК незалежно від застосованих концентрацій. Також виявлений синергічний ефект бінарної суміші цих препаратів на індукцію первинних розривів ДНК у циркулюючих клітинах крові [32]. Дослідження на метелику *Lycaena dispar* показали суттєвий вплив гліфосату на частоту утворення мікроядер в епітеліальних клітинах личинок, які живилися на рослинах, обприсканих гербіцидом у концентрації 3,6 г/л [29]. Таким чином, представники різних таксономічних груп по-різному реагують на гліфосат та препарати на його основі. Можливо це зумовлене особливостями метаболізму, в т.ч. різною реакцією на окиснювальний стрес.

Слід зазначити, що досліджуваний нами гербіцидний препарат має дві діючі речовини – ізопропіламінна сіль гліфосату (480 г/л) та дикамба (60 г/л). Ми намагалися оцінити дію саме гліфосату у надвисоких концентраціях, тому нами були обрані експериментальні концентрації гліфосату 5, 10 та 15 мг/л. Відповідно це супроводжувалося наявністю дикамби у концентраціях 0,63, 1,25 та 1,88 мг/л. Оцінки генотоксичної дії дикамби на рибах *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae) показали, що збільшення індексу генетичних ушкоджень спостерігалось при обробках тривалістю 48 та 96 годин в діапазоні концентрацій дикамби 410–1229 мг/л [28]. Тому, дією дикамби в нашому експерименті на даному етапі можна знехтувати. Однак, враховуючи неоднозначні дані про безпечність даної речовини [17, 22], в подальшому ми плануємо провести вивчення впливу кожної речовини окремо, тим більше, що є дані як про синергічну, так і антагоністичну дію даних речовин [22, 32].

Висновки

1. Дія препарату «Федерал» при використанні мікроядерного тесту показала достовірний вплив досліджуваних концентрацій на збільшення частоти еритроцитів з мікроядрами.

2. Генотоксичний вплив посилювався із збільшенням тривалості обробки до 96 годин. Подальше збільшення тривалості обробки не вплинуло суттєво на збільшення клітин з мікроядрами.

Стаття надійшла до редакції 20.05.2024

Список використаної літератури

- Alarape S.A., Adebisi E.O., Adeyemo O.K. Histopathological effects and micronucleus assay of glyphosate-based herbicides on cultured african catfish (*Clarias Gariepinus*, Burchell 1822). *BioRxiv*. 2021. 2021.08.25.457628; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.08.25.457628>
- Alvarez-Moya C., Reynoso-Silva M. Assessment of Genetic Damage Induced via Glyphosate and Three Commercial Formulations with Adjuvants in Human Blood, *Cells. Int. J. Mol. Sci.*, 2023, 24, 4560. <https://doi.org/10.3390/ijms24054560>
- Bailey S.W., Ayling J.E. The extremely slow and variable activity of dihydrofolate reductase in human liver and its implications for high folic acid intake. *PNAS*. 2009, 106, P. 15424–15429. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19706381/>
- Benbrook C., Mesnage R., Sawyer W. (2023) Genotoxicity Assays Published since 2016 Shed New Light on the Oncogenic Potential of Glyphosate-Based Herbicides, *Agrochemicals*, 2023, 2, pp. 47–68. <https://doi.org/10.3390/agrochemicals2010005>
- Chaufan G., Coalova I., Rios de Molina Mdel C. (2014) Glyphosate commercial formulation causes cytotoxicity, oxidative effects, and apoptosis on human cells: differences with its active ingredient. *Int. J. Toxicol.* 2014, 33, P. 29–38. [10.1177/1091581813517906](https://doi.org/10.1177/1091581813517906)
- Coalova I., Rios de Molina Mdel C., Chaufan G. Influence of the spray adjuvant on the toxicity effects of a glyphosate formulation. *Toxicology in Vitro*. 2014, 28, P. 1306–1311. [10.1016/j.tiv.2014.06.014](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.06.014)
- Defarge N. Co-formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in human cells below toxic levels / N. Defarge, E. Takács, V.L. Lozano, R. Mesnage, J. Spiroux de Vendômois, G.E. Séralini, A. Székács. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2016, 13(3), P. 264–280. [10.3390/ijerph13030264](https://doi.org/10.3390/ijerph13030264)
- Dimitrov B.D., Gadeva P.G., Benova D.K., Bineva M.V. Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems. *Mutagenesis*. 2006, 21(6). P. 375–382, 2006. doi:10.1093/mutage/gel044
- Ghisi N.C., Celton de Oliveira E., Prioli A.J. Does exposure to glyphosate lead to an increase in the micronuclei frequency? A systematic and meta-analytic review. *Chemosphere*. 2016, 145, P. 42–54. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.044>
- Glantz S.A. Primer of Biostatistics. Seventh Edition. New York, ..., Toronto: McGRAW-HILL, 2012. 327 p.
- Gomez-Gallego C. Glyphosate-based herbicide affects the composition of microbes associated with Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) /C. Gomez-Gallego, M.J. Rainio, M.C. Collado, A. Mantziari, S. Salminen, K. Saikkonen, M. Helander. *FEMS Microbiology Letters*. 2020, 367(6), fnaa050. doi: 10.1093/femsle/fnaa050.
- Guyton K.Z. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate / K. Z. Guyton, D. Loomis, Y. Grosse, F. El Ghissassi, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha N., C. Scoccianti, H. Mattok, K. Straif. *Lancet Oncol*. 2015, 16, P. 490–491. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70134-8.
- Heap I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. 2019. Available www.weedscience.com
- Herna'ndez P.P., Allende M.L. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for studying the genetic basis of copper toxicity, deficiency, and metabolism. *Am.J. Clin. Nutr.* 2008, 88(suppl). P. 835S-839S. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002916523241490>
- Islamy R.A., Faqih A.R., Kilawati Y., Maimunah Y., Fadjar M., Hasan V. et al. Genotoxic Effect on Hematological and Micronucleus alteration of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Exposed to glyphosate-based herbicide, *Jurnal Perikanan Pantura*, 2023, 6(1), pp. 246–260. doi:10.30587/jpp.v6i1.944
- Kier L.D., Kirkland D.J. Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations. *Crit. Rev. Toxicol.* 2013, 43(4). P. 283–315. doi: 10.3109/10408444.2013.770820.

17. Kim J. Exposure to pesticides and risk of Hodgkin lymphoma in an international consortium of agricultural cohorts (AGRICOH) / J. Kim, M.E. Leon, L.H. Schinasi, I. Baldi, P. Lebaillly, L.E.B. Freeman, K. C. Nordby, G. Ferro, A. Monnereau, M. Brouwer, K. Kjaerheim, J. N. Hofmann, K. Straif, H. Kromhout, J. Schüz, K. Togawa *Cancer Causes Control*. 2023, 34(11). P. 995–1003. doi: 10.1007/s10552-023-01748-1.
18. Kortekamp A. *Herbicides and Environment*. Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia, 2011.
19. Luaces J. P., Rossi L. F., Chirino M. G., Browne M., Merani M. S., Mudry M. D. Genotoxic effects of Roundup Full II® on lymphocytes of *Chaetophractus villosus* (Xenarthra, Mammalia): In vitro studies. *PLoS One*. 2017, 12(8). P. e0182911. doi: 10.1371/journal.pone.0182911.
20. Mendes K. F., de Sousa R. N., da Costa Lima A., Godoi-j M. A. Understanding the Environmental Behavior of Herbicides: A Systematic Review of Practical Insights. *IntechOpen*. 2023. doi: 10.5772/intechopen.1002280
21. Mesnage R., Benbrook C., Antoniou M. N. Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. *Food Chem Toxicol*. 2019, 128. P. 137–145. 10.1016/j.fct.2019.03.053
22. Mesnage R., Brandsma I., Moelijker N., Zhang G., Antoniou M. N. Genotoxicity evaluation of 2,4-D, dicamba and glyphosate alone or in combination with cell reporter assays for DNA damage, oxidative stress and unfolded protein response. *Food Chem Toxicol*. 2021, 157. 112601. doi: 10.1016/j.fct.2021.112601.
23. Mesnage R., Defarge N., Spiroux de Vendomois J., Seralini G. E. Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles/ *Biomed. Res. Int*. 2014. 179691. 10.1155/2014/179691
24. Nagy K., Argaw Tessema R., Szász I., Smeirat T., Al Rajo A., Ádám B. Micronucleus Formation Induced by Glyphosate and Glyphosate-Based Herbicides in Human Peripheral White Blood Cells. *Front Public Health*. 2021, 9. 639143. doi: 10.3389/fpubh.2021.639143.
25. Nobels I., Spanoghe P., Haesaert G., Robbens J., Blust R. Toxicity ranking and toxic mode of action evaluation of commonly used agricultural adjuvants on the basis of bacterial gene expression profiles, *PLoS ONE*. 2011, 6(11). e24139. 10.1371/journal.pone.0024139
26. Pareek A., Rani P., Kishore D. A short review on: Sulphonamides, *Int. J. Pharm. Bio. Sci*. 2013, 4(1). P. 812–820. https://www.researchgate.net/publication/286074180_A_short_review_on_Sulphonamides
27. Piešová E. The effect of glyphosate on the frequency of micronuclei in bovine lymphocytes *in vitro*. *Acta Veterinaria (Beograd)*. 2005, 55(2–3). P. 101–109. DOI:10.2298/AVB0503101P
28. Ruiz de Arcaute C., Soloneski S., Larramendy M. L. Evaluation of the genotoxicity of a herbicide formulation containing 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba) in circulating blood cells of the tropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen*. 2014, 773. P. 1–8. doi: 10.1016/j.mrgentox.2014.08.001.
29. Santovito A., Audisio M., Bonelli S. A micronucleus assay detects genotoxic effects of herbicide exposure in a protected butterfly species. *Ecotoxicology*. 2020, 29. P. 1390–1398. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02276-3>
30. Shaner D. L. Herbicide safety relative to common targets in plants and mammals. *Pest. Manag. Sci*. 2004, 60(1). P. 17–24. doi: 10.1002/ps.782.
31. Smith-Roe S. L. Evaluation of the herbicide glyphosate, (aminomethyl)phosphonic acid, and glyphosate-based formulations for genotoxic activity using in vitro assays / S. L. Smith-Roe, C. D. Swartz, A. Rashid, N. C. Chrysty, J. E. Sly, X. Chang X. Sipes N. S., Shockley K. R., Harris S. F., McBride S. J., Larson G. J., Collins B. J., Mutlu E., Witt K. L. *Environ. Mol. Mutagen*. 2023, 64, pp. 202–233. <https://doi.org/10.1002/em.22534>
32. Soloneski S., Ruiz de Arcaute C., Larramendy M. L. Genotoxic effect of a binary mixture of dicamba- and glyphosate-based commercial herbicide formulations on *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) (Anura, Bufonidae) late-stage larvae. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int*. 2016, 23(17). P. 17811–21. doi: 10.1007/s11356-016-6992-7.
33. Tarboush N. A., Almomani D. H., Khabour O. F., Azzam M. I. Genotoxicity of Glyphosate on Cultured Human Lymphocytes. *Int. J. Toxicol*. 2022, 41(2). P. 126–131. doi: 10.1177/10915818211073514.
34. Weinstein S. J. Null association between prostate cancer and serum folate, Vitamin B6, Vitamin B12, and Homocysteine / S. J. Weinstein, T. J. Hartman, R. Stolzenberg-Solomon, P. Pietinen, M. J. Barrett, P. R. Taylor, J. Virtamo, D. Albanes. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2003, 12. P. 1271–1272. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14652294/>
35. Wozniak E. The mechanism of DNA damage induced by Roundup 360 PLUS, glyphosate and AMPA in human peripheral blood mononuclear cells – genotoxic risk assesement / E. Wozniak, P. Sicinska, J. Michalowicz, K. Wozniak, E. Reszka, B. Huras, J. Zakrewski, B. Bukowska. *Food Chem. Toxicol*. 2018, 120. P. 510–522. 10.1016/j.fct.2018.07.035
36. Yalçın E., Çavuşoğlu K. Spectroscopic contribution to glyphosate toxicity profile and the remedial effects of *Momordica charantia*. *Sci Rep*, 2022, 12, 20020. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24692-7>
37. Zessel K., Mohring S., Hamscher G., Kietzmann M., Stahl J. Biocompatibility and antibacterial activity of photolytic products of sulfonamides. *Chemosphere*. 2014, 100. P. 167–174. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.11.038.
38. Zimdahl R. L. (2002). My view. *Weed Sci*, 50, p. 687. <https://www.cambridge.org/core/journals/weed-science/issue/B7C5B7FCCD4C180691FE263A1401B4F8>

М. К. Кузнецов, О. Л. Січняк

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
біологічний факультет, кафедра молекулярної біології, біохімії та генетики,
Одеса, вул. Дворянська, 2, 65082, Україна, e-mail: a.sechnyak@onu.edu.ua

ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНОТОКСИЧНОГО ВПЛИВУ ГЕРБІЦИДУ «ФЕДЕРАЛ» НА МОДЕЛЬНОМУ ОБ'ЄКТІ *DANIO RERIO*, HAMILTON, 1822. ПОВІДОМЛЕННЯ 1. ВПЛИВ ВИСОКИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ

Резюме

Проблема. На частку гербіцидів приходиться понад 60% усіх пестицидів, що застосовуються у сільському господарстві. Гліфосат є найбільш широко використовуваним гербіцидом у світі. Питання відносно його безпеки, можливі побічні ефекти та вплив на інші організми є широко обговорюваними та суперечливими.

Мета. Метою представленої роботи є дослідження впливу високих концентрацій гербіцидного препарату на основі гліфосату «Федерал» на тест-об'єкті *Danio rerio*, Hamilton, 1822. Під високими концентраціями розуміються такі, що набагато перевищують гранично допустиму концентрацію у водному середовищі.

Методика. На тест-об'єкті *Danio rerio* вивчали вплив препарату «Федерал» на частоту еритроцитів з мікроядрами при обробці протягом 48, 96 та 144 годин у концентрації 5, 10 та 15 мг/л (у перерахунку на гліфосат). В якості негативного контролю використовували інтактні особини, а для позитивного контролю – сульфаніламід у концентрації 20 мг/л протягом 48, 96 та 144 годин.

Основні результати. При обробці сульфаніламідом суттєво зростала частота клітин з мікроядрами. Усі варіанти обробки препаратом «Федерал» також показали наявність достовірних відмінностей від негативного контролю за частотою еритроцитів з мікроядрами. За 48-годинної обробки препаратом «Федерал» за будь-якої концентрації частота клітин з мікроядрами була достовірно меншою, ніж у позитивному контролі. Як за 96-годинної, так і за 144-годинної обробки гербіцидом у концентраціях 5 та 10 мг/л зберігалися достовірні відмінності від позитивного контролю. Але при обробці препаратом у концентрації 15 мг/л за обох термінів тривалої обробки достовірних відмінностей від позитивного контролю не виявлено. Аналіз впливу концентрацій препарату «Федерал» на частоту мікроядер за 48-годинної обробки виявив достовірні відмінності лише концентрації 15 мг/л від інших варіантів обробки. Із збільшенням тривалості обробки ці відмінності зберігалися між обробкою в концентрації 5 мг/л та іншими варіантами обробки. За усіх застосованих концентрацій препарату частота клітин з мікроядрами достовірно зростала при збільшенні тривалості обробки від 48 до 96 годин. Подальше збільшення тривалості обробки не збільшувало достовірно частоту еритроцитів з мікроядрами.

Висновки. Дія препарату «Федерал» при використанні мікроядерного тесту показала достовірний вплив досліджуваних концентрацій на збільшення частоти еритроцитів з мікроядрами. Генотоксичний вплив посилювався із збільшенням тривалості обробки до 96 годин. Подальше збільшення тривалості обробки не вплинуло суттєво на збільшення частоти клітин з мікроядрами.

Ключові слова: гліфосат, дикамба, мікроядерний тест, *Danio rerio*

M. K. Kuznetsov, O. L. Sichniak

Odesa I. I. Mechnikov National University, Department of Molecular Biology,
Biochemistry and Genetics, 2 Dvorianska St, Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: a.sechnyak@onu.edu.ua

STUDY OF THE GENOTOXIC EFFECT OF FEDERAL HERBICIDE ON THE MODEL OBJECT DANIO RERIO, HAMILTON, 1822. MESSAGE 1. EFFECT OF HIGH CONCENTRATIONS

Summary

Problem. More than 60% of all pesticides used in agriculture are herbicides. Glyphosate is the most widely used herbicide in the world. Questions regarding its safety, possible side effects and influence on other organisms are controversial and are widely discussed.

Aim. The purpose of the presented work is to study the effect of high concentrations of the herbicide preparation based on glyphosate “Federal” on the test object *Danio rerio*, Hamilton, 1822. High concentrations are understood to be those that far exceed the MPC in the aquatic environment.

Methods. The effect of the drug “Federal” on the frequency of erythrocytes with micronuclei when treated for 48, 96 and 144 hours at a concentration of 5, 10 and 15 mg/l (in terms of glyphosate) was studied on the test object *Danio rerio*. Intact individuals were used as a negative control, and sulfonamide at a concentration of 20 mg/l was used as a positive control for 48, 96 and 144 hours.

Main results. When treated with sulfonamide, the frequency of cells with micronuclei significantly increased. All variants of treatment with the drug “Federal” showed significant differences from the negative control in the frequency of erythrocytes with micronuclei. For 48 hours of treatment with the drug “Federal” at any concentration, the frequency of cells with micronuclei was significantly lower than in the positive control. Both at 96-hour and at 144-hour herbicide treatment in concentrations of 5 and 10 mg/l, significant differences from the positive control remained. However, when treated with the drug with a concentration of 15 mg/l, no significant differences from the positive control were found during both periods of a long-term treatment. The analysis of the influence of concentrations of the drug “Federal” on the frequency of micronuclei during 48 hours of treatment revealed significant differences only in concentrations of 15 mg/l from other treatment options. As treatment duration increased, these differences persisted between treatment with a concentration of 5 mg/l and other treatment options. For all applied concentrations of the drug, the frequency of cells with micronuclei significantly increased with an increase in the duration of the treatment from 48 to 96 hours. Further increase in trivalency of processing did not significantly increase the frequency of erythrocytes from micronuclei.

Conclusions. The effect of the drug “Federal” when using the micronucleus test showed a reliable effect of the studied concentrations on increasing the frequency of erythrocytes with micronuclei. The genotoxic effect increased with increasing duration of the treatment up to 96 hours. Further increase in the treatment duration did not significantly affect the increase in the frequency of cells with micronuclei.

Key words: glyphosate, dicamba, micronucleus test, *Danio rerio*

References

1. Alarape S.A., Adebisi E.O., Adeyemo O.K. (2021) Histopathological effects and micronucleus assay of glyphosate-based herbicides on cultured african catfish (*Clarias Gariepinus*, Burchell 1822), *bioRxiv* 2021.08.25.457628; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.08.25.457628>
2. Alvarez-Moya C., Reynoso-Silva M. (2023) Assessment of Genetic Damage Induced via Glyphosate and Three Commercial Formulations with Adjuvants in Human Blood, *Cells. Int. J. Mol. Sci.*, 24, 4560. <https://doi.org/10.3390/ijms24054560>
3. Bailey S. W., Ayling J. E. (2009) The extremely slow and variable activity of dihydrofolate reductase in human liver and its implications for high folic acid intake, *PNAS*, 106, pp. 15424–15429.
4. Benbrook C., Mesnage R., Sawyer W. (2023) Genotoxicity Assays Published since 2016 Shed New Light on the Oncogenic Potential of Glyphosate-Based Herbicides. *Agrochemicals*, 2, 47–68. <https://doi.org/10.3390/agrochemicals2010005>
5. Chaufan G., Coalova I., Rios de Molina Mdel C. (2014) Glyphosate commercial formulation causes cytotoxicity, oxidative effects, and apoptosis on human cells: differences with its active ingredient, *Int. J. Toxicol.*, 33, pp. 29–38. [10.1177/1091581813517906](https://doi.org/10.1177/1091581813517906)
6. Coalova I., Rios de Molina Mdel C., Chaufan G. (2014) Influence of the spray adjuvant on the toxicity effects of a glyphosate formulation, *Toxicology in Vitro*, 28, pp. 1306–1311. [10.1016/j.tiv.2014.06.014](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.06.014)
7. Defarge N., Takács E., Lozano V.L., Mesnage R., Spiroux de Vendômois J., Séralini G.E., Székács A. (2016) Co-formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in human cells below toxic levels, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 13(3), pp. 264–280. [10.3390/ijerph13030264](https://doi.org/10.3390/ijerph13030264)
8. Dimitrov B.D., Gadeva P.G., Benova D.K., Bineva M.V. (2006) Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems, *Mutagenesis*, 21(6), pp. 375–382, 2006. doi:10.1093/mutage/gel044
9. Ghisi N.C., Celton de Oliveira E., Prioli A.J. (2016) Does exposure to glyphosate lead to an increase in the micronuclei frequency? A systematic and meta-analytic review, *Chemosphere*, 145, pp. 42–54. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.044>
10. Glantz S.A. (2012) *Primer of Biostatistics. Seventh Edition*. New York, ..., Toronto: McGRAW-HILL, 327 p.
11. Gomez-Gallego C., Rainio M.J., Collado M.C., Mantziari A., Salminen S., Saikkonen K., Helander M. (2020) Glyphosate-based herbicide affects the composition of microbes associated with Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*), *FEMS Microbiology Letters*, 367(6), fnaa050. doi: 10.1093/femsle/fnaa050.
12. Guyton K.Z., Loomis D., Grosse Y., El Ghissassi F., Benbrahim-Tallaa L., Guha N., et al. (2015) Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate, *Lancet Oncol.*, 16, pp. 490–491. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70134-8.
13. Heap I. (2019). The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Online. Internet. Available www.weedscience.com
14. Herna'ndez P.P., Allende M.L. (2008) Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for studying the genetic basis of copper toxicity, deficiency, and metabolism, *Am. J. Clin. Nutr.*, 88(suppl), pp. 835S-839S.
15. Islamy R.A., Faqih A.R., Kilawati Y., Maimunah Y., Fadjar M., Hasan V. et al. (2023) Genotoxic Effect on Hematological and Micronucleus alteration of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Exposed to glyphosate-based herbicide, *Jurnal Perikanan Pantura*, 6(1), pp. 246–260. doi:10.30587/jpp.v6i1.944
16. Kier L.D., Kirkland D.J. (2013) Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations, *Crit. Rev. Toxicol.*, 43(4), pp. 283–315. doi: 10.3109/10408444.2013.770820.
17. Kim J., Leon M.E., Schinasi L.H., Baldi I., Lebailly P., Freeman L.E.B. et al. (2023) Exposure to pesticides and risk of Hodgkin lymphoma in an international consortium of agricultural cohorts (AGRICOH), *Cancer Causes Control*, 34(11), pp. 995–1003. doi: 10.1007/s10552-023-01748-1.
18. Kortekamp A. (2011). *Herbicides and Environment*. Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia.
19. Luaces J.P., Rossi L.F., Chirino M.G., Browne M., Merani M.S., Mudry M.D. (2017) Genotoxic effects of Roundup Full II® on lymphocytes of *Chaetophractus villosus* (Xenarthra, Mammalia): In vitro studies, *PLoS One*, 12(8), p. e0182911. doi: 10.1371/journal.pone.0182911.
20. Mendes K.F., de Sousa R.N., da Costa Lima A., Godoi-j M.A. (2023). *Understanding the Environmental Behavior of Herbicides: A Systematic Review of Practical Insights*. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.1002280
21. Mesnage R., Benbrook C., Antoniou M.N. (2019) Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides, *Food Chem Toxicol.*, 128, pp. 137–145. [10.1016/j.fct.2019.03.053](https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.053)
22. Mesnage R., Brandsma I., Moelijker N., Zhang G., Antoniou M.N. (2021) Genotoxicity evaluation of 2,4-D, dicamba and glyphosate alone or in combination with cell reporter assays for DNA damage, oxidative stress and unfolded protein response, *Food Chem Toxicol.*, 157, 112601. doi: 10.1016/j.fct.2021.112601.

23. Mesnage R., Defarge N., Spiroux de Vendomois J., Seralini G.E. (2014) Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles, *Biomed. Res. Int.*, 179691. 10.1155/2014/179691
24. Nagy K., Argaw Tessema R., Szász I., Smeirat T., Al Rajo A., Ádám B. (2021) Micronucleus Formation Induced by Glyphosate and Glyphosate-Based Herbicides in Human Peripheral White Blood Cells, *Front Public Health*, 9, 639143. doi: 10.3389/fpubh.2021.639143.
25. Nobels I., Spanoghe P., Haesaert G., Robbens J., Blust R. (2011) Toxicity ranking and toxic mode of action evaluation of commonly used agricultural adjuvants on the basis of bacterial gene expression profiles, *PLoS ONE.*, 6(11), e24139. 10.1371/journal.pone.0024139
26. Pareek A., Rani P., Kishore D. (2013) A short review on: Sulphonamides, *Int. J. Pharm. Bio. Sci.*, 4(1), pp. 812–820. https://www.researchgate.net/publication/286074180_A_short_review_on_Sulphonamides
27. Piešová E. (2005). The effect of glyphosate on the frequency of micronuclei in bovine lymphocytes in vitro. *Acta Veterinaria (Beograd)*, 55(2–3), pp. 101–109. DOI:10.2298/AVB0503101P
28. Ruiz de Arcaute C., Soloneski S., Larramendy M.L. (2014) Evaluation of the genotoxicity of a herbicide formulation containing 3,6-dichloro-2-metoxibenzoic acid (dicamba) in circulating blood cells of the tropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*, *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 773, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.mrgentox.2014.08.001.
29. Santovito A., Audisio M., Bonelli S. (2020) A micronucleus assay detects genotoxic effects of herbicide exposure in a protected butterfly species, *Ecotoxicology*, 29, pp. 1390–1398. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02276-3>
30. Shaner D.L. (2004). Herbicide safety relative to common targets in plants and mammals, *Pest. Manag. Sci.*, 60(1), pp. 17–24. doi: 10.1002/ps.782.
31. Smith-Roe S.L., Swartz C.D., Rashid A., Chrysty N.C., Sly J.E. Chang X. et al. (2023) Evaluation of the herbicide glyphosate, (aminomethyl)phosphonic acid, and glyphosate-based formulations for genotoxic activity using in vitro assays, *Environ. Mol. Mutagen.*, 64, pp. 202–233. <https://doi.org/10.1002/em.22534>
32. Soloneski S., Ruiz de Arcaute C., Larramendy M.L. (2016) Genotoxic effect of a binary mixture of dicamba- and glyphosate-based commercial herbicide formulations on *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) (Anura, Bufonidae) late-stage larvae, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 23(17), pp. 17811–21. doi: 10.1007/s11356-016-6992-7.
33. Tarboush N.A., Almomani D.H., Khabour O.F., Azzam M.I. (2022) Genotoxicity of Glyphosate on Cultured Human Lymphocytes, *Int. J. Toxicol.*, 41(2), pp. 126–131. doi: 10.1177/10915818211073514.
34. Weinstein S.J., Hartman T.J., Stolzenberg-Solomon R., Pietinen P., Barrett M.J., Taylor P.R. et al. (2003) Null association between prostate cancer and serum folate, Vitamin B6, Vitamin B12, and Homocysteine, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.*, 12, pp. 1271–1272. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14652294/>
35. Wozniak E., Sicinska P., Michalowicz J., Wozniak K., Reszka E., Huras B. et al. (2018) The mechanism of DNA damage induced by Roundup 360 PLUS, glyphosate and AMPA in human peripheral blood mononuclear cells – genotoxic risk assessment, *Food Chem. Toxicol.*, 120, pp. 510–522. 10.1016/j.fct.2018.07.035
36. Yalçın E., Çavuşoğlu K. (2022) Spectroscopic contribution to glyphosate toxicity profile and the remedial effects of *Momordica charantia*. *Sci Rep*, 12, 20020. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24692-7>
37. Zessel K., Mohring S., Hamscher G., Kietzmann M., Stahl J. (2014) Biocompatibility and antibacterial activity of photolytic products of sulfonamides, *Chemosphere*, 100, pp. 167–174. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.11.038.
38. Zimdahl R.L. (2002). My view. *Weed Sci*, 50, p. 687. <https://www.cambridge.org/core/journals/weed-science/issue/B7C5B7FCCD4C180691FE263A1401B4F8>