



Оценка генотоксичности дифлубензурана методом микроядерного теста на эритроцитах *Danio rerio*

DOI

Кандидат биологических наук, доцент **М.В. Медянкина**; **Н.И. Кочетков** – младший научный сотрудник; Кандидат биологических наук, доцент **Д.Л. Никифоров-Никишин** – ведущий научный сотрудник; Кандидат ветеринарных наук **Головачева Н.А.** – доцент кафедры биологии и ихтиологии – Факультет биотехнологий и рыбного хозяйства ФГБОУ ВО «МГУТУ им. Разумовского (ПКУ)»

@ 79263841762@yandex.ru

Ключевые слова: дифлубензурон (DFB), пестициды, генотоксичность, микроядерный тест, *Danio rerio*, эритроциты, генотоксическое действие продуктов распада DFB, метод комет, опыты на клеточных культурах

Keywords: diflubenzuron (DFB), pesticides, genotoxicity, micronuclear test, *Danio rerio*, erythrocytes, genotoxic effect of DFB decay products, comet method, experiments on cell cultures

EVALUATION OF THE GENOTOXICITY OF DIFLUBENZURON BY MICRONUCLEUS TEST ON RED BLOOD CELLS DANIO RERIO

Candidate of Biological Sciences, Associate Professor **M.V. Medyankina**; **N.I. Kochetkov** – Junior researcher; Candidate of Biological Sciences, Associate Professor **D.L. Nikiforov-Nikishin** – Leading Researcher; Candidate of Veterinary Sciences **N.A. Golovacheva** – Associate Professor of the Department of Biology and Ichthyology – Faculty of Biotechnology and Fisheries FGBOU VO "MGUTU im. Razumovsky (PKU)"

In this paper, the genotoxicity of (1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluoro-benzoyl) urea) is investigated by a micronuclear test on *Danio rerio*, as a standard test object, at concentrations of 0.5, 1 and 2 mg/l. As a result of the work, a significant increase in the frequency of occurrence of micronuclei (0.73%) was found, while other nuclear anomalies in the maximum concentrations of erythrocytes were also significant. It was found that the frequency of micronuclei in concentrations of 0.5 and 1 mg/l on the fifth day of the experiment was the maximum, while at the maximum concentration (2 mg/l) the level of micronuclei was lower, which is probably due to toxic effects. An increase in the level of micronuclei may be associated with the genotoxic effect of DFB decay products. The genotoxicity results obtained using the micronucleus test method were contradictory. For this reason, it is necessary to conduct additional studies using the comet method or experiments on cell cultures.

ВВЕДЕНИЕ

Дифлубензурон (1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluoro-benzoyl) urea) является широко распространенным пестицидом, используемым для борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур [2], в частности, для контроля популяции *A. aegypti* [3]. Низкая селективность его действия позволяет добиться ги-

бели широкого спектра насекомых-вредителей. В аквакультуре дифлубензурон (DFB) (CAS № 35367-38-5) широко используется как средство для борьбы с эктопаразитами [3].

Механизм действия на насекомых связан с ингибированием синтеза хитина и считается нетоксичным для позвоночных животных [4]. Данные свойства

препарата способствуют его широкому применению и, со стоком поверхностных вод, дифлубензурон может попадать в воды естественных водоемов [5]. Период деструкции в почве составляет около 3 дней. В то же время, в водной среде при pH 2-8 и температуре выше 30°C DFB сохраняется на более длительный срок [6]. Данное вещество является высокотоксичным для ракообразных и личинок насекомых [5].

Рыбы, находящиеся на вершине трофической цепи, скорее всего, слабо чувствительны к действию низких концентраций данного препарата, что отмечено в ряде работ [7; 15]. При этом большинство исследователей указывает на отсутствие мутагенных и тератогенных свойств для позвоночных животных [8; 28]. Можно предположить, что, при условии накопления в водной среде естественных водоемов, DFB и продукты его распада могут обладать генотоксическим действием [9].

Danio rerio является стандартным объектом для проведения токсикологических исследований, фармакологических препаратов и других загрязнителей природной среды [13]. *D. rerio* также широко применяется при оценке генотоксично-

В данной работе исследуется генотоксичность (1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluoro-benzoyl)urea) методом микроядерного теста на *Danio rerio*, как стандартном тест-объекте, при концентрациях 0,5; 1 и 2 мг/л. В результате работы было установлено достоверное увеличение частоты встречаемости микроядер (0,73%), при этом другие ядерные аномалии, в максимальных концентрациях эритроцитов, также носили достоверный характер. Было выявлено, что частота микроядер в концентрациях вещества 0,5 и 1 мг/л на пятые сутки опыта была максимальной, при этом в максимальной концентрации (2 мг/л) уровень микроядер был ниже, что, вероятно, связано с токсическим действием. Повышение уровня микроядер, возможно, связано с генотоксическим действием продуктов распада DFB. Полученные результаты генотоксичности, полученные с использованием метода микроядерного теста, имели противоречивый характер. По этой причине необходимо проведение дополнительных исследований с использованием метода комет или опытов на клеточных культурах.

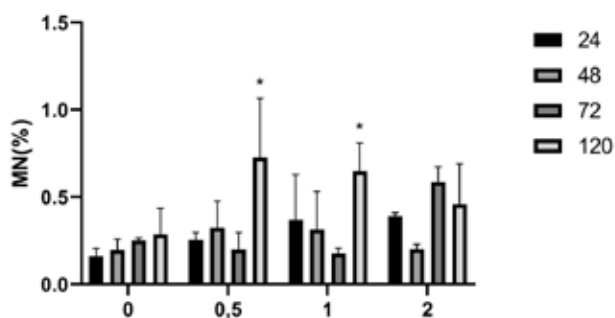


Рисунок 1. Частота встречаемости микроядер на протяжении 5 дней опыта. Значения достоверности от контроля получены с помощью двунаправленного теста ANOVA с пост-хок тестом Тьюки: * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,001$

Figure 1. Frequency of occurrence of micronuclei during 5 days of the experiment. The confidence values from the control were obtained using a bidirectional ANOVA test with a post-hoc Tukey test: * - $P < 0.05$; ** - $P < 0.001$

сти различных химических соединений в лабораторных условиях.

Образование микроядер в эритроцитах крови позвоночных животных связано с нарушениями митоза эритроцитов в процессе эритропоэза [10]. В отличие от млекопитающих, эритроциты рыб содержат дифференцированное ядро, и нарушение его морфологии и появление микроядер хорошо различимо при изучении препаратов крови методами микроскопии. Даже при отсутствии токсического воздействия наблюдается определенный процент спонтанного образования микроядер и других ядерных аномалий в эритроцитах [11]. При токси-

ческом воздействии процент нарушений генетического аппарата эритроцитов многократно возрастает в период от нескольких суток до двух недель, в зависимости от вида рыб и их физиологического состояния [12]. Однако мутагенное воздействие токсикантов может привести к снижению количества митозов при эритропоэзе, и частота встречаемости микроядер в эритроцитах снизится.

Таким образом, в данной работе рассмотрено действие дифлубензурана на частоту встречаемости микроядер в эритроцитах периферической крови *Danio rerio*. Статистически достоверное увеличение нарушений ядерного аппарата эритроцитов, проведенное по стандартным методикам [11], показывает наличие достоверной разницы между контролем и опытом, что позволяет предположить наличие генотоксического эффекта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

В эксперименте использовались *Danio rerio* возрастом 3 месяца, которые содержались в аквариумах объемом 50 л при температуре 20-24°C и pH 7,2-7,4 с соблюдением естественных условий освещенности, по 20 особей одного пола в каждом.

Эксперимент проводился в трехкратной повторности ($n = 3$) в течение 5 дней (120 ч), так как за это время большинство эритроцитов, созревающих в органах кроветворения (селезёнка, головная почка), выбрасываются в кровяное русло.

Для кормления рыб использовали коммерческий гранулированный корм (Сорpens vital 0,5-0,8 мм), кормление осуществлялось два раза в сутки, согласно стандартным протоколам содержания [14].

Исследуемое вещество

DFB был получен из коммерческого инсектицидного препарата с содержанием действующего

вещества 240 г/л. Маточные растворы вещества получали путем растворения в дистиллированной воде и последовательных разбавлений в отстойной водопроводной воде для получения необходимых концентраций вещества.

Дизайн эксперимента

Для опыта отбирались особи без видимых повреждений размером $3 \pm 0,32$ см и возрастом 3 месяца. Исследуемое вещество добавляли в следующих концентрациях: 0,5; 1, и 2 мг/л. Концентрации были определены исходя из других работ, которые проводились на других видах рыб и оказывали воздействие [15; 29]. Контроль количества микроядер проводился каждые 24 часа. Контрольные рыбы содержались при тех же условиях в чистой отстойной воде.

Микроядерный тест

У особей из каждой исследуемой группы отбиралась кровь, путем отрезания хвостового плавника после анестезии в растворе MS-222 (10 мг/л). Каплю крови наносили на предметное стекло и просушивали на воздухе в течение 5 минут. Фиксация препарата проводилась в эфирно-спиртовой смеси, в соотношении 1:1. Далее препарат окрашивали по Романовскому-Гимзе, согласно стандартной методике [11].

После изготовления, препараты просматривались под световым микроскопом Olympus BX53 («Olympus Corporation», Япония) с окулярной приставкой Carl Zeiss ERc 5s («Zeiss», Германия) и с помощью программного обеспечения ZEN lite («Zeiss», Германия).

Частота встречаемости микроядер и ядерных аномалий в эритроцитах данио определялась согласно методике [16]. Учитывались следующие аномалии ядер: notched nuclei (деформированное ядро [NN]), lobbed nuclei (разрезанное ядро [LN]) и blebed nuclei (прикрепленное ядро [BN]). Подсчет осуществлялся при помощи программного обеспечения ImageJ (National Institutes of Health, USA). На препаратах крови из каждой исследуемой группы просматривалось по 2000 клеток и подсчитывался процент клеток с микроядрами. Микроядерный тест производился согласно методике [14].

Статистическая обработка

Определение нормальности распределения численных данных осуществлялось при помощи критерия Шапиро-Уилка. Сравнение численных данных между разными группами производилось с использованием двунаправленного теста ANOVA с пост-хок тестом Тьюки. Уровень достоверности был выбран $P \leq 0,05$, и результаты представлены в виде среднее \pm SD (standard deviation).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате проведения микроядерного теста было установлено, что в низких концентрациях и в контроле в первые сутки опыта количество микроядер статистически не отличалось и находилось на уровне от 0,16 до 0,25%, что является

нормальным уровнем частоты встречаемости микроядер в эритроцитах *D. rerio* [17].

При экспозиции 48 часов количество микроядер статистически не изменялось во всех исследуемых концентрациях. Это указывает на отсутствие острого генотоксического эффекта. Через 72 ч отмечается некоторое снижение частоты встречаемости микроядер в периферической крови в концентрациях 0,5 и 1 мг/л до 0,17 и 0,19%, соответственно.

На 4 день отмечалось достоверное ($p \leq 0,05$) проявление генотоксического эффекта в концентрациях 0,5 и 1 мг/л. Число микроядер повышалось до 0,72% от общего числа эритроцитов, что может считаться генотоксическим действием исследуемого вещества. Микроядра, при действии различных концентраций DFB, представлены на рисунке 2.

Оценка других аномалий ядра эритроцитов *Danio rerio* показала достоверное увеличение нарушений морфологии ядер. Так, достоверное увеличение ($p < 0,05$) notched nuclei (NN) и lobbed nuclei (LN) отмечалось в концентрациях 1 и 2 мг/л (рис. 3). Значительный рост данных аномалий происходит уже через 24 ч после начала эксперимента. Blebed nuclei не показывает четкой зависимости от концентраций исследуемого вещества, только на 4 сут опыта, при концентрациях 1 и 2 мг/л, частота встречаемости достоверно отличалась от контроля ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Ряд авторов указывает на отсутствие генотоксичности у DFB, особенно на высших позвоночных животных [8; 29]. Работы, проведенные на рыбах, показывают незначительную возможность возникновения генетических аномалий, которые связывают не столько с исходным веществом, сколько с продуктами его разложения [18; 3].

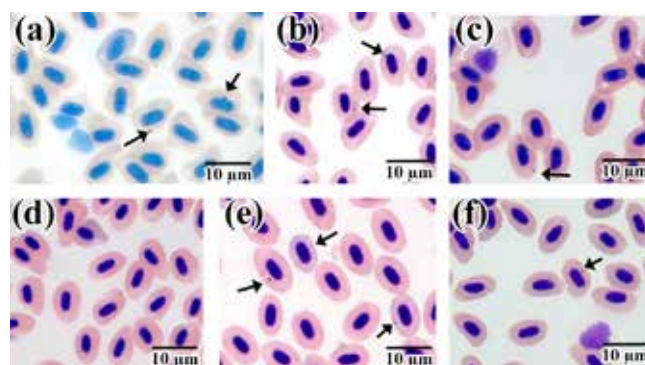


Рисунок 2. Микрофотографии эритроцитов подопытных рыб в различных опытных концентрациях: (а) – 0,5 мг/л; (б) – 1 мг/л; (с) – 1 мг/л; (д) – контроль; (е) – 2 мг/л; (ф) – 2 мг/л; Шкала масштаба 10 мкм

Figure 2. Micrographs of erythrocytes of experimental fish in various experimental concentrations: (a) - 0.5 mg/l; (b) - 1 mg/l; (c) - 1 mg/l; (d) - control; (e) - 2 mg/l; (f) - 2 mg/l; Scale scale 10 microns

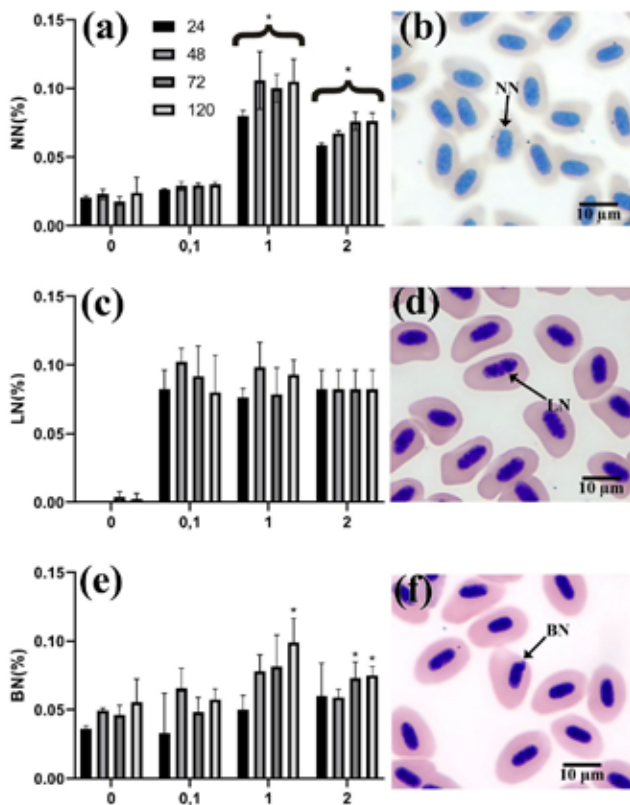


Рисунок 3. Частота встречаемости аномалий ядра эритроцитов: (a) - Notched nuclei, достоверно отличаются концентрации 1 и 2 мг/л; (b) - NN в группе 1 мг/л; (c) - lobbed nuclei, достоверно отличаются все опытные группы; (d) - LN в группе 0.1 мг/л; (e) - blebed nuclei; (f) - BN в группе 2 мг/л; NN - notched nuclei; LN - lobbed nuclei; BN - blebed nuclei; Значения достоверности от контроля получены с помощью двустороннего теста ANOVA с пост-хок тестом Тьюки: * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,001$

Figure 3. Frequency of occurrence of erythrocyte nucleus anomalies: (a) - Notched nuclei, concentrations of 1 and 2 mg/l significantly differ; (b) - NN in the 1 mg/L group; (c) - lobbed nuclei, all experimental groups significantly differ; (d) - LN in the 0.1 mg/L group; (e) - blebed nuclei; (f) - BN in the 2 mg/L group; NN - notched nuclei; LN - lobbed nuclei; BN - blebed nuclei; Confidence values from the control were obtained using a bidirectional ANOVA test with a post-hoc Tukey test: * - $P < 0.05$; ** - $P < 0.001$

В части работ по исследованию генотоксических свойств пестицидов исследователи ограничивают срок воздействия тремя сутками [19; 29; 15], объективно считая, что за это время произойдут изменения в ядерном аппарате эритроцитов, поступивших в кровотоки.

В данной работе был увеличен срок экспозиции по двум причинам: пятидневная экспозиция позволяет выявить динамику возникновения ядерных аномалий, с учетом скорости эритропоэза *D. rerio* [17]; появляется возможность оценить генотоксичность продуктов разложения DFB [20].

Частота встречаемости MN в течение эксперимента носила не линейный характер, связанный, по мнению авторов, с активностью эритропоэза. Полученные данные позволяют предположить, что оценку генотоксичности таких веществ, как DFB, обладающих неявным действием на генетический аппарат, необходимо проводить при более длительной экспозиции с поддержанием постоянной концентрации вещества в водной среде. При этом стоит уделять особое внимание факторам, влияющим на интенсивность эритропоэза, условиям содержания рыб [21]. В стандартных лабораторных условиях образование клеток с MN в периферической крови занимает около суток [22], после чего их количество возрастает, если концентрация токсиканта в воде не изменяется. Максимальный уровень MN в данной работе в периферической крови составлял 0,73% (на 5 сут), при этом границы нормальных значений, по данным разных авторов, находятся в пределах до 0,5% [17; 23]. Следует отметить, что при применении других пестицидов уровень MN в эритроцитах периферической крови рыб может достигать 0,8-0,9% [24].

Другие ядерные аномалии проявлялись уже на первые сутки опыта, но их количество было значительно ниже количества MN. Возможно, изменение морфологии ядра происходит на более поздних стадиях дифференцировки эритроцитов и требует меньшего количества времени для проявления видимых нарушений. Несмотря на достоверное отличие полученных значений ядерных аномалий от контроля, невозможно утверждать о наличии выраженного генотоксического эффекта от DFB. Некоторые токсиканты могут вызывать увеличение количества ядерных аномалий, не сопровождающееся образованием MN [25; 26].

В работах других авторов частота встречаемости ядерных аномалий варьировалась в широких пределах, в зависимости от используемого вещества, времени экспозиции и вида рыб [10; 11; 12; 16; 21]. Это позволяет предположить, что, несмотря на универсальность данного метода, диапазон его применения ограничен низкими концентрациями полплатана. Высокие концентрации, которые проявляют видимый токсический эффект, снижающие митотическую активность, не могут оцениваться с помощью данного метода. При необходимости всестороннего изучения генотоксичности необходимо, помимо микроядерного теста, использовать другие стандартные способы оценки, в частности, метод комет.

ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований, при использовании микроядерного теста на периферической крови *Danio rerio*, впервые было установлено достоверно наличие генотоксического эффекта DFB.

На 1-4 сут опыта не отмечалось достоверного увеличения количества микроядер и других ядерных аномалий во всех исследуемых концентраци-

ях. Достоверный генотоксический эффект наблюдался при концентрациях 0,5 и 1 мг/л на 5 сут экспозиции, частота встречаемости микроядер при этом составляла 0,73%. Среди ядерных аномалий наиболее часто встречались клетки с деформированным ядром.

Отсутствие увеличения встречаемости ядерных аномалий на 1-4 сут опыта вероятнее вызвано токсическим воздействием, не затрагивающим генетический аппарат.

Полученные результаты не дают однозначного ответа о безопасности дифлубензурана в исследуемых концентрациях и требуют дополнительных исследований на других тест-объектах, а также использования других методов оценки генотоксичности.

ЛИТЕРАТУРА И ИСТОЧНИКИ:

- Burka, J. F., Hammell, K. L., Horsberg, T. E., Johnson, G. R., Rainnie, D. J., & Speare, D. J. (1997). Drugs in salmonid aquaculture—a review. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 20(5), 333-349.
- World Health Organization. (2018). *Dengue and Severe Dengue*. Factsheet on dengue. Available in: Accessed in: 25 May. 2021.
- Benze, T. P., Sakuragui, M. M., de Paula Zago, L. H., & Fernandes, M. N. (2016). Subchronic exposure to diflubenzuron causes health disorders in neotropical freshwater fish, *P. rochilodus lineatus*. *Environmental toxicology*, 31(5), 533-542.
- Retnakaran, A., & Wright, J. E. (1987). Control of insect pests with benzoylphenyl ureas. In *Chitin and benzoylphenyl ureas* (pp. 205-282). Springer, Dordrecht.
- Fischer, S. A., & Hall, L. W. (1992). Environmental concentrations and aquatic toxicity data on diflubenzuron (Dimilin). *Critical reviews in toxicology*, 22(1), 45-79.
- Ivie, G. W., Bull, D. L., & Veech, J. A. (1980). Fate of diflubenzuron in water. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 28(2), 330-337.
- Olsvik, P. A., Samuelsen, O. B., Erdal, A., Holmelid, B., & Lunestad, B. T. (2013). Toxicological assessment of the anti-salmon lice drug diflubenzuron on Atlantic cod *Gadus morhua*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105, 27-43.
- De Barros, A. L., Cavalheiro, G. F., de Souza, A. V. M., Traesel, G. K., Anselmo-Franci, J. A., Kassuya, C. A. L., & Cristina Arena, A. (2016). Subacute toxicity assessment of diflubenzuron, an insect growth regulator, in adult male rats. *Environmental toxicology*, 31(4), 407-414.
- Schaefer, C. H., Dupras, E. F., Stewart, R. J., Davidson, L. W., & Colwell, A. E. (1979). The accumulation and elimination of diflubenzuron by fish. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 21(1), 249-254.
- Elhajouji, A., Lukamowicz, M., Cammerer, Z., & Kirsch-Volders, M. (2011). Potential thresholds for genotoxic effects by micronucleus scoring. *Mutagenesis*, 26(1), 199-204.
- Bolognesi, C., & Hayashi, M. (2011). Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, 26(1), 205-213.
- Carrola, J., Santos, N., Rocha, M. J., Fontainhas-Fernandes, A., Pardal, M. A., Monteiro, R. A., & Rocha, E. (2014). Frequency of micronuclei and of other nuclear abnormalities in erythrocytes of the grey mullet from the Mondego, Douro and Ave estuaries—Portugal. *Environmental science and pollution research*, 21(9), 6057-6068.
- Segner, H. (2009). Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(2), 187-195.
- Brand, M., Granato, M., & Nüsslein-Volhard, C. (2002). Keeping and raising zebrafish. *Zebrafish: a practical approach*, 7-37.
- Abe, F. R., Machado, A. A., Coleone, A. C., da Cruz, C., & Machado-Neto, J. G. (2019). Toxicity of diflubenzuron and temephos on freshwater fishes: ecotoxicological assays with *Oreochromis niloticus* and *Hyphessobrycon eques*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 230(3), 1-10.
- Bagdonas, E., & Vosylienė, M. Z. (2006). A study of toxicity and genotoxicity of copper, zinc and their mixture to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biologija*, (1).
- Simakov, Y. G., Purtskhvanidze, V. A., Golovacheva, N. A., Bychkova, L. I., & Omelchuk, N. N. (2020). Stimulation of Erythropoiesis and Regenerative Processes in the *Danio Rerio* Fish Under the Influence of Interleukin-2. *International Journal of Advanced Research in Engineering and Technology (IJARET)*, 11(5).
- Prasad, I. (1970). Mutagenic effects of the herbicide 3', 4'-dichloropropionanilide and its degradation products. *Canadian journal of microbiology*, 16(5), 369-372.
- Brodeur, J. C., Malpel, S., Anglesio, A. B., Cristos, D., D'andrea, M. F., & Poliserpi, M. B. (2016). Toxicities of glyphosate-and cypermethrin-based pesticides are antagonistic in the ten-spotted livebearer fish (*Cnesterodon decemmaculatus*). *Chemosphere*, 155, 429-435.
- Zaidi, N., Farine, J. P., & Soltani, N. (2013). Experimental study on diflubenzuron: degradation in freshwater and bioconcentration in mosquitofish following chronic exposure. *Journal of Environmental Protection*, 4(2), 188-194.
- Soldatov, A. A. (2005). Peculiarities of organization and functioning of the fish red blood system. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 41(3), 272-281.
- Soldatov, A. A. (2005). Peculiarities of organization and functioning of the fish red blood system. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 41(3), 272-281.
- D'Costa, A. H., Shyama, S. K., Kumar, M. P., & Fernandes, T. M. (2018). Induction of DNA damage in the peripheral blood of zebrafish (*Danio rerio*) by an agricultural organophosphate pesticide, monocrotophos. *International Aquatic Research*, 10(3), 243-251.
- Nwani, C. D., Nagpure, N. S., Kumar, R., Kushwaha, B., Kumar, P., & Lakra, W. S. (2011). Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. *Environmental toxicology and pharmacology*, 31(2), 314-322.
- Ahmad, I., & Ahmad, M. (2016). Fresh water fish, *Channa punctatus*, as a model for pendimethalin genotoxicity testing: A new approach toward aquatic environmental contaminants. *Environmental toxicology*, 31(11), 1520-1529.
- Ayllon, F., & Garcia-Vazquez, E. (2000). Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 467(2), 177-186.
- Simakov, Yuri Georgievich, Violetta Aleksandrovna Purtskhvanidze, Nadezhda Nikolaevna Omelchuk, Larisa Ivanovna Bychkova, and Natalia Alekseevna Golovacheva. "Testing the Effect of Nutrients for The Personalized Nutrition with The *Danio Rerio* Fish (On the Example of The Nanodessert Nutritional Fermented Dairy Product)." *International Journal of Engineering Trends and Technology* 68, no. 7 (July 25, 2020): 13-18. doi:10.14445/22315381/ijett-v68i7p203s.
- Fanta E. et al. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food // *Ecotoxicology and environmental safety*. – 2003. – T. 54. – №. 2. – С. 119-130.
- De Souza J. P. et al. Acute toxicity and environmental risk of diflubenzuron to *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* and *Lemna minor* in the absence and presence of sediment // *Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente*. – 2011. – T. 21.