

## УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ БИОТЕСТИРОВАНИЯ КАЧЕСТВА ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ОПАСНОСТИ ПРОМЫШЛЕННЫХ ОТХОДОВ

Рассмотрены условия использования методов биоиндикации в контроле объектов окружающей среды. Обоснована необходимость оценки экологической опасности промышленных отходов методами биоиндикации. Усовершенствованы известные методы биотестирования качества объектов окружающей среды с учетом специфики промышленных отходов. Предложен алгоритм оценки потенциальной опасности промышленных отходов для окружающей природной среды с использованием методов биоиндикации.

Розглянуті умови використання методів біоіндикації в контролі об'єктів довкілля. Обґрунтована необхідність оцінки екологічної небезпеки промислових відходів методами біоіндикації. Вдосконалені відомі методи біотестування якості об'єктів довкілля з врахуванням специфіки промислових відходів. Запропонований алгоритм оцінки потенційної небезпеки промислових відходів для довкілля з використанням методів біоіндикації.

Conditions of the bioindication methods use in the control of environmental objects are considered. The necessity of assessment of ecological danger of industrial wastes is grounded by the bioindication methods. The known methods of biotesting of environmental objects quality are improved taking into account the specific of industrial wastes. The algorithm of potential danger of industrial wastes assessment is offered with the use of bioindication methods.

В настоящее время нормирование антропогенного загрязнения окружающей среды базируется на санитарно-гигиенических принципах, то есть на необходимости защиты человека. Значения предельно допустимых концентраций различных веществ в воде, воздухе и почве, по которым в основном и ведется нормирование поступления промышленных отходов в окружающую среду, устанавливаются именно исходя из степени опасности для человека. Безусловно, это справедливо, но этого недостаточно по нескольким причинам. Во-первых, в некоторых случаях соблюдение гигиенических нормативов содержания загрязняющих веществ в окружающей среде не обеспечивает безопасности человека, так как растения и животные, населяющие загрязняющую территорию, концентрируют в себе загрязнения, и по трофическим цепям в организм человека они могут попасть в количествах, в десятки раз превышающих ПДК. Во-вторых, нет оснований однозначно утверждать, что санитарно-гигиенические нормативы, установленные относительно человека, обеспечивают безопасность остальных биотических компонентов и экосистемы в целом.

Один из возможных вариантов решения этой проблемы – применение методов биоиндикации антропогенных воздействий на экосистемы и их компоненты.

**Формулировка проблемы.** Использование биоиндикаторов для оценки экологической опасности промышленных отходов возможно только при выполнении определенных условий:

1. Тест-организмы не должны гибнуть при резких изменениях условий тестирования.

2. Биоиндикаторы должны быть представлены по возможности в большом количестве и обладать генетически однородными свойствами.

3. Тест-объекты должны обеспечивать возможность несложного отбора проб и иметь визуально оцениваемые параметры.

4. Тестирование на этих организмах не должно требовать больших затрат времени и сил.

5. Результаты индикации должны быть достаточно репрезентативными и стабильными, диапазон погрешностей измерений по сравнению другими методами тестирования не должен превышать 20 %.

Этим требованиям полностью соответствуют растения. Среди всех живых организмов, используемых для целей биоиндикации, им по праву принадлежит одно из первых мест. Они достаточно устойчивы к резким изменениям естественных экологических факторов и в то же время достаточно чувствительны к влиянию антропогенных факторов. В условиях одного эксперимента растения могут быть представлены десятками и сотнями генетически однородных организмов. Изменения в росте и развитии растений легко идентифицируются визуально, при проведении опытов нет необходимости в сложном дорогостоящем оборудовании и т.д.

Таким образом, методы биоиндикации с помощью растений удовлетворяют условиям определения оценки экологической опасности отходов и могут быть использованы для решения этой задачи. С целью получения более достоверной информации о степени опасности отходов тестирование необходимо проводить на нескольких уровнях биоиндикации. Среди всего многообразия биотестов для данных исследований были выбраны «ростовой тест» и «*Allium*-тест», относящиеся соответственно к организменному и клеточному уровням биоиндикации.

#### **Методы исследования.**

##### *Особенности ростового теста при биотестировании отходов*

Сущность ростового теста состоит в учете всхожести, интенсивности прорастания семян и изменений показателей роста проростков индикаторной культуры, выращенных на исследуемых образцах почвы, воды, водных вытяжек почв, илов, отходов и т.д.

Использование ростового теста для определения токсичности твердых промышленных отходов имеет свои особенности. В отличие от почвы, воды, донных отложений и других естественных объектов, отходы являются не природными, а искусственными образованиями, степень токсичности которых, как правило, значительно превышает токсичность объектов окружающей среды. Поэтому при исследовании токсичных свойств отходов целесообразно проводить биотестирование как самих отходов, так и водной вытяжки из них, особенно принимая во внимание традиционные условия их хранения и вымывание из них атмосферными осадками водорастворимых токсикантов.

Необходимо отметить, что в изученной нормативной литературе отсутствуют четкие требования к приготовлению водной вытяжки из отходов, за исключением «Методики определения состава и свойств промышленных отходов с целью установления возможности и условий их приема на городские полиго-

ны твердых бытовых отходов” [1], в соответствии с которой вытяжку получают путем разбавления отходов водой питьевого качества в соотношении 1:1, при этом необходимое время контакта воды с отходами составляет 15 суток. Однако данная методика предусматривает определение физико-химических свойств промышленных отходов. Очевидно, при определении их потенциальной токсичности время приготовления водной вытяжки может быть иным в зависимости от вида тест-культуры и других условий.

Поэтому с целью адаптации ростового теста к особенностям тестирования промышленных отходов и определения рационального времени приготовления водной вытяжки, данный параметр в ходе экспериментов варьировался от нескольких минут до пятнадцати суток.

Для кратковременных опытов с целью определения острой фитотоксичности в качестве тест-объектов обычно используют несколько видов растений, отличающихся быстрым прорастанием семян: в данном случае выбор был остановлен на трех классических для ростового теста и типичных для климатических условий тест-культурах: (лук репчатый) *Allium cepa* L., (редис посевной) *Raphanus sativus* L. и (пшеница мягкая) *Triticum aestivum* L. Использование трех различных видов растений позволило выявить культуру, наиболее чувствительную к токсическому воздействию промышленных отходов.

Для оценки токсичности промышленных отходов по ростовому тесту использовалась водная вытяжка из шлака и золы уноса Днепропетровского мусоросжигательного завода.

Показателем фитотоксичности водной вытяжки отходов служило статистически достоверное ингибирование учитываемых признаков (количество проросших семян, длина корневой системы, масса корневой системы, длина надземной части и т.д.) по сравнению с аналогичными показателями в контроле.

Фитотоксический эффект (ФЭ), то есть степень угнетения ростовых процессов определялся в процентах по отношению к контролю (по массе и по длине ростков либо корней тест-культуры) по формуле [2]:

$$\text{ФЭ} = \frac{m_o - m_x}{m_o} \cdot 100\%, \quad (1)$$

где  $m_o$  – масса или длина проростков (корня или надземной части) в контроле;  $m_x$  – то же, в вариантах.

Таким образом, ростовой тест является перспективным методом экспрессной оценки фитотоксичности промышленных отходов, однако для учета специфики продуктов сжигания твердых бытовых отходов (ТБО) он нуждается в усовершенствовании, а именно в обосновании рационального времени приготовления водной вытяжки, продолжительности опыта и вида чувствительной тест-культуры.

#### *Особенности Allium-теста при биотестировании отходов*

Среди множества тест-систем клетки апикальной меристемы лука (*Allium*-тест) являются одной из наиболее удобных моделей для оценки цито- и генотоксических эффектов поллютантов: крупные размеры клеток и морфология хромосом дают возможность четко охарактеризовать хромосомные aberrации и другие нарушения митоза. Кроме того, лук, как и все высшие растения,

является эукариотом, структурная организация его хромосом приближена к хромосомному аппарату человека и животных, и все процессы, происходящие в его клетках идентичны процессам, происходящим в животных клетках.

Успешный многолетний опыт оценки качества объектов окружающей среды (почвы, воды, донных отложений) по *Allium*-тесту позволяет рекомендовать его для оценки степени токсичности и мутагенности промышленных отходов и, в частности, продуктов сжигания ТБО. Одним из основных преимуществ данного метода является возможность одновременного исследования и цитотоксичности, и мутагенности исследуемых объектов на одном препарате, то есть получить две оценки экологической опасности отходов вместо одной. Но принимая во внимание тот факт, что *Allium*-тест традиционно используется для исследования токсических и мутагенных свойств объектов окружающей среды, он нуждается в адаптации к особенностям тестирования твердых промышленных отходов, поэтому в ходе экспериментов также варьировалось время приготовления водной вытяжки из шлака и золы-уноса с целью выбора его рационального значения.

Для тестирования отходов Днепропетровского мусоросжигательного завода (ДМСЗ) проводилось проращивание семян лука на фильтровальной бумаге в чашках Петри на шлаке и золе уноса, а также на водной вытяжке из отходов. Для достоверности эксперимента каждый вариант исследования был представлен тремя повторностями.

Величина митотического индекса (*MI*) определялась как отношение количества клеток, которые делятся, к общему количеству просмотренных клеток и выражалась в промилле [3]:

$$MI = \frac{m'}{n} \cdot 1000, \quad (2)$$

где  $m'$  – количество делящихся клеток;  $n$  – количество исследованных клеток.

Снижение величины митотического индекса в сравнении с контролем, свидетельствует о цитотоксическом действии загрязнителей, содержащихся в исследуемых образцах.

На этих же препаратах учитывались клетки с абберрантными хромосомами: мосты и фрагменты в анафазах и телофазах, а также слипание, пульверизация и фрагменты хромосом в метафазе. Частота встречаемости патологических фигур митоза  $A^x$  выражалась в процентах от количества делящихся клеток по формуле:

$$A^x = \frac{G}{m'} \cdot 100, \quad (3)$$

где  $G$  – количество абберрантных клеток;  $m'$  – количество делящихся клеток.

Возрастание числа патологических фигур митоза в сравнении с контролем свидетельствует об увеличении мутагенности исследуемых образцов.

Таким образом, *Allium*-тест также является информативным и перспективным методом экспрессной оценки цитотоксичности и мутагенности промышленных отходов. Целью проведения этого теста является нахождение величины цитотоксического и мутагенного эффекта, который оказывают иссле-

двумя отходами на тест-объект, а также усовершенствование данного метода путем обоснования рационального времени приготовления водной вытяжки из продуктов сжигания ТБО.

### Обсуждение результатов.

#### Исследование фитотоксических свойств отходов методом биоиндикации

В результате проведенного биотестирования получена зависимость величины фитотоксического эффекта ( $\Phi E$ , %) от времени выщелачивания исследуемых отходов ( $t$ , суток), которая носит полиномиальный характер и имеет вид ( $R^2=0,95-0,99$ ):

- для *Raphanus sativus* L.-

$$\Phi E(t)=0,0044t^5-0,168t^4+2,313t^3-13,836t^2+34,21t-1,799; \quad (4)$$

- для *Allium cepa* L. –

$$\Phi E(t)=0,0046t^5-0,189t^4+2,826t^3-18,11t^2+46,4t; \quad (5)$$

- для *Triticum aestivum* L. –

$$\Phi E(t)=0,004t^5-0,158t^4+2,318t^3-15,39t^2+46,41t-0,26. \quad (6)$$

Проверка полученных уравнений на адекватность выполнялась с помощью критерия Фишера  $F$  при заданном уровне достоверности  $\alpha$ . Для всех уравнений  $F_b > F_{k1;k2;\alpha}$ , то есть выбранные зависимости адекватно описывают результаты экспериментов.

Результаты сравнения чувствительности использованных тест-культур по отношению к токсическому воздействию исследуемых отходов приведены в таблице 1, где показаны значения фитотоксического эффекта, выявленного у различных видов растений в вариантах с 15-ти суточной вытяжкой ( $\Phi E_{15}$ ).

Таблица 1

Сравнение чувствительности тест-культур по величине  $\Phi E$

Тест-культура	$\Phi E_{15}$ , %	
	шлак	зола уноса
<i>Raphanus sativus</i> L. (редис посевной)	40,9	95,7
<i>Allium cepa</i> L. (лук репчатый)	52,4	100,0
<i>Triticum aestivum</i> L. (пшеница мягкая)	77,0	100,0

Из данных табл. 1 видно, что и шлак, и зола уноса ДМСЗ обладают явно выраженной фитотоксичностью – у различных тест-объектов этот показатель колеблется в пределах 41...100 %, при этом зола уноса в среднем в два раза токсичнее, чем шлак.

Также установлено, что для выявления максимального значения  $\Phi E$  при определении фитотоксичности промышленных отходов по ростовому тесту время приготовления вытяжки из отходов должно составлять не менее 15 суток.

Что касается чувствительности использованных культур, т.е. степени их реакции на оказываемое воздействие, то в порядке возрастания чувствительности их можно ранжировать следующим образом: *Raphanus sativus* L. → *Allium cepa* L. → *Triticum aestivum* L. (рис. 1), а продолжительность опыта, необходимая и достаточная для обнаружения фитотоксических свойств продуктов сжигания ТБО, составляет 72 часа.

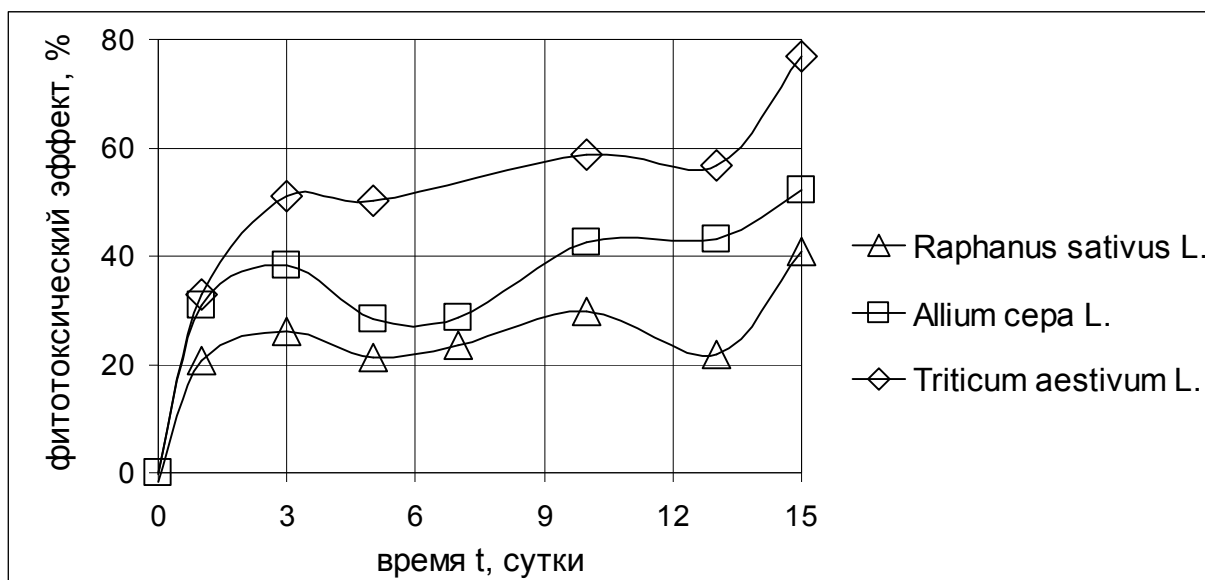


Рис. 1. Определение оптимального времени приготовления вытяжки из продуктов сжигания ТБО и наиболее чувствительной тест-культуры

*Исследование цитотоксических свойств отходов методом биоиндикации*

Результаты определения величины митотического индекса представлены на рисунке 2. Во всех вариантах исследования было отмечено статистически достоверное снижение митотической активности по сравнению с контролем, что свидетельствует о наличии у вытяжки из шлака ДМСЗ токсического эффекта на клеточном уровне (цитотоксичности). Наибольшее угнетение процессов роста и развития биообъекта было отмечено в варианте с 13-суточной и 15-суточной вытяжкой – митотический индекс был равен 44,75 ‰ и 46,00 ‰, что соответственно на 66,9 % и 66,0 % ниже, чем в контроле.

Для выявления зависимости общего митотического индекса в клетках *Allium cepa L.* от времени выщелачивания шлака была выполнена математическая обработка результатов эксперимента. Наиболее адекватно зависимость интенсивности клеточного деления от времени выщелачивания описывает полиномиальное уравнение регрессии вида:

$$MI(t) = -0,0024t^5 + 0,109t^4 - 1,81t^3 + 13,33t^2 - 41,9t + 97,99; \quad (7)$$

достоверность аппроксимации при этом составляет 72% ( $R^2 = 0,72$ ). График полученной функции также представлен на рисунке 2.

Анализ полученного полиномиального уравнения  $MI(t)$  с помощью производной второго порядка показал, что на промежутке  $[0, 1]$  функция имеет три экстремума, при этом первый минимум находится в точке (3; 52). Следовательно, общий митотический индекс в клетках фитоиндикатора снижается в течение первых трех суток, достигая минимального значения 52 ‰ (что на 62 % ниже, чем в контроле). Различие между максимальным значением интенсивности клеточного деления  $MI(0) = 98 \text{ ‰}$  и минимальным значением  $MI(15) = 47 \text{ ‰}$  составляет 51 ‰, и большая часть этих нарушений (90%) происходит именно в течение первых трех суток. Следовательно, вытяжка из шлака ДМСЗ обладает явно выраженной цитотоксичностью, а время выщелачивания данных отходов, достаточное для установления цитотоксического эффекта, составляет трое су-

ток (вместо стандартных 15-ти суток), т.е. *Allium*-тест является более оперативным методом оценки экологической опасности отходов, нежели ростовой тест.

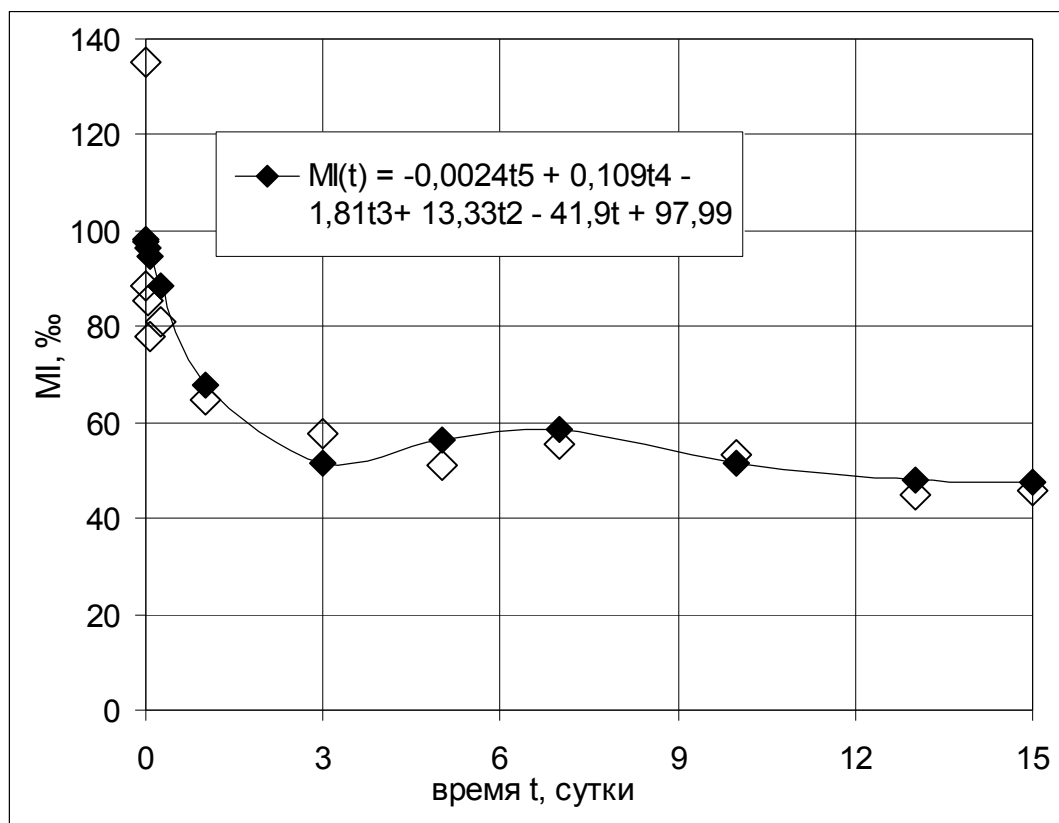


Рис. 2. Зависимость величины митотического индекса в меристематических клетках *Allium cepa L.* от времени выщелачивания шлака ДМСЗ

#### *Исследование мутагенных свойств отходов методом биоиндикации*

Анализ результатов *Allium*-теста на отходах Днепропетровского МСЗ показал, что комплекс загрязняющих веществ, содержащихся в шлаке, помимо цитотоксического эффекта, обладает и сильным мутагенным действием. Во всех исследуемых вариантах количество хромосомных аберраций в клетках лука, выращенного на вытяжке из шлака, значительно превышало контроль.

В меристемах фитоиндикатора наблюдались разнообразные хромосомные патологии: мосты и фрагменты в анафазах и телофазах, а также слипание хромосом в метафазах. Даже в случае, когда время контакта воды со шлаком составляло 5 минут, количество фигур митоза с хромосомными аномалиями превышало уровень абберрантности в контроле в 3,6 раза. Также было отмечено, что при увеличении времени взаимодействия шлака с водой резко возрастает мутагенная активность вытяжки.

Для выявления зависимости количества хромосомных патологий в клетках *Allium cepa L.* от времени выщелачивания шлака  $A^x(t)$  была выполнена математическая обработка результатов эксперимента. В связи с тем, что время выщелачивания шлака, необходимое и достаточное для определения цитотоксического эффекта по *Allium*-тесту, как отмечалось ранее, составляет трое суток, для математической обработки были использованы экспериментальные данные во временном диапазоне до трех суток.

Наибольший коэффициент детерминации ( $R^2 = 0,88$ ) был получен для экспоненциального уравнения регрессии вида  $A^x(t) = a \cdot t^b \cdot \exp(-c \cdot t)$  при  $a = 19,6$ ;  $b = 0,29$  и  $c = 0,44$ . Проверка полученной модели по  $F$ -критерию Фишера подтвердила ее адекватность результатам эксперимента, поскольку коэффициент Фишера  $F_{6;5;0,05} = 4,95$ , для данного случая  $F_b = 6,99$ ;  $F_b > F_{k1;k2;\alpha}$ .

На рисунке 3 представлена полученная зависимость количества хромосомных аберраций в меристемах тест-объекта от времени выщелачивания шлама. Анализ полученного экспоненциального уравнения  $A^x(t)$  с помощью производной второго порядка показал, что данная функция имеет максимум в точке  $(0,7; 13)$ , т.е. при выщелачивании исследуемых отходов на протяжении суток количество хромосомных патологий в клетках фитоиндикатора достигает максимального значения – 13%, что в 7,6 раза превышает этот показатель в контроле. Таким образом, установлено, что для определения уровня мутагенности данных отходов необходимое и достаточное время приготовления вытяжки составляет одни сутки.

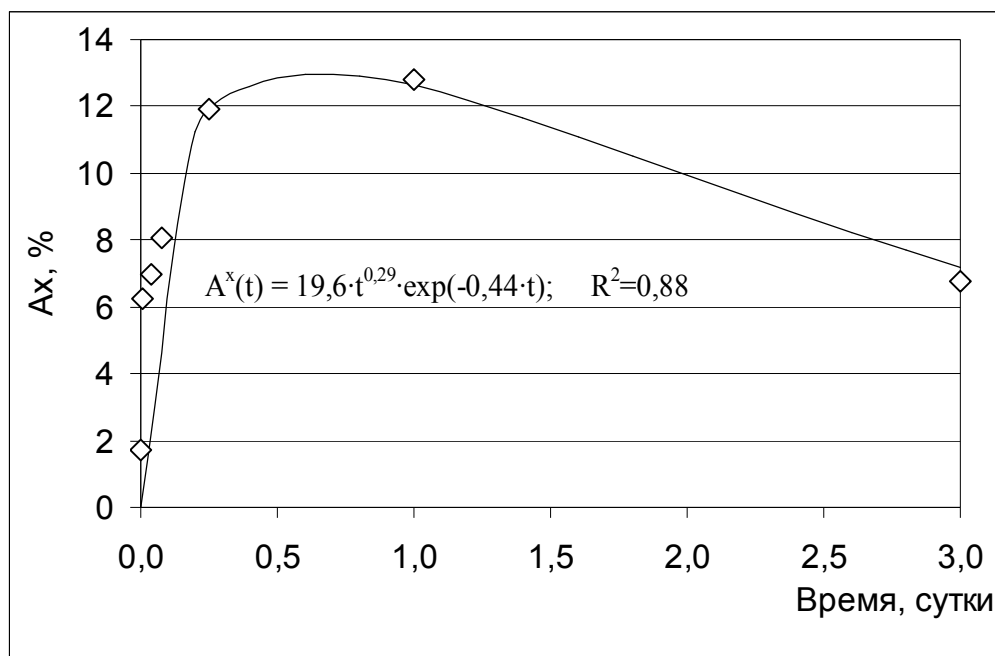


Рис. 3. Зависимость количества аберрантных фигур митоза в меристематических клетках *Allium cepa L.* от времени выщелачивания шлама

В результате проведенных исследований установлен эффект цитотоксического и мутагенного влияния шлама Днепропетровского МСЗ на тест-культуру *Allium cepa L.*, который проявляется в угнетении интенсивности клеточного деления и увеличении количества хромосомных патологий в меристемах индикатора. При этом проявление цитотоксических и мутагенных свойств шлама носит неравномерный характер и зависит от времени выщелачивания вытяжки из отходов – 90% нарушений в клетках лука происходят при продолжительности приготовления вытяжки от 24 до 72 часов.



Таким образом, полученные зависимости величины митотического индекса и количества аберрантных хромосом в клетках фитоиндикатора позволили определить время выщелачивания отходов, необходимое и достаточное для обнаружения их потенциальной экологической опасности: для определения цитотоксических свойств шлака это время составляет трое суток, для определения мутагенных свойств – одни сутки. Следовательно, *Allium*-тест является информативным и оперативным методом оценки экологической опасности не только объектов окружающей среды, но и промышленных отходов, при этом данный метод позволяет за относительно непродолжительное время получить информацию одновременно о токсических и мутагенных свойствах различных отходов.

**Заключение.** Биотестирование промышленных отходов на клеточном и организменном уровне биоиндикации является необходимым условием определения их потенциальной экологической опасности. Биотестирование отходов на клеточном уровне позволяет выявить ранние нарушения в функционировании тест-объекта, в то время как исследование отходов на организменном уровне биоиндикации отражает накопление соответствующих патологических изменений на предыдущих уровнях, т. е. позволяет оценить последствия изменений в клетках для организма в целом.

Учитывая вышеизложенное, предлагается следующий алгоритм оценки потенциальной опасности промышленных отходов для окружающей природной среды.

1. Оценка класса опасности отходов расчетным методом.
2. Оценка класса опасности отходов экспериментальным методом:
  - оценка фитотоксичности отходов по ростовому тесту;
  - оценка цитотоксичности и мутагенности отходов по *Allium*-тесту.
3. Сопоставление результатов расчетов с результатами экспериментальных исследований и уточнение на их основе окончательного класса опасности отходов.

Таким образом, проведение экспериментальных биоиндикационных исследований позволит определить уровень экологической опасности промышленных отходов, сравнить его с результатами, полученными расчетным путем, и на данной основе произвести корректировку класса опасности исследуемых отходов для окружающей природной среды. Это позволит откорректировать заниженные суммы экологического налога, выплачиваемые производителями отходов, и повысить уровень экологической безопасности при обращении с промышленными отходами.

#### Список литературы

1. Предельное количество токсичных промышленных отходов, допускаемое для складирования в накопителях (на полигонах) твердых бытовых отходов : НД №3897-85. — [Действующие от 1985-05-30].
2. Білявський Г. О. Основи екології: теорія та практикум. Навч. посібник / Г. О. Білявський, Л. І. Бутченко. — К. : Лібра, 2004. — С. 268—269.
3. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений / Паушева З. П. — М. : Агропромиздат, 1988. — 271 с.

*Рекомендована до публікації д.т.н Зберовським О.В.  
Надійшла до редакції 30.04.2012.*