

УДК 615.9:658.567.002.8

## ПРИМЕНЕНИЕ ТЕСТ-ОБЪЕКТА *L. STAGNALIS* ДЛЯ ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА

*Войтович А.М., Петрова С.Ю., Ильюкова И.И., Гомолко Т.Н.*

*Республиканский научно-практический центр гигиены, г. Минск, Республика Беларусь*

Как и в других промышленно развитых странах, в Республике Беларусь остро стоит проблема утилизации и захоронения отходов производства. Одной из основных причин является высокая отходоёмкость производственной базы. В ряде городов республики предприятия, несущие градообразующий характер, являются источником крупнотоннажных отходов. Всего в республике образуется более 1500 наименований различных отходов производства, что не позволяет унифицировать применение известных технологических схем сбора и переработки отходов. По большинству видов отходов отсутствует производственная база их вторичного использования и обезвреживания. Поэтому подавляющее число отходов в зависимости от класса токсичности попадают для захоронения на соответствующие полигоны, которые впоследствии становятся источниками поступления потенциально опасных химических веществ в окружающую среду, так как атмосферные осадки способствуют образованию и миграции из отходов широкого спектра органических и неорганических соединений. В дальнейшем они могут попасть в почву, подпочвенные воды, открытые водоемы и включаться в пищевые цепи [1]. Эти процессы увеличивают вероятность возникновения вредного влияния опасных компонентов отходов любой природы: химической, физико-химической, биологической на здоровье человека и окружающую среду [2,3].

В настоящее время в Республике Беларусь Закон «Об обращении с отходами» определяет правовые основы обращения с отходами и направлен на уменьшение объемов образования отходов и предотвращение их вредного воздействия на окружающую среду, здоровье граждан, имущество, находящееся в собственности государства, имущество юридических и физических лиц, а

также на максимальное вовлечение отходов в гражданский оборот в качестве вторичного сырья [4].

Для оптимизации в сфере обращения с отходами производства в рамках отраслевой научно-технической программы «Современные условия жизнедеятельности и здоровьезбережение» на 2013-2015 г. в Республиканском научно-практическом центре гигиены выполняется НИР по разработке и внедрению критериев токсичности и экотоксичности отходов производства.

Для достижения поставленной работой цели перед исследователями стоит задача по поиску простых, недорогих и объективных тест-объектов для оценки токсичности отходов производства.

**Методы исследований.** Беспозвоночных широко используют при токсикологической оценке окружающей среды. Они являются удобным объектом для изучения репродуктивной функции и эмбриотоксического действия, как отдельных веществ, так и комплекса различных соединений неорганической и органической природы [6]. Помимо летального эффекта на самих животных этот подход позволяет изучать цитотоксическое воздействие на гематоциты и мутагенный эффект в микроядерном тесте. Кроме того, на этих животных возможно изучение процессов клеточной гибели.

В Беларуси широко распространен прудовик *Lymnaea stagnalis*. Особенность биологии этих животных такова, что они способны к самооплодотворению, что позволяет использовать в экспериментах животных из одной кладки попарно. При таком подходе уменьшается объем выборки. К тому же водные организмы удобны тем, что в их организме быстро устанавливается равновесие с внешней средой по концентрации растворимых соединений. Для целей исследования были получены разводки животных

от особей, выловленных в естественных водоемах (рисунок 1). Кроме массы животных, можно также отмечать различия в форме раковин животных с максимальными сроками

жизни. К окончанию сроков культивирования можно учитывать различные параметры раковины.

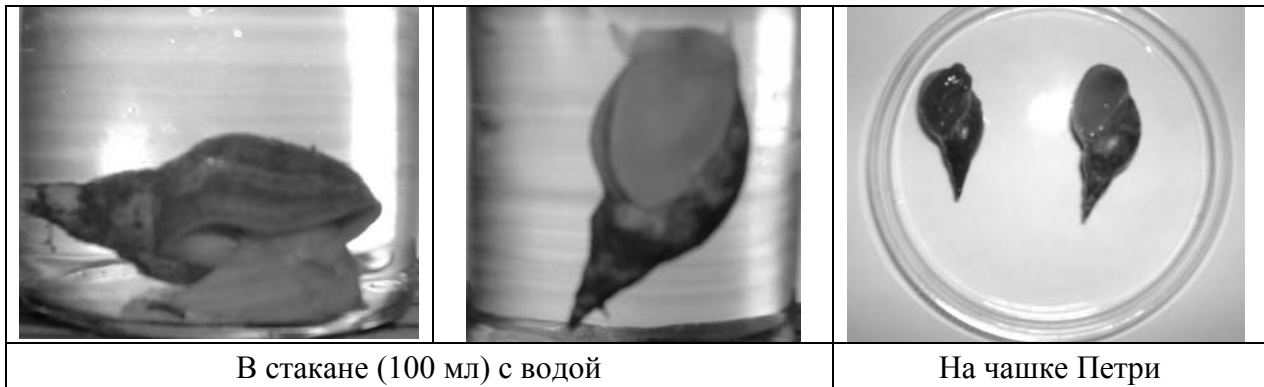
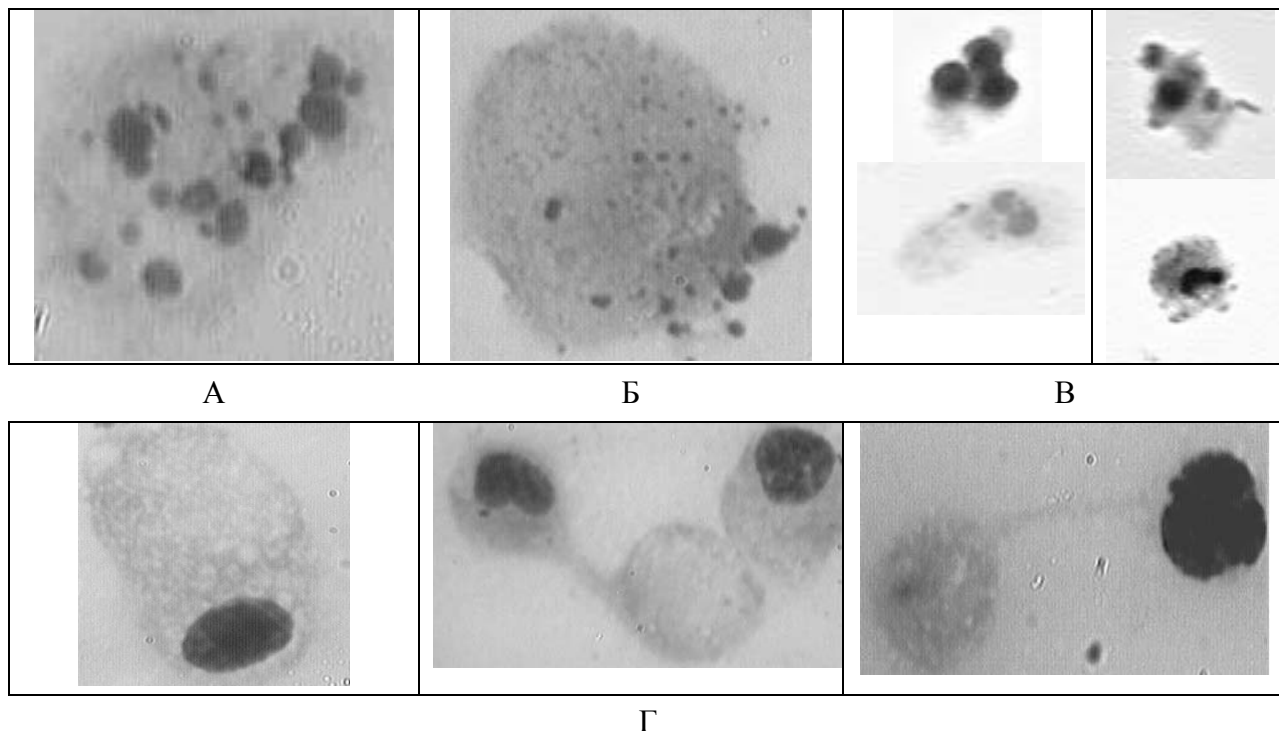


Рисунок 1. Прудовик *Lymnaea stagnalis*.

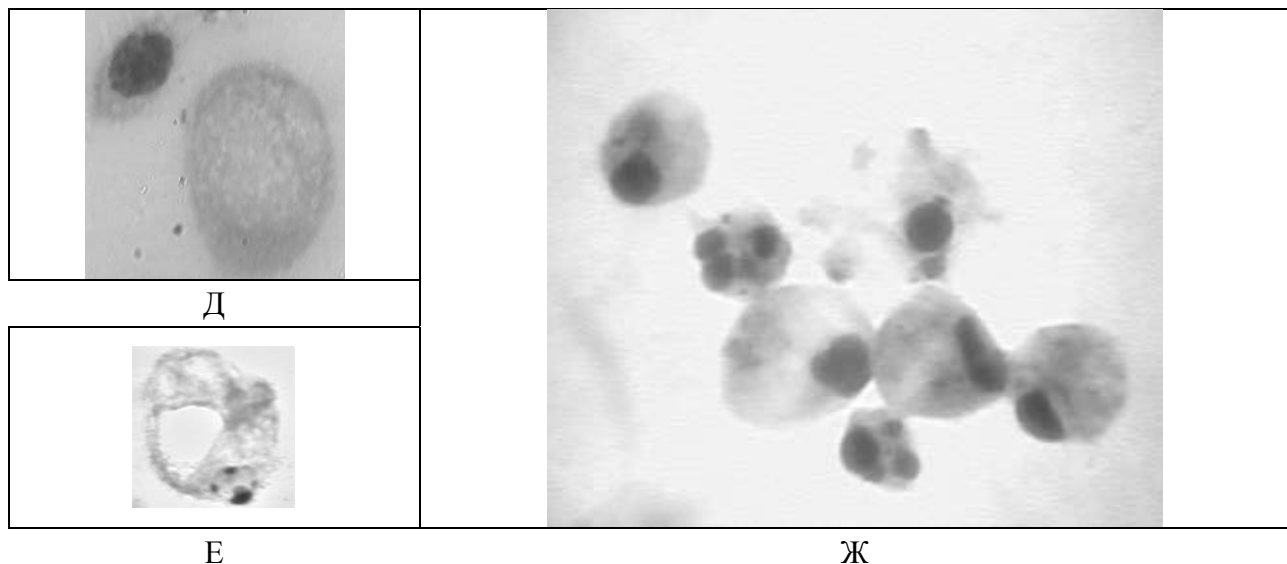
Для целей мониторинга моллюсков, обитающих в условиях повышенного мутагенного фона, необходимо анализировать частоту клеток с микроядрами, т.к. митотическая активность пойкилотермных животных невысокая. Микроядра по своей природе могут представлять, как целую хромосому, так и её часть, поэтому и различаются по своим размерам. Так, можно выделить клетки с крупными и мелкими микроядрами. Микроядра можно отмечать на разных ста-

диях клеточного цикла: на стадии интерфазы и митоза. Микроядра могут приводить к гибели клеток, а также элиминироваться из них, могут быть причиной и/или следствием неравного деления клеток.

Клеточная гибель на препаратах мантийной жидкости моллюсков (рисунок 2) может быть представлена в различной форме и интенсивности в зависимости от условий обитания, возраста животных и сезона наблюдения.



А – митотическая гибель; Б – один из путей формирования апоптотических тел; В – апоптотические тела; Г – процесс редифференцировки.



Д – процесс редифференцировки; Е – фрагментация конденсированного ядра (промежуточная стадия апоптоза); Ж – «поле» апоптоза.

Рисунок 2. Цитологические препараты мантийной жидкости моллюска *Lymnaea stagnalis*.

Как и микроядра, клеточная гибель может наблюдаться на различных стадиях клеточного цикла. Первичными признаками гибели является фрагментация или конденсация ядра клетки, с последующей возможной конденсацией и фрагментацией хроматина (кариорексис – рисунок 2 А).

На рисунке 2 Б представлена элиминация остатков ядерного материала из клетки, что приводит к образованию апоптотических тел (рисунок 2 В).

У животных из диких популяций нами отмечен процесс редифференцировки (рисунок 2 Г), приводящий к формированию клеток с малым цитоплазматическим ядерным соотношением и цитоплазматических остатков (рисунок 2 Д). Такие остатки могут

образовать и путем непосредственной элиминации ядра в клетке (рисунок 2 Е). Поле апоптоза представлено на рисунке 2 Ж.

**Результаты исследований.** Для целей оптимизации использования данной тест-системы были проведены эксперименты по изучению цитогенетических нарушений в мантийной жидкости моллюсков в условиях приближенным природным. С этой целью в качестве потенциально опасных веществ были использованы образцы отходов: шлака свинцового и осадка очистных сооружений гальванического производства.

Результаты санитарно-химических исследований шлака свинцового свидетельствуют о высоком содержании свинца в пересчете на сырой отход (таблица 1).

Таблица 1. Результаты химического анализа шлака свинцового.

Определяемый ингредиент	Обнаружено в расчете на образец, мг/кг
Медь	5050,0
Цинк	242,5
Никель	175,32
Марганец	2163,0
Свинец	140640,0
Хром общий	191,65
Кадмий	46,49
Железо	75710,0
Ртуть	1,76
Мышьяк	20,0

За время проведения эксперимента отмечена гибель всех животных в первой опытной серии и 2-х животных в опытной серии №2. Оставшиеся животные погибли в течение 5 суток. Уровень клеток с микрояд-

рами статистически значительно превышает контрольные значения. Достоверное увеличение в опыте числа клеток с признаками апоптоза свидетельствует о выраженном токсическом действии (таблица 2).

Таблица 2. Цитогенетические повреждения клеток в мантийной жидкости моллюсков.

№ серии	Число животных	Число клеток	% клеток с		
			микроядрами	начальными признаками гибели	конечными признаками гибели (апоптотические тела)
Контроль	10	5100	0,33±0,08	0,25±0,07	0,25±0,07
Опыт (2)	6	2830	0,68±0,14	0,41±0,13	0,18±0,08
Достоверность			p=0,01	p=0,41	p=0,60

Высокое содержание меди по результатам химических исследований отмечено в

осадке очистных сооружений гальванического производства (таблица 3).

Таблица 3. Результаты химического анализа осадка очистных сооружений гальванического производства.

Определяемый ингредиент	Обнаружено в расчете на образец, мг/кг
Медь	3225,0
Цинк	300,0
Никель	24,1
Кадмий	0,52
Свинец	82,6
Хром общий	325,5
Хлориды	440,5
Сульфаты	2620,1
Фосфаты	417,8
Щелочность, ммоль/кг	24,8

За время проведения эксперимента на тест-объекте *L. Stagnalis* на 2-3 сутки погибли все животные при концентрации 50 г отхода на 1 л (10) и 5 г на 1 л (9). При концентрации 50 мг на 1 л наблюдалась частичная

гибель на завершающей стадии эксперимента (3 из 8), остальные погибли в течение 7 суток. Гибель животных в контрольной серии не наблюдалась. Результаты микроядерного теста представлены в таблице 4.

Таблица 4. Цитогенетические повреждения клеток в мантийной жидкости моллюсков.

Группы	Число животных	Число клеток	% клеток с		
			микроядрами	начальными признаками гибели	конечными признаками гибели (апоптотические тела)
Контроль	10	5075	0,39±0,01	0,28±0,01	0,26±0,01
Опыт	5	3000	0,77±0,02*	0,27±0,01	1,67±0,05*
Достоверность			p=0,039	p=0,88	p<0,001

Как видно из результатов цитогенетического теста, осадок очистных сооружений гальванического производства вызвал статистически достоверный рост уровня аберрантных клеток ( $p=0,039$ ) в мантийной жидкости моллюсков – в два раза по сравнению с контролем. Отмечено также семикратное увеличение числа апоптотических тел, характеризующих поздние стадии клеточной гибели ( $p<0,001$ ). Кроме того, на препаратах мантийной жидкости, полученной от разных животных, встречались клетки с признаками некроза и гигантские клетки. Поэтому, учитывая массовую гибель животных, можно предположить, что на формирование микро-

ядер в клетках мантийной жидкости повлияло общетоксическое действие отходов и связанные с ним физиологические процессы. Особо следует отметить выраженное токсическое действие отходов даже при уменьшении концентрации в водной среде на 3 порядка.

Проведенные исследования по оценке воздействия шлама свинцового и осадка очистных сооружений гальванического производства на тест-объекте *L. Stagnalis* позволяют сделать выводы о генотоксическом эффекте в клетках мантийной жидкости моллюсков и токсичности отходов для гидробионтов.

### Выводы

Как показывают результаты исследований использование классического объекта биологии развития – большого прудовика (*Limnea Stagnalis*) открывает возможность одновременного учета *in vivo* цитогенетических повреждений в клетках мантийной жидкости, учета эмбриональной гибели в кладках и оценки нейротоксического воздействия по скорости нервных реакций. Преимуществом такого подхода является проведение исследования на живом организме без нанесения ему повреждений и при соблюдении принципов гуманного отношения. К тому же расширение круга тест-систем и методик значительно расширяет возможности биотестирования, в ряде случаев удешевляет проведение экспериментов и сокращает объемы исследований.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Масловская, Т.И. Анализ образования, использования и удаления отходов в Республике Беларусь / Т.И. Масловская, Н.Б. Кичаева, Г.А. Рускевич // Экологический вестник. – 2010. – №1. – С. 91-99.
2. Русаков Н.В. Отходы, окружающая среда, человек / Н.В. Русаков, Ю.А. Рахманин. – М.: Медицина, – 2004. – 231с.
3. Промышленные и бытовые отходы. Хранение, утилизация, переработка. – М.: ФАИР-ПРЕСС, – 2002. – 336 с.
4. Об обращении с отходами: Закон Республики Беларусь от 20 июля 2007 г. N271-3 (в ред. Законов Республики Беларусь от 08.07.2008 N367-3, от 28.12.2009 N93-3, от 22.12.2011 N328-3, от 07.01.2012 N340-3, от 12.12.2012 N6-3).
5. Киричук Г.Е. Особенности накопления ионов тяжелых металлов в организме двустворчатых моллюсков / Г.Е. Киричук // Гидробиол. Журн. – 2003. – Т.39, – №3. – С. 45-55.
6. Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological overview / D.R. Dixon [et al.] // Mutagenesis. – 2002. – Vol.17, – №6. – P. 495-507.

### **ПРИМЕНЕНИЕ ТЕСТ-ОБЪЕКТА *L. STAGNALIS* ДЛЯ ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА**

*Войтович А.М., Петрова С.Ю., Ильюкова И.И., Гомолко Т.Н.*

*Подавляющее число отходов в зависимости от класса токсичности попадают для захоронения на соответствующие полигоны, которые впоследствии становятся источни-*

ками поступления потенциально опасных химических веществ в окружающую среду: в почву, подпочвенные воды, открытые водоемы и включаются в пищевые цепи. Эти процессы увеличивают вероятность возникновения вредного влияния опасных компонентов отходов любой природы: химической, физико-химической, биологической на здоровье человека и окружающую среду.

Для оптимизации в сфере обращения с отходами производства в рамках отраслевой научно-технической программы «Современные условия жизнедеятельности и здоровьезбережение» на 2013-2015 г. в Республиканском научно-практическом центре гигиены выполняется НИР по разработке и внедрению критериев токсичности и экотоксичности отходов производства.

Для достижения поставленной работой цели перед исследователями стоит задача по поиску простых, недорогих и объективных тест-объектов для оценки токсичности отходов производства.

Методы исследований. Для исследования были получены разводки прудовика *Lymnaea stagnalis* от особей, выловленных в естественных водоемах. Кроме массы животных, можно отмечать различия в форме раковин животных с максимальными сроками жизни. К окончанию сроков культивирования можно учитывать различные параметры раковины. Для целей мониторинга моллюсков, обитающих в условиях повышенного мутагенного фона, необходимо анализировать частоту клеток с микроядрами, т.к. митотическая активность пойкилотермных животных невысокая. Микроядра по своей природе могут представлять, как целую хромосому, так и её часть, поэтому и различаются по своим размерам. Так, можно выделить клетки с крупными и мелкими микроядрами. Микроядра можно отмечать на разных стадиях клеточного цикла: на стадии интерфазы и митоза. Микроядра могут приводить к гибели клеток, а также элиминироваться из них, могут быть причиной и/или следствием неравного деления клеток.

Результаты исследований. Для целей оптимизации использования данной тест-системы были проведены эксперименты по изучению цитогенетических нарушений в мантийной жидкости моллюсков в условиях приближенным природным. С этой целью в качестве потенциально опасных веществ были использованы образцы отходов: шлака свинцового и осадка очистных сооружений гальванического производства.

Проведенные исследования по оценке воздействия шлака свинцового и осадка очистных сооружений гальванического производства на тест-объекте *L. Stagnalis* позволяют сделать выводы о генотоксическом эффекте в клетках мантийной жидкости моллюсков и токсичности отходов для гидробионтов.

#### **APPLICATION TEST-OBJECT *L. STAGNALIS* FOR ECOTOXICOLOGICAL SPECIFICATION OF WASTE PRODUCTION**

*A.M. Wojtowicz, S.Yu. Petrova, I.I. Ilyukova, T.N. Gomolko*

*The vast majority of waste, depending on the class of fall of toxicity for the disposal of the relevant grounds, which later become sources of revenue potentially hazardous chemicals in the environment: in soil, groundwater, surface water and incorporated into the food chain. These processes increase the probability of harmful effects of hazardous waste constituents of any nature: chemical, physico-chemical, biological, human health and the environment.*

*For optimization in the field of waste management in the sector of scientific and technical program "Modern living conditions and the preservation of health" on 2013-2015 at the National Research Center for Hygiene performed research on the development and implementation of criteria for toxicity and ecotoxicity of waste.*

*To achieve this goal the researchers work task is to find simple, inexpensive and objective test items to assess the toxicity of waste.*

*Research methods. For the study were obtained wiring pond snail *Lymnaea stagnalis* of individuals caught in natural waters. Besides the mass of animals can be marked differences in the*

*shape of shells of animals with a maximum term of life. By the end of the term culture can take into account various parameters of the shell. For the purposes of monitoring the shellfish that live in high mutagenic background, it is necessary to analyze the frequency of cells with micronuclei, as mitotic activity of poikilotherms low. Micronuclei in nature may be, as a whole chromosome, and part of it, and therefore vary in size. For example, you can select the cells with large and small micronuclei. Microkernel can be celebrated at different stages of the cell cycle at the interphase and mitosis. Microkernels can lead to cell death, and also eliminated from them, can cause and /or affect the cell division unequal.*

*The research results. For the purpose of optimizing the use of the test system, experiments were conducted to study the cytogenetic damage in the mantle fluid clams in approximate natural conditions. For this purpose, as a potentially hazardous waste samples were used: lead slag and sludge treatment facilities electroplating.*

*The studies to assess the impact of lead slag and sludge treatment facilities electroplating on the test-object L. Stagnalis allow to draw conclusions about the genotoxic effects in cells of the mantle fluid and shellfish waste toxicity to aquatic organisms.*

УДК 579.64:631.46

## **ЕКОЛОГО-ГІГІЄНІЧНА ОЦІНКА МІКРОБІОЛОГІЧНИХ ТА АГРОХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ВЕРМИКОПОСТУ ЯК ОРГАНІЧНОГО ДОБРИВА**

*Горова А.І., Скворцова Т.В., Лисицька С.М., Павличенко А.В.  
Кафедра екології «ДВНЗ» Національний гірничий університет*

**Актуальність проблеми.** Великома-  
сштабне м'ясо-молочне тваринництво і про-  
мислове птахівництво, створили проблему  
накопичення значної кількості відходів (ви-  
сокотоксичного гною і посліду). Тому пи-  
тання утилізації значної кількості небезпеч-  
них відходів органічного походження, не  
втратило актуальність. Утворені за багато  
років маси гною поблизу ферм великої рога-  
тої худоби, свиноферм й птахофабрик явля-  
ють собою складний конгломерат високомо-  
лекулярних хімічно й біологічно активних  
речовин (сечовини, протеїнів, вуглеводів,  
жирних кислот тощо). Але, із-за високого  
рівня токсичності, вони непридатні для без-  
посереднього використання як органічні до-  
брива і є джерелом забруднення природних  
екосистем.

Спалювання органічних відходів на  
звалищах також не є економічно і екологічно  
доцільним, практично будь-яка органічна  
маса може і має бути переробленою й повер-  
неною у докільця як корисний продукт [1].

**Аналіз основних джерел інформації.**  
Для переробки небезпечних відходів тварин-

ництва і птахівництва рядом авторів пропо-  
нуються їх біоконверсія метановим бродін-  
ням в біогазових установках й компостуван-  
ням в спеціалізованих господарствах [2].

Природний процес компостування,  
тобто перетворення свіжого гною великої  
рогатої худоби або курячого посліду на ор-  
ганічне добриво за участю багатьох видів і  
форм ґрунтових мікроорганізмів (бактерій,  
актиноміцетів, мікробіофлори, грибів-  
мікроміцетів, дощових черв'яків) є дуже три-  
валим і не завжди забезпечує необхідні ре-  
зультати [3]. Встановлено, що навіть через  
три роки, в природно трансформованій гній-  
ній масі знаходиться ще велика кількість ви-  
сокомолекулярних органічних сполук, недо-  
ступних для засвоєння кореневою системою  
рослин. У ній повністю зберігають життєзда-  
тність і схожість насіння бур'янів, гнізда де-  
яких небезпечних шкідників сільськогоспо-  
дарських культур (наприклад, капустиянки),  
що, у свою чергу, призводить до вторинного  
засмічення посівів бур'янами і шкідливими  
фітофагами. Крім того, процес традиційного  
компостування непридатний для утилізації