

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра биохимии и биофизики

**КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА ЭКОТОКСИЧНОСТИ ПОЛИФОСФАТА
АММОНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы

Направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Демышевой Алины Дмитриевны

Научный руководитель:

профессор кафедры биохимии и биофизики,

док. биол. наук, доцент:

Е.В. Плешакова

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,

док. биол. наук, профессор:

С.А. Коннова

Саратов 2026

Введение. Среди способов снижения горючести полимерных материалов наиболее распространённым и эффективным является применение антипиренов (АП). Антипирены используются повсеместно: в конструкциях и бытовых материалах, некоторые антипирены применяют в качестве удобрений и даже эмульгаторов и пищевых добавок в пищевой промышленности. Широкое использование огнестойких материалов даёт некоторые преимущества с точки зрения пожарной безопасности, однако аспекты охраны окружающей среды могут отсутствовать [1].

Антипирены рассматриваются как новые органические загрязнители, поскольку они повсеместно распространены в природе и имеют потенциальные экологические токсические эффекты. Например, полибромированные дифениловые эфиры рассматриваются как биоаккумулятивные, нейротоксиканты и потенциальные эндокринные разрушители [2].

В последние десятилетия галогенсодержащие антипирены стали постепенно заменять другими классами антипиренов – фосфор- и/или азотсодержащими соединениями. Но эти безгалогеновые добавки не лишены недостатков, связанных как с их физико-механическими характеристиками, так и с недостаточной изученностью токсического воздействия на различные организмы.

Полифосфат аммония (ПФА) – фосфорсодержащий антипирен, используемый при производстве термопластичных полимеров, мебели и тканей, в пищевых продуктах в качестве секвестрантов и эмульгаторов. Предельно допустимая концентрация (ПДК) ПФА в воде для хозяйственно-питьевого водопользования составляет 3,5 мг/л, класс опасности – 4 (малоопасные вещества) [3]. ПДК иона аммония в водных объектах рыбохозяйственного значения составляет 0,5 мг/л, фосфат-иона – 0,05, 0,15 и 0,2 в олиго-, мезо- и автотрофных водоемах соответственно [4].

Полифосфат аммония не обладает генотоксичностью и канцерогенностью, показана низкая кожная и ингаляционная токсичность [5]. Экоотоксичность полифосфата аммония мало изучена.

Актуальным остается всестороннее исследование токсичности ПФА как распространенного соединения, используемого в качестве антипирена, удобрения, пищевой добавки и эмульгатора, особенно его экотоксичности по отношению к водным и почвенным организмам.

Цель настоящего исследования состояла в оценке токсического действия водных растворов ПФА методом биотестирования с использованием комплекса тест-организмов.

В связи с поставленной целью в настоящей работе решались следующие задачи:

- 1) Произвести оценку экотоксичности полифосфата аммония с помощью метода, основанного на определении дегидрогеназной активности микробного штамма *Dietzia maris* AM3.
- 2) Определить токсичность проб воды, содержащих полифосфат аммония с использованием тест-объектов: одноклеточной зеленой водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer и ветвистоусых рачков *Daphnia magna* Straus.
- 3) Изучить влияние полифосфата аммония в различных концентрациях на параметры роста ряски малой (*Lemna minor* L.), ее морфометрические характеристики, общее состояние растений и содержание хлорофилла в листецах.
- 4) Изучить влияние водных проб, содержащих полифосфат аммония, на параметры роста редиса *Raphanus sativus* L. var. *sativus* (сорт «Розово-красный с белым кончиком») и его морфометрические характеристики.

Структура и объем работы. Магистерская работа включает содержание, список сокращений, введение, 3 главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), заключение, выводы и список использованных источников, включающий 53 источников на русском и английском языках. Работа изложена на 63 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 9 рисунками и 10 таблицами.

Основное содержание работы. В ходе работы исследовали химически чистые вещества: кристаллический ПФА (Торговый дом «Воткинский завод

теплоизоляционных материалов», Россия). Токсичность ПФА во всех экспериментах оценивали в водных растворах при концентрациях, равных: ПДК (3,5 мг/л); 5 ПДК (17,5 мг/л) и 10 ПДК (35,0 мг/л). Использовались следующие тест-организмы: *Dietzia maris* AM3, *Chlorella vulgaris* Beijer, *Daphnia magna* Straus, *Lemna minor* L., *Raphanus sativus* L. var. sativus.

Для определения токсичности антипиренов использовался метод, основанный на способности ферментов дегидрогеназ восстанавливать за счет дегидрирования бесцветный 2,3,5-трифенилтетразолийхлорид (2,3,5-ТТХ) до темно-красного 2,3,5-трифенилформазана (2,3,5-ТФФ). В качестве тест-организма использовался микробный штамм *D. maris* AM3.

Исследуемую смесь фотоколориметрировали при синем светофильтре ($\lambda = 440$ нм). Количество образованного бактериями 2,3,5-ТФФ рассчитывали по калибровочной кривой, выражая в мг/мл. Продолжительность эксперимента – 6 суток. Биотестирование проводилось в трехкратной повторности.

Культивирование маточной культуры микроводорослей *Chlorella vulgaris* Beijer осуществлялось 22 часа на жидкой 50 %-ной среде Тамия [6] в соответствии с методикой [7] до достижения экспоненциальной фазы. Продолжительность эксперимента – 22 часа. Все эксперименты проводились в четырех повторностях. Через 22 часа культивирования проводилось измерение оптической плотности суспензии водоросли из всех флаконов на спектрофотометре при длине волны 565,5 нм.

Методика для определения экотоксичности ПФА основана на определении смертности дафний (*D. magna* Straus) при воздействии токсических веществ, присутствующих в исследуемых растворах, по сравнению с контрольной культурой в среде, не содержащей токсических веществ. Количество живых и мертвых дафний определяется методом прямого счета. Продолжительность эксперимента – 72 часа.

Биотестирование с помощью тест-организма ряски малой проводили согласно методике, описанной в Приказе Федерального агентства по рыболовству от 4 августа 2009 г. № 695 [8]. Каждую концентрацию ПФА

исследовали в трехкратной повторности. Через 7 сут. проводили исследование суммарного содержания хлорофиллов а и b спектрофотометрически по величине поглощения спиртового экстракта при 665 нм [9].

Принцип методики [10] биотестирования токсичности растворов полифосфата аммония основан на оценке влияния водных растворов ПФА на интенсивность прорастания семян *Raphanus sativus* L. var. sativus (редис сорт «Розово-красный с белым кончиком»), показатели средней длины ростка и средней длины корня, мм. Проращивались 20 семян редиса розово-красного с белым кончиком на чашках Петри диаметром 10 см. В качестве контроля использовалась чистая вода. Через 3 суток инкубации определялась всхожесть семян в %, измерялась длина корней и ростков в мм. Повторность опыта и контроля – трехкратная.

Оценка дегидрогеназной активности тест-микроорганизма *D. maris* AM3 после воздействия водных растворов ПФА с разными концентрациями показала, что различия по сравнению с контролем составили 4,8 и 9,5 % (рисунок 1).

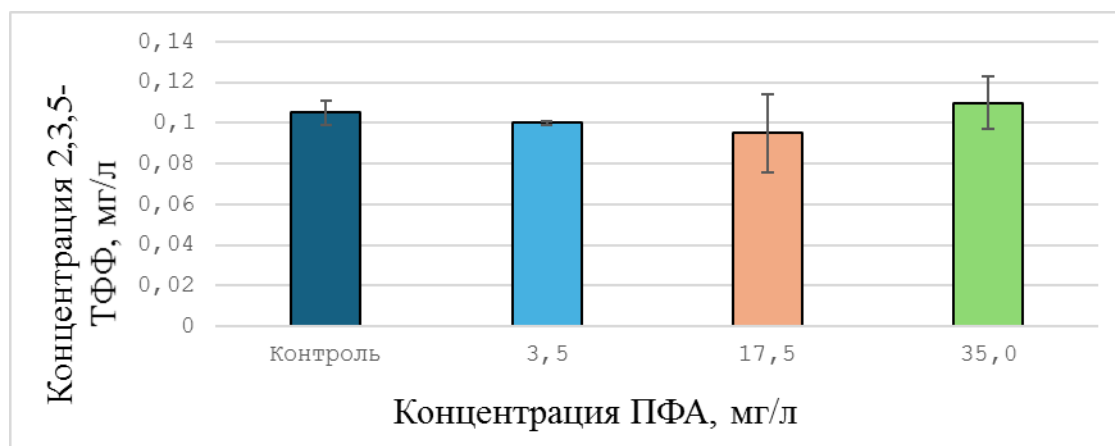
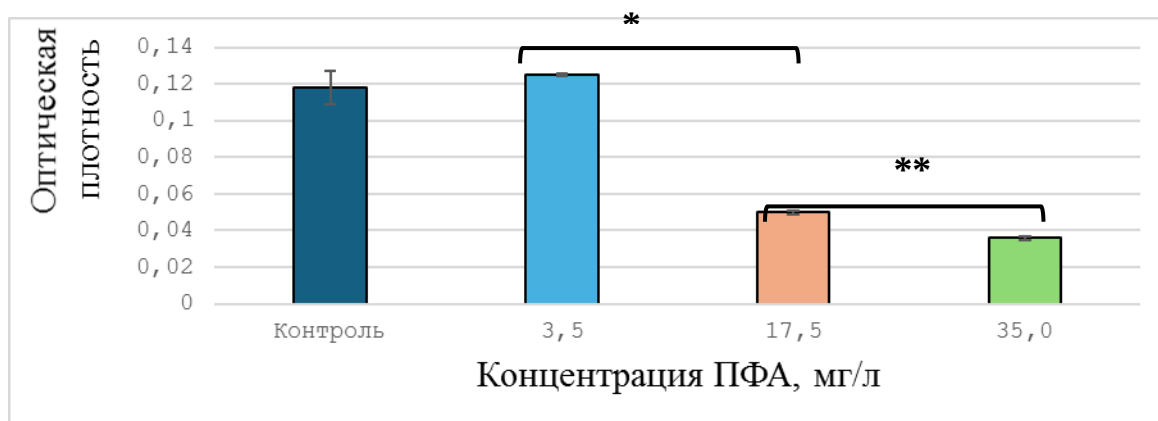


Рисунок 1 – Результаты определения экотоксичности водных растворов полифосфата аммония по дегидрогеназной активности *Dietzia maris* AM3

Раствор ПФА с концентрацией 3,5 мг/л стимулировал активность дегидрогеназ *D. maris* AM3 на 4,8 % по сравнению с контролем, с концентрациями 17,5 и 35 мг/л – снижал активность дегидрогеназ на 4,8 и 9,5 %

соответственно. Выявленные различия не превышали 10 %, поэтому растворы ПФА считали нетоксичными по отношению к данному почвенному микроорганизму.

ПФА в концентрации, равной 3,5 мг/л, не оказал токсического эффекта на тест-культуру водоросли; процентное отклонение от контроля составило 5,93 %. При концентрации 17,5 и 35 мг/л наблюдалось токсическое воздействие на *C. vulgaris* Beijer – угнетающее влияние (57,63 и 69,28 % соответственно) (рисунок 2). Исходя из результатов, можно сказать, что с увеличением



концентрации ПФА возрастает токсический эффект на опытный объект.

*, ** – значения, достоверно различающиеся между показателями, объединенными скобками

Рисунок 2 – Результаты определения экотоксичности водных растворов полифосфата аммония с помощью *C. vulgaris* Beijer

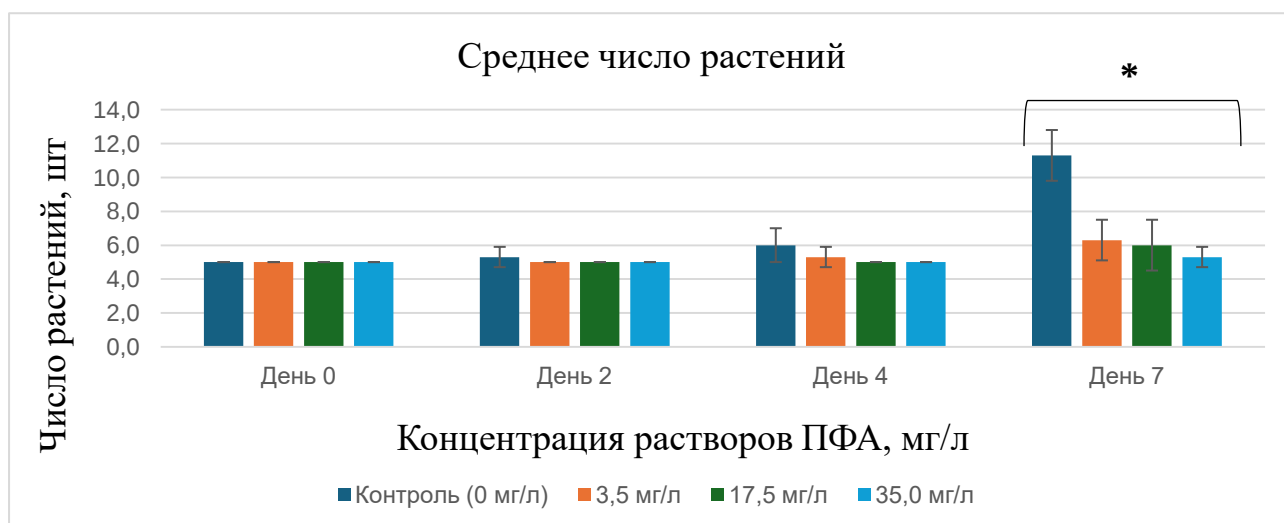
Не было выявлено острого токсического действия растворов с концентрациями ПФА 3,5 и 17,5 мг/л на *D. magna* Straus в 72-часовом эксперименте (таблица 1). В растворе с концентрацией ПФА 35 мг/л через 48 ч культивирования гибель дафний составила 25 %, через 72 ч – 53,3 %, что указывало на острое токсическое действие.

Результаты экспериментов показали, что число растений ряски малой через 2 и 4 сут. культивирования во всех исследованных водных растворах с ПФА и в контрольном водном растворе достоверно не отличалось (таблица 2). Однако через 7 сут. в опытных вариантах число растений было значительно

ниже, чем в контроле: в 1,8; 1,9 и 2,1 раза в растворах с ПФА с концентрацией, равной 3,5 мг/л, 17,5 мг/л и 35,0 мг/л соответственно (рисунок 3).

Таблица 1 – Влияние водных растворов полифосфата аммония на выживаемость *D. magna* Straus

№ пробы	Концентрация ПФА, мг/л	Выживаемость тест-организма (живые особи/общее количество)			Смертность, %		
		24 ч	48 ч	72 ч	24 ч	48 ч	72 ч
1 (контроль)	0	24 ч	48 ч	72 ч	24 ч	48 ч	72 ч
2	3,5	4/4	4/4	4/4	0±0,0	0±0,0	0±0,0
3	17,5	4/4	4/4	4/4	0±0,0	0±0,0	0±0,0
4	35,0	4/4	3/4	2/4	0±0,0	25±0,0	53,3±5,8



* – значения, достоверно различающиеся между показателями, объединены скобками

Рисунок 3 – Среднее число растений *Lemna minor* L. при воздействии ПФА

Средняя длина корней ряски малой достоверно не отличалась во всех концентрациях ПФА от водных контрольных проб через 2, 4 и 7 сут. культивирования. Наблюдалось уменьшение средней длины корней с каждым днем культивирования во всех вариантах. На второй и четвертый день

биотестирования результаты эксперимента между опытными растворами (3,5 мг/л, 17,5 мг/л и 35,0 мг/л) и контрольным не отличались. На седьмой день биотестирования средняя длина корней в опытном водном растворе, содержащем 35,0 мг/л ПФА, была меньше на 4,2 см (на 38,2 %), по сравнению с контрольным раствором. Из таблицы 2 видно, что при 17,5 мг/л через 7 сут. этот показатель ниже показателя в контроле в 1,57 раза (рисунок 4). Данные результаты нельзя считать достоверными, так как уровень значимости превышает 0,05.

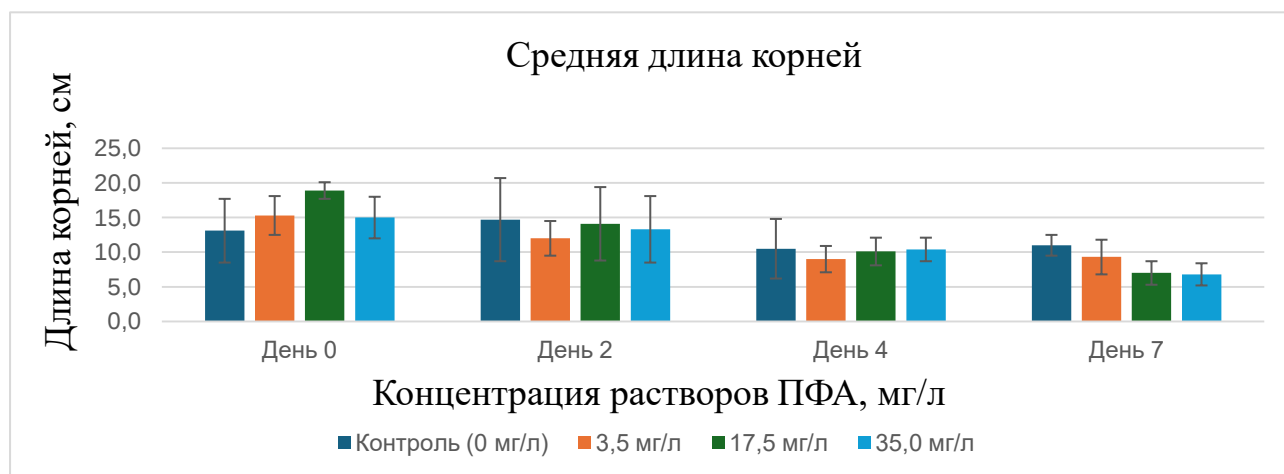
Таблица 2 – Показатели биотестирования водных растворов ПФА с помощью *Lemna minor* L.

Показатель	Экспозиция, сут.	Концентрация ПФА, мг/л			
		Контроль	3,5	17,5	35,0
Среднее число растений (колоний), шт.	0	5,0±0,0	5,0±0,0	5,0±0,0	5,0±0,0
	2	5,3±0,6	5,0±0,0	5,0±0,0	5,0±0,0
	4	6,0±1,0	5,3±0,6	5,0±0,0	5,0±0,0
	7	11,3±1,5	6,3±1,2*	6,0±1,5*	5,3±0,6*
Средняя длина корней, см	0	13,1±4,6	15,3±2,8	18,9±1,2	15,0±3,0
	2	14,7±6,0	12,0±2,5	14,1±5,3	13,3±4,8
	4	10,5±4,3	9,0±1,9	10,1±2,0	10,4±1,7
	7	11,0±1,5	9,3±2,5	7,0±1,7	6,8±1,6
Среднее число листецов, шт.	0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0	3,0±0,0
	2	3,3±0,9	3,5±0,1	3,9±0,3	3,5±0,2
	4	4,6±2,0	4,7±0,4	5,5±0,6	5,3±0,2
	7	3,1±0,8	6,1±0,9*	6,6±1,1*	6,1±0,9*
Средний размер листецов, см	0	2,2±0,1	2,7±0,3	3,1±0,3	2,4±0,1
	2	2,8±0,2	3,5±0,2*	3,8±0,2*	3,3±0,3
	4	2,5±0,5	3,7±0,2	3,4±0,3	3,3±0,1
	7	2,8±0,4	2,8±0,2	2,9±0,0	2,5±0,2

* отличия достоверны для $p < 0,05$

Через 2 сут. культивирования средний размер листецов достоверно превышал (в 1,3 и 1,4 раза) значение в контроле в вариантах с концентрацией

ПФА 3,5 и 17,5 мг/л. Можно отметить тенденцию: средний размер листецов в вариантах с ПФА через 2-4 сут. был выше, чем в контроле, а к 7 сут. размеры



листецов уменьшались (рисунок 5).

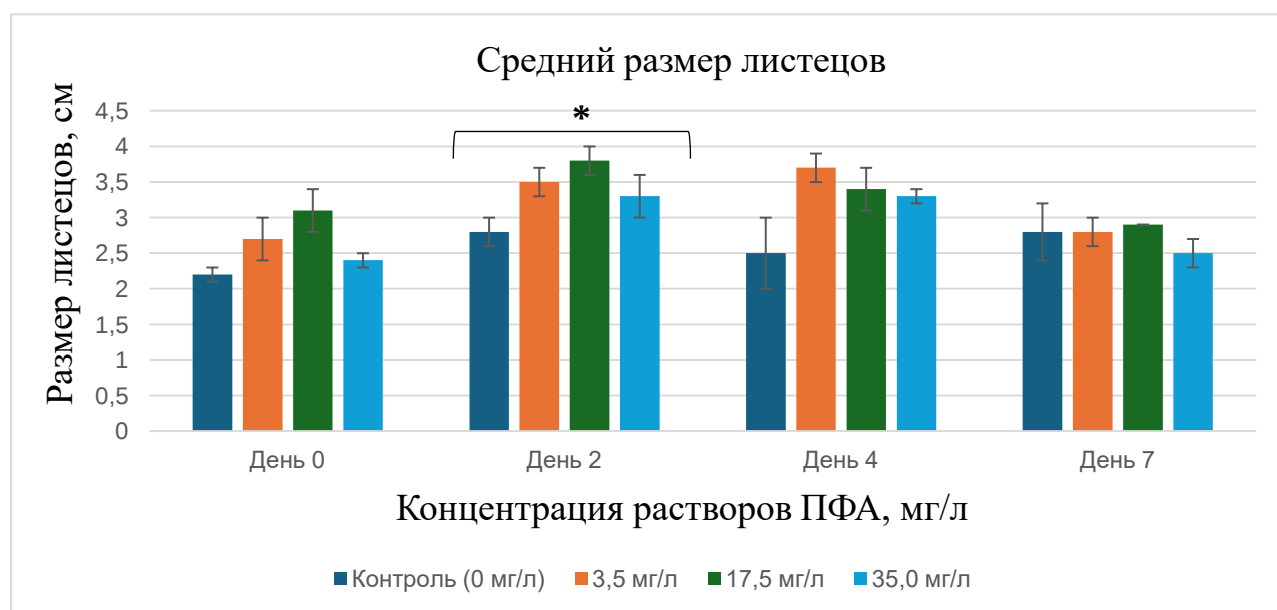
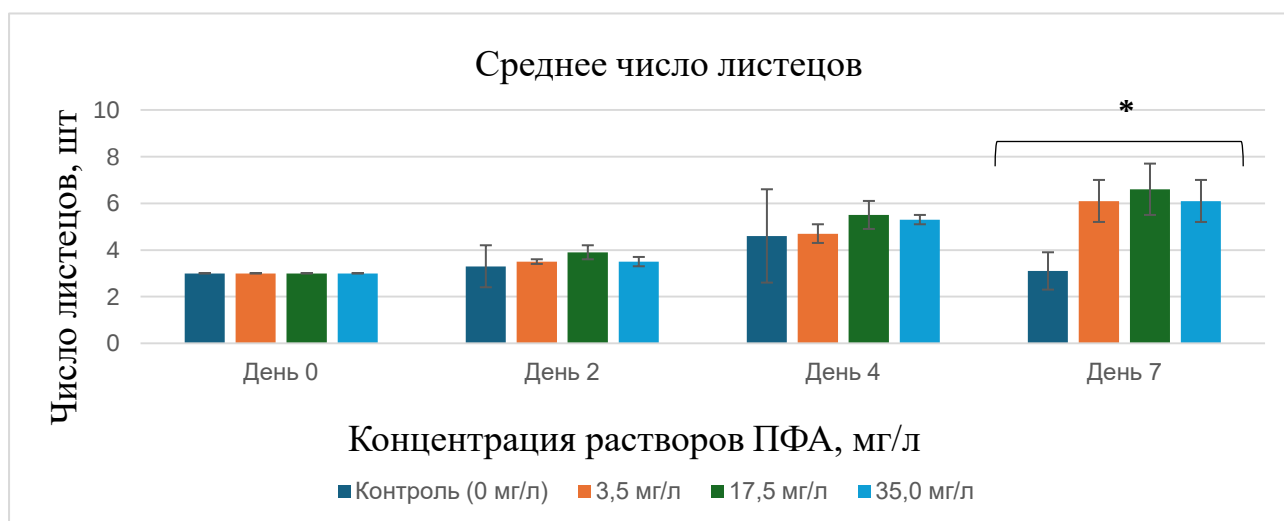


Рисунок 4 – Средняя длина корней растений *Lemna minor* L. при воздействии ПФА

* – значения, достоверно различающиеся между показателями, объединены скобками

Рисунок 5 – Средний размер листецов *Lemna minor* L. при воздействии ПФА

В концентрации 3,5 мг/л, 17,5 мг/л и 35,0 мг/л ПФА увеличивал количество листочков на седьмой день по сравнению с контролем на 96,8, 112,9 и 96,8 % соответственно (рисунок 6).



* – значения, достоверно различающиеся между показателями, объединены скобками

Рисунок 6 – Среднее число листочков *Lemna minor* L. при воздействии ПФА

Полифосфат аммония в концентрациях 17,5 мг/л и 35 мг/л вызывает статистически достоверное снижение содержания хлорофилла в листочках ряски малой (*Lemna minor* L.) на 39,1 и 64,5 % соответственно по сравнению с контролем. Наименьшая исследованная концентрация (3,5 мг/л) также приводит к снижению хлорофилла (на 43,5 %), однако различия с контролем статистически недостоверны (таблица 3).

Таблица 3 – Влияние полифосфата аммония на суммарное содержание хлорофиллов а и b в листочках ряски малой

Концентрация	Масса листочков тест-объекта, г	Значение оптической плотности	Содержание хлорофилла, мг/г	Отклонение от контроля, %
Контроль	0,0014	0,11	65,75±10,9	-
3,5 мг/л	0,0020	0,09	37,16±4,39	43,5
17,5 мг/л	0,0024	0,012	40,01±6,88*	39,1
35,0 мг/л	0,0044	0,012	23,35±3,23*	64,5

* отличия достоверны для $p < 0,05$

В ходе эксперимента не было выявлено токсического воздействия растворов ПФА с 3,5, 17,5 и 35 мг/л на редис посевной. Всхожесть семян *Raphanus sativus* L. var. sativus при воздействии водного раствора ПФА в максимальной концентрации была ниже всхожести семян в контрольной почве, но различия не были существенными. Показатели средней длины корня и средней длины ростка проростков редиса при воздействии водных растворов ПФА во всех исследованных концентрациях достоверно не отличались от показателей в контрольной чистой почве

Заключение. Отсутствие токсического воздействия водных растворов ПФА в тестируемых концентрациях на почвенный микроорганизм *D. maris* AM3 согласуется с результатами исследований R. Mitkus с соавт., которые не обнаружили цитотоксическое действие моноаминофосфата и диаминофосфата аммония на микробные штаммы *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 и *Escherichia coli* WP2 uvrA.

Представители низших ракообразных являются по характеру питания фильтраторами, что делает их чувствительными ко многим загрязняющим веществам, находящимся в водной среде. Концентрация ПФА 35 мг/л вызывала гибель 53,3 % рачков через 72 ч, что свидетельствует о проявлении токсического эффекта.

Наблюдаемое снижение роста тест-организма *C. vulgaris* Beijer при культивировании в присутствии повышенных доз ПФА, вероятно, связано с заметным содержанием в нем азота (14-15 %) и фосфора (31-32 %). Как макроэлемент фосфор необходим для фотосинтеза и роста водорослей, но высокие концентрации фосфора могут привести к прямой физиологической токсичности, сходной, предположительно, с воздействием на высшие растения, приводящим к некрозу и обесцвечиванию листьев, снижению скорости роста и гибели растений. Азот в высоких концентрациях также может быть токсичным и вызывать задержку роста водорослей.

Результаты воздействия водных растворов ПФА на тест-объект ряска малая были заметны через 7 сут. Среднее число растений было снижено при

всех тестируемых концентрациях ПФА. При этом наблюдалось увеличение числа листецов. Результаты биотестирования с использованием *L. minor* L. были сходны с результатами биотестирования с помощью *C. vulgaris* Beijer и с упомянутыми механизмами фитотоксичности избыточной дозы фосфора и азота для растений и водорослей. В отличие от наземных растений, водные растения могут напрямую поглощать NH_4^+ через листья, поэтому погруженные растения могут быть более восприимчивы к избыточной дозе NH_4^+ в воде. Сообщалось, что NH_4^+ в концентрации 10 мг/л или выше снижает содержание хлорофилла и влияет на фотосинтетическую способность.

Редис часто используется в биотестировании благодаря быстрой всхожести, чувствительности к загрязнителям и четкой визуальной индикации стресса. Повышенные концентрации аммония и фосфора могут оказывать как стимулирующее, так и угнетающее действие в зависимости от дозы. В настоящих исследованиях концентрация ПФА была недостаточно велика, чтобы нанести токсикологический вред по отношению к редису посевному (*Raphanus sativus*).

Выводы. 1. Установлены видовые различия по воздействию водных растворов ПФА на тест-организмы: микроорганизм *Dietzia maris* AM3, ветвистоусые рачки *Daphnia magna* Straus, одноклеточная зеленая водоросль *Chlorella vulgaris* Beijer, водное растение ряска малая *Lemna minor* L., высшее наземное растение редис посевной *Raphanus sativus* L. var. *Sativus*, показаны дозозависимые эффекты.

2. Выявлено, что водный раствор с концентрацией ПФА 3,5 мг/л не оказал воздействия на развитие *Chlorella vulgaris* Beijer, на жизнеспособность *Daphnia magna* Straus. При концентрации 17,5 мг/л ПФА не оказывал острого токсического действия на жизнеспособность *D. magna* Straus, но ингибировал рост клеток *C. vulgaris* Beijer на 57,6 %. При концентрации 35 мг/л ПФА гибель *D. magna* Straus составила 53,3 % через 72 ч, наблюдалось ингибирование роста клеток *C. vulgaris* Beijer на 69,3 %.

3. Максимальная реакция на воздействие водных растворов, содержащих ПФА в тестируемых концентрациях, была зафиксирована у ряски малой через 7 сут. экспозиции. Было снижено в 2 раза число растений, число листочков при этом было в 2 раза повышено. Суммарное содержание хлорофиллов а и б в листочках ряски при воздействии растворов ПФА в концентрациях 17,5 и 35 мг/л было достоверно ниже на 39,1 и 64,5 % по сравнению с контрольными растениями.

4. Показано, что максимальную устойчивость к воздействию водных растворов ПФА проявил почвенный тест-микроорганизм *D. maris* AM3 и высшее наземное растение редис посевной *Raphanus sativus* L. var. *sativus* сорта «Розово-красный с белым кончиком», токсического воздействия на которые не обнаружено при всех исследованных концентрациях ПФА.

Список использованных источников

- 1 Speight, J. G. Environmental organic chemistry for engineers/ J. G. Speight. – U.K.: Butterworth-Heinemann, 2017. – 538 p.
- 2 Emerging contaminants in the terrestrial-aquatic-atmosphere continuum: occurrence, health risks and mitigation / W. Gwenzi [et al.]. – Elsevier, 2022. – 434 p.
- 3 СанПиН 1.2.3685-21 «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания», 2021.
- 4 Приказ Минсельхоза России от 13.12.2016 N 552 (ред. от 13.06.2024) «Об утверждении нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения». Зарегистрировано в Минюсте России 13.01.2017 N 45203.
- 5 Toxicological risks of selected flame-retardant chemicals / ProQuest (Firm). – Washington: National Academy Press, 2000. – 534 p.

- 6 ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04 (Т 16.1:2:2.3:3.7-04). Токсикологические методы контроля. Методика измерений оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления. – М.: Стандартинформ, 2014. – 38 с.
- 7 Методы испытания химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Определение острой токсичности для дафний. – М.: Стандартинформ, 2020. – 13 с.
- 8 Dorta, D. J. The toxicity of environmental pollutants / D. J. Dorta, D. P. De Oliveira. – IntechOpen, 2022. – 302 p.
- 9 Safety Data Sheet. Ammonium polyphosphate solution. Nutrien feeding the future, 2018.
- 10 ГОСТ Р ИСО 18763-2019. Определение токсического воздействия загрязняющих веществ на всхожесть и рост на ранних стадиях высших растений. – М.: Стандартинформ, 2019. – 27 с.