

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭКОТОКСИЧНОСТИ ПОЛИФОСФАТА
АММОНИЯ И ДЕКАБРОМДИФЕНИЛОКСИДА

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 424 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

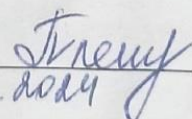
Биологического факультета

Демышевой Алины Дмитриевны

Научный руководитель:

профессор кафедры биохимии и биофизики,

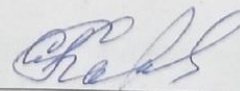
док. биол. наук, доцент:


21.06.2024

Е.В. Плешакова

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,

док. биол. наук, профессор:


24.06.2024

С.А. Коннова

Саратов 2024

Введение. Антипирены используются 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. В начале срока службы такие изоляционные материалы устойчивы к влиянию внешних факторов, но длительное воздействие вынуждает их разлагаться по мере того, как влияние окружающей среды возрастает. Многие антипирены являются персистентными и биоаккумулятивными, а также способными к биомагнификации. Продукты сгорания и биодеструкции антипиренов могут оказываться экотоксичными. Основной проблемой антипиренов является недостаточная изученность их вредных свойств, что может привести к негативным последствиям.

Комплексная оценка экотоксичности антипиренов является одной из приоритетных задач в современной природоохранной и медицинской сфере, решение которой необходимо для обеспечения устойчивого функционирования экосистем и поддержание жизни людей на оптимальном уровне.

Цель настоящего исследования состояла в сравнительной оценке экотоксичности безгалогенового антипирена полифосфата аммония и бромированного антипирена декабромдифенилоксида с помощью тест-организмов – представителей разных систематических групп.

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

1. Произвести оценку экотоксичности полифосфата аммония и декабромдифенилоксида с помощью метода, основанного на определении дегидрогеназной активности микробного штамма *Dietzia maris* AM3.

2. Определить токсичность проб воды, содержащих полифосфат аммония, декабромдифенилоксид и продукты его абиотической деструкции 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.

В ходе работы исследовали химически чистые вещества: кристаллический ПФА (Торговый дом «Воткинский завод теплоизоляционных материалов», Россия) и кристаллический порошок ДБДФО (Shandong Haiwang Chem Co.Ltd, Китай). Токсичность ПФА во всех экспериментах оценивали в водных растворах при концентрациях, равных: ПДК (4 мг/л); 5 ПДК (20 мг/л) и 10 ПДК (40 мг/л).

Токсичность ДБДФО с помощью тест-микроорганизма оценивали в концентрациях, аналогичных концентрациям при анализе токсичности ПФА. Учитывая, что ДБДФО обладает крайне малой растворимостью в воде (<0,1 мг/л), этот антипирен был предварительно растворен в ацетоне (растворимость составляет 50 мг/л), а затем были приготовлены водные растворы в соответствующих концентрациях. При оценке острой токсичности ДБДФО на *Daphnia magna* Straus использовались растворы, приготовленные методом замачивания с последующим удалением нерастворенной части путем фильтрации.

Использовались следующие тест-организмы: *Dietzia maris* AM3, *Chlorella vulgaris* Beijer, *Daphnia magna* Straus, *Lemna minor* L.

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-трифенилформаза (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* Вејер осуществлялось 22 часа на жидкой 50 %-ной среде Тамия [1] в соответствии с методикой [2] 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 и ДБДФО 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 [3]. Каждую концентрацию ПФА исследовали в трехкратной повторности. Через 7 сут. проводили исследование суммарного содержания хлорофиллов *a* и *b* спектрофотометрически по величине поглощения спиртового экстракта при 665 нм [4].

Бакалаврская 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 48 источников на русском и английском языках. Работа изложена на 72 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 7 рисунками и 16 таблицами.

Основное содержание работы. Было установлено, что по сравнению с контролем полифосфат аммония в концентрации, равной ПДК, незначительно стимулировал активность дегидрогеназ *D. maris* АМЗ, которая была выше на

4,8 % по сравнению с контролем. Различия в 4,8 % можно считать не достоверными. При концентрациях ПФА 5 и 10ПДК активность дегидрогеназ была незначительно ниже значений в контроле (4,8 и 9,5 % соответственно), что позволяет не принимать эти различия во внимание и считать полифосфат аммония в исследованных концентрациях не токсичным (рисунок 1).

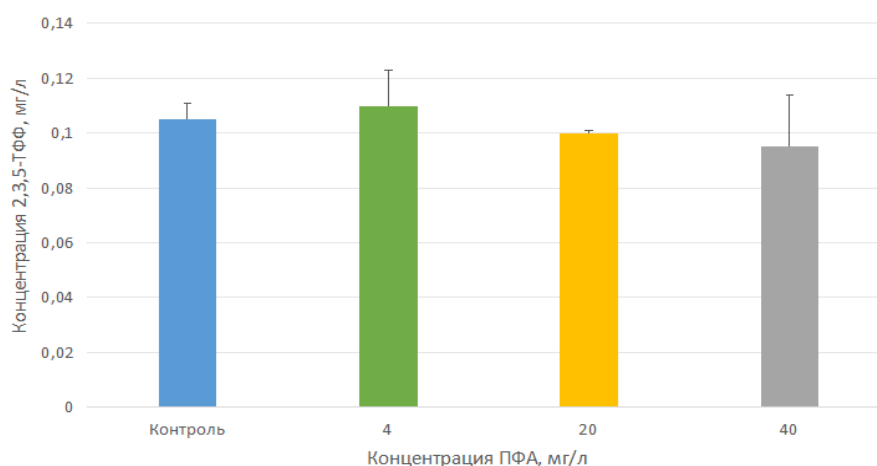
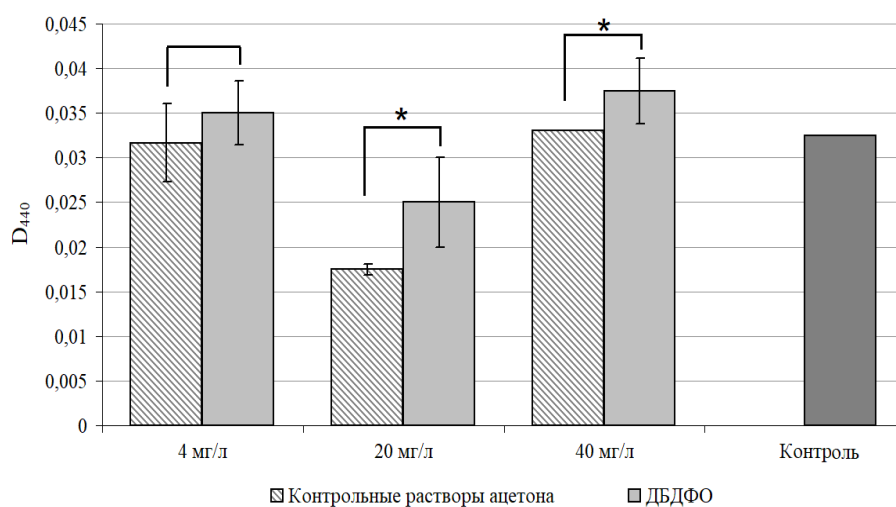


Рисунок 1 – Результаты определения экотоксичности полифосфата аммония по дегидрогеназной активности *Dietzia maris* АМЗ

ДБДФО в концентрации ПДК (4 мг/л) стимулировал активность дегидрогеназ на 10,5 % по сравнению с контролем, содержащем ацетон (рисунок 2). ДБДФО в концентрации 5ПДК (20 мг/л) подавлял активность дегидрогеназ на 42,9 %. ДБДФО в концентрации 10ПДК (40 мг/л) стимулировал активность дегидрогеназ на 13,6 % по сравнению с абиотическим контролем. Сравнивая полученные данные по ДБДФО с контролем, содержащим ацетон, следует отметить, что при концентрации ДБДФО, равным 1 и 5ПДК, наблюдалось увеличение экотоксичности от слабого (в диапазоне от 10 до 30 %) до среднего уровня (в диапазоне от 30 до 50 %). ДБДФО в концентрации 5ПДК проявлял слабые токсические свойства.

ПФА в концентрации, равной 4 мг/л, не оказал токсического эффекта на тест-культуру водоросли; процентное отклонение от контроля составило 5,93 %. При концентрации 20 и 40 мг/л наблюдалось токсическое воздействие на *C. vulgaris* Beijer - угнетающее влияние (57,63 и 69,28 % соответственно).

Исходя из результатов, можно сказать, что с увеличением концентрации ПФА возрастает токсический эффект на опытный объект (рисунок 3).



* – значения, достоверно различающиеся между показателями, объединенными скобками

Рисунок 2 – Значения оптической плотности экстрактов 2,3,5-ТФФ, образованного дегидрогеназами *D. maris* AM3 при оценке токсичности декабромдифенилоксида в разных концентрациях

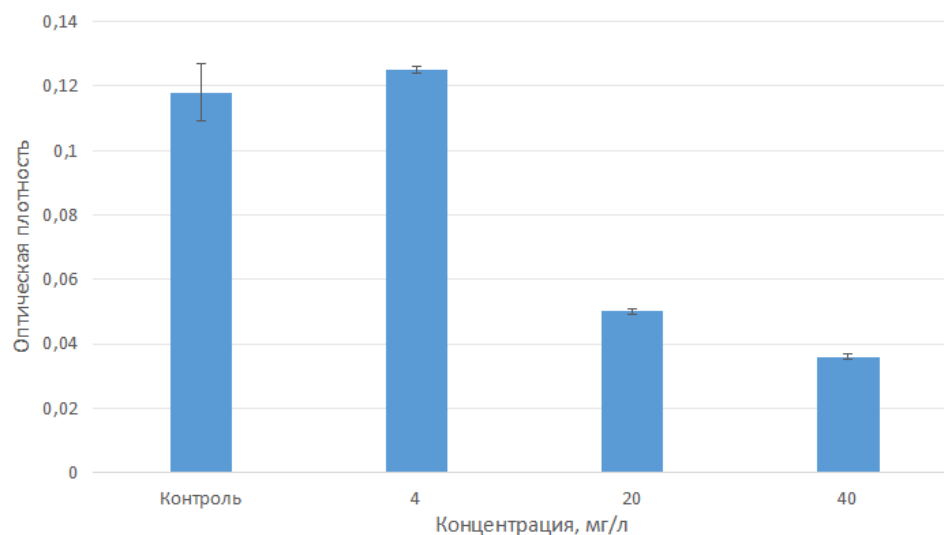
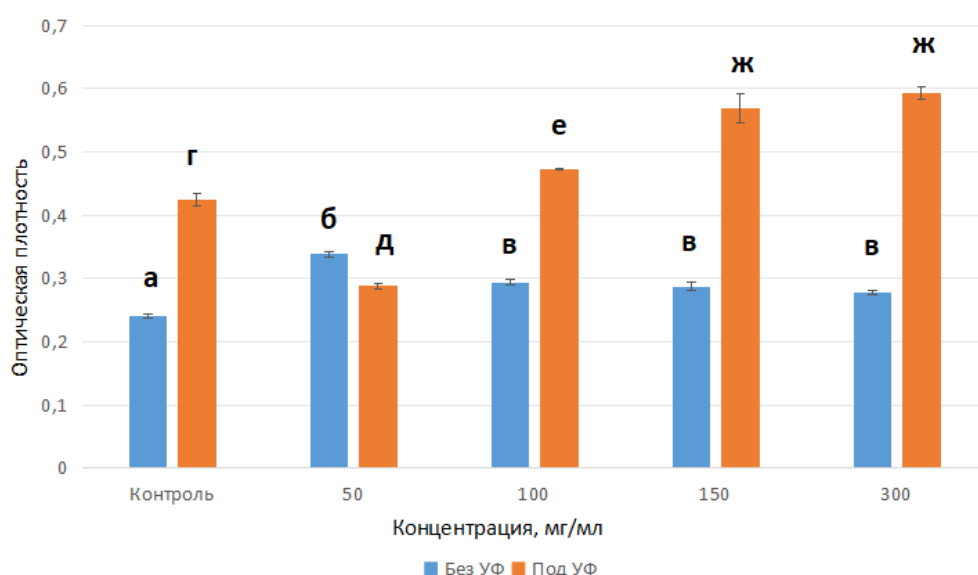


Рисунок 3 – Результаты определения экотоксичности полифосфата аммония с помощью *C. vulgaris* Beijer

Для исследования токсичности продуктов фотодегградации ДБДФО их подвергали облучению УФ в течение суток. В концентрации ДБДФО, равной 50 мг/мл, без воздействия УФ наблюдается стимулирующее действие (40,04 %) по отношению к одноклеточной зеленой водоросли *C. vulgaris* Beijer, под действием УФ, напротив, угнетающее (32,19 %). В концентрации 100 (21,85 %) и 150 мг/мл (19,23 %) без воздействия УФ стимулирующее действие гораздо ниже, чем при концентрации 50 мг/мл, в концентрации 300 мг/мл стимулирующее действие самое низкое (15,30 %); явно выражен спад токсического действия с увеличением концентрации ДБДФО. Под действием УФ наблюдается рост стимулирующего воздействия в концентрациях 100, 150 и 300 мг/мл (11,44 %, 34,20 % и 39,86 % соответственно) (рисунок 4).

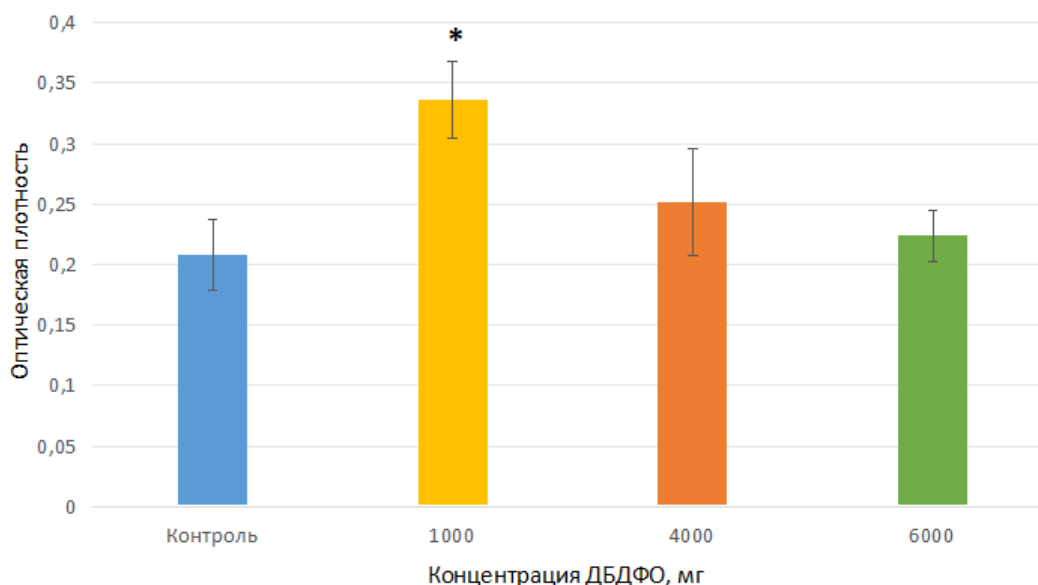


а, б, в, г, д, е, ж – средние значения, достоверно различающиеся между собой

Рисунок 4 – Результаты определения экотоксичности декабромдифенилоксида с помощью *C. vulgaris* Beijer

При исследовании продуктов термической деструкции ДБДФО было обнаружено, что водные пробы, содержащие антипирен в концентрации 1000 мг, оказывают сильный стимулирующий эффект на культуру микроводоросли *C. vulgaris* Beijer (рисунок 5).

Результаты эксперимента с использованием в качестве тест-организма ветвистоусых рачков *Daphnia magna* Straus показали, что они оказались устойчивы к воздействию водных растворов, в которых был замочен ДБДФО в относительной массе от 50 до 300 мг/мл, и не проявили видимых признаков токсического поражения при воздействии исследованных дозовых нагрузок.



* – значение, достоверно отличающееся от контроля

Рисунок 5 – Рост *C. vulgaris* Вејјер в водных пробах, содержащих продукты термической деструкции ДБДФО

По отношению к ПФА ветвистоусые рачки *D. magna* Straus оказались устойчивы только при концентрации опытного раствора, равной ПДК и 5 ПДК. Смертность, равная 25 %, наблюдалась при концентрации раствора ПФА, равной 10ПДК, через 48 часов, а смертность, равная 50 %, наблюдалась при концентрации раствора ПФА, равной 10ПДК, через 72 часа.

Результаты экспериментов на ряске малой показали, что через 7 сут. культивирования наблюдалось увеличение количества корней и листочков при всех исследованных концентрациях ПФА (таблица 1).

При этом, напротив, средняя длина корней была снижена при воздействии 5 и 10 ПДК ПФА через 7 сут. экспозиции. Отмечалось подавление отделения дочерних растений, что подтверждается меньшим количеством растений в

опытных растворах по сравнению с контрольным на 7 сут. биотестирования. Негативный токсический эффект ПФА оказал на содержащийся в листецах ряски малой хлорофилл.

Таблица 1 – Сравнение воздействия ПФА на показатели тест-объекта ряски малая через 7 сут. культивирования

Варианты	Число растений	Показатели корней		Показатели листецов		Содержание хлорофилла
		Среднее число корней	Средняя длина корней	Среднее число листецов	Средний размер листецов	
ПДК	↓	↑	≈контр.	↑	≈контр.	↓
5ПДК	↓	↑	↓	↑	≈контр.	↓
10ПДК	↓	↑	↓	↑	≈контр.	↓

Примечания

- 1 ↑ - повышение показателя относительно контроля
- 2 ↓ - снижение показателя относительно контроля

Заключение. Токсичность ПФА для растений может быть связана с повышенным содержанием азота и фосфора. Есть данные о том, что полифосфаты могут влиять на функционирование и рост корней, стимулировать рост растений при умеренном уровне. Кроме того, все фосфорные удобрения значительно повышают содержание питательных веществ в побегах (N, P, K) по сравнению с неудобренными растениями [5].

В более высоких концентрациях азот может быть токсичным и вызывать задержку роста [6]. Одним из признаков токсического поражения аммонием является угнетение фотосинтеза [7]. Как макроэлемент фосфор необходим для роста и поддержания водорослей, но высокие концентрации фосфора могут привести к прямой физиологической токсичности. Избыток фосфора внутри клетки наземных растений может вызвать дефицит Fe, K или Zn, что приводит к некрозу и обесцвечиванию листьев, снижению скорости роста и гибели растений [8].

Известно, что низкие концентрации фосфора стимулируют воспроизводство, но концентрация выше 0,001 % летальна для молодежи рачков [9]. *Daphnia magna* среди других видов наиболее резистентна по отношению к уровню фосфора и может выдержать концентрацию 0,005-0,007 %. На дафнию не оказывает влияние азот, который способствует развитию водорослей.

ДБДФО в концентрации ПДК стимулировал активность дегидрогеназ (слабый токсический эффект). Это может быть связано с участием этих ферментов в процессе деградации антипирена и в системах защиты от окислительного стресса, индуцированного ДБДФО, а также с эффектом гормезиса. ДБДФО в концентрации 5 и 10 ПДК подавлял активность дегидрогеназ (средняя и слабая экотоксичность соответственно).

Под воздействием УФ и при сгорании ДБДФО может подвергаться деградации с образованием дебромированных продуктов превращения или продуктов с меньшим содержанием брома. Продукты с меньшим содержанием брома могут оказаться более токсичными.

Высокое содержание брома, который содержится в ДБДФО, является токсичным для растений. Биоаккумуляция брома приводит к подавлению биомассы растений и концентрации ряда необходимых питательных веществ (K, Na, Ca, Mg, Zn и Cl). Часто концентрации Br в растениях оказываются ниже оптимального уровня (50 мг/кг) [10], чем может объясняться резкая стимуляция роста *C. vulgaris* Beijer после внесения ДБДФО.

Полученные результаты биотестирования антипиренов ПФА и ДБДФО являются важной частью комплексного экологического мониторинга, основой для последующей оценки и динамического наблюдения за экологическим состоянием экосистемы и здоровья человека.

Выводы. 1. Показатель активность дегидрогеназ тест-микроорганизма *Dietzia maris* AM3 при воздействии полифосфата аммония в исследованных концентрациях (4, 20 и 40 мг/л) достоверно не отличался от контроля, свидетельствуя об отсутствии токсического эффекта. При воздействии водных растворов с 4, 20 и 40 мг/л ДБДФО разница в активности дегидрогеназ по

сравнению с контролем составила 10,5, 42,9 и 13,6 %, что указывало на слабую и среднюю степень токсичности.

2. Показано отсутствие токсического эффекта на рост *Chlorella vulgaris* Beijer при воздействии водного раствора полифосфата аммония в концентрации 4 мг/л и дозозависимое ингибирование роста при воздействии 20 и 40 мг/л данного антипирена (на 57,6 и 69,3 %).

3. Установлена стимуляция роста *Chlorella vulgaris* Beijer при воздействии водных проб с относительной массой ДБДФО 50, 100, 150 и 300 мг/мл – на 40,2, 22,0, 19,1 и 15,3 %. Стимуляция роста *C. vulgaris* Beijer обнаружена в пробах воды, содержащих продукты фотодеструкции ДБДФО с дозой нагрузкой 100, 150 и 300 мг/мл, на 11,6, 34,2 и 39,9 % и в пробах, содержащих продукты термодеструкции 1000 мг ДБДФО – на 54,1 %.

4. Водные растворы полифосфата аммония в концентрациях, равных 1 и 5 ПДК, не вызывали гибели рачков *Daphnia magna* Straus в течение 72 ч, в концентрации, равной 10 ПДК, гибель дафний составила 25 % через 48 ч и 50 % через 72 ч, указывая на острую токсичность. Водные пробы с относительной массой ДБДФО от 50 до 300 мг/мл, и пробы, содержащие продукты его фото- и термодеструкции, не влияли на показатель выживаемости дафний при определении острой токсичности.

5. Обнаружено увеличение количества корней и листочков *Lemna minor* L. через 7 сут. культивирования в воде, содержащей 4, 20 и 40 мг/л полифосфата аммония, но ингибирование отделения дочерних растений и содержания хлорофилла в листочках, которое было ниже, чем в контроле, на 54, 36 и 32 % соответственно, а также снижение средней длины корней при воздействии 5 и 10ПДК данного антипирена.

Список использованных источников

- 1 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.

- 2 Методы испытания химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Определение острой токсичности для дафний. – М.: Стандартинформ, 2020. – 1 с.
- 3 Об утверждении Методических указаний по разработке нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения (с изменениями на 22 декабря 2016 года). – М.: ИС «Техэксперт: 6 поколение» Интранет, 2009. – 91 с.
- 4 Методика спектрофотометрического определения хлорофилла а. – М.: ИПК издательство стандартов, 1991. – 804 с.
- 5 Polyphosphate application influences morpho-physiological root traits involved in P acquisition and durum wheat growth performance / S. Khourchi [et al.] // BMC Plant Biology. – 2022. – V. 22. – P. 5-6.
- 6 Salbitani, G. Ammonium utilization in microalgae: A sustainable method for wastewater treatment / G. Salbitani, S. Carfagna // Sustainability. – 2021. – V. 13. – Article number: 956.
- 7 Effects of the ammonium stress on photosynthesis and ammonium assimilation in submerged leaves of *Ottelia cordata* - an endangered aquatic plant / L. Chen [et al.] // Aquatic toxicology. – 2023. – V. 261. – Article number: 106609.
- 8 Beck, W. S. Confounding factors in algal phosphorus limitation experiments / W. S. Beck, E. K. Hall // PLoS One. – 2018. – V. 13, № 10. – Article number: e0205684.
- 9 Разведение дафнии [Электронный ресурс]. – <https://aquavitro.org/razvedenie-dafnii/> (дата обращения: 16.04.2024).
- 10 Phytoextraction of bromine from contaminated soil / I. Shtangeeva [et al.] // Journal of Geochemical Exploration. – 2017. – V. 174. – P. 22-23.

