

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

Кафедра биохимии и биофизики

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКОТОКСИЧНОСТИ БРОМИРОВАННЫХ И  
БЕЗГАЛОГЕНОВЫХ АНТИПИРЕНОВ**

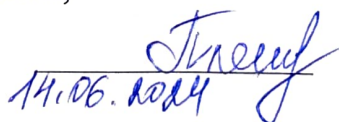
АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 421 группы  
направления 06.03.01 Биология  
Биологического факультета  
Савенковой Марии Сергеевны

Научный руководитель:

профессор кафедры биохимии и биофизики,

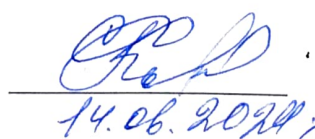
док. биол. наук, доцент:

  
14.06.2024

Е.В. Плешакова

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,

док. биол. наук, профессор:

  
14.06.2024

С.А. Коннова

Саратов 2024

**Введение.** Среди способов снижения горючести полимерных материалов, дерева наиболее распространённым и эффективным является применение антипиренов. Однако существует ряд экологических проблем, связанных с их использованием: их стойкость (персистентность), биомагнификация и биоаккумуляция, разложение на экотоксикологические конгенеры под воздействием УФ-излучения и микроорганизмов, разнообразное токсическое воздействие на живые организмы и др. В настоящее время наблюдается тенденция к переходу от использования галогенсодержащих, в частности, бромированных антипиренов к не содержащим галогенов антипиренам [1], которая определяется экологическими соображениями и накопленными данными о токсичности. Представители полибромированных дифениловых эфиров включены в список стойких органических загрязнителей в соответствии со Стокгольмской конвенцией. Однако декабромдифенилоксид (ДБДФО) в настоящее время является одним из наиболее часто встречающихся ПБДЭ в окружающей среде, что несёт серьёзные риски для местных экосистем и здоровья населения. К безгалогенным антипиренам принадлежит такое соединение, как меламин. Меламин и его производные нашли применение практически во всех отраслях промышленности, от изготовления предметов бытового назначения до строительной отрасли [2]. Актуально всестороннее исследование токсичности меламина и ДБДФО, как крайне распространенных добавок к различным материалам, особенно их экотоксичности, воздействия на водные и почвенные организмы.

Цель настоящей работы состояла в оценке токсического действия водных растворов меламина, декабромдифенилоксида и продуктов его фото- и термодеструкции с использованием многокомпонентной тест-системы.

Для реализации поставленной цели решались следующие задачи:

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

2. Определить токсичность проб воды, содержащих меламина, 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 меламина в различных концентрациях на параметры роста ряски малой (*Lemna minor* L.), ее морфометрические характеристики, общее состояние растений и содержание хлорофилла в листецах.

Объектами исследования служили растворы двух антипиренов: меламина и ДБДФО. Для исследования были взяты химически чистые вещества: кристаллический меламин (Торговый дом «Воткинский завод теплоизоляционных материалов», Россия) и кристаллический порошок ДБДФО (Shandong Haiwang Chem Co.Ltd, Китай). Для исследования токсичности продуктов фотодегградации ДБДФО водные пробы подвергали облучению УФ в течение суток. Для получения продуктов термодеструкции использовался метод термической возгонки при температуре 400 °С в течение 5 мин в ингаляционной камере с последующим отбором аспирационным методом. В качестве тест-организмов были использованы: бактериальный штамм *Dietzia maris* AM3 (коллекция ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН, г. Саратов), зеленая протококковая водоросль *Chlorella vulgaris* Beijer («Европолитест», г. Москва), ветвистоусые рачки *Daphnia magna* Straus («Европолитест», г. Москва) и водное растение ряска малая (*Lemna minor* L.), отобранное из естественной популяции и прошедшая акклиматизацию.

Определение токсичности растворов антипиренов по дегидрогеназной активности бактерий основано на способности ферментов дегидрогеназ восстанавливать бесцветный 2,3,5-трифенилтетразолийхлорид (2,3,5-ТТХ) до 2,3,5-трифенилформаза (2,3,5-ТФФ), имеющего темно-красный цвет [3]. Дегидрогеназы высоко чувствительны к действию токсичных веществ, в присутствии которых их активность снижается. К жидкой среде для культивирования добавляли 1 мл бактериальной суспензии *D. maris* AM3 и 1 мл раствора антипирена (меламина) с конечными концентрациями 4, 20 и 40 мг/мл.

ДБДФО был предварительно растворен в ацетоне в связи с низкой растворимостью в воде, а затем были произведены разведения водой до указанных концентраций антипирена. Полученные смеси инкубировали в стационарных условиях в термостате при  $t = 28$  °С в течение 6 сут до появления окраски 2,3,5-ТФФ, из реакционной смеси 2,3,5-ТФФ экстрагировали ацетоном. Колориметрировали ацетоновую фракцию на фотоэлектроколориметре КФК-2 при 440 нм. Количество образованного бактериями 2,3,5-ТФФ рассчитывали по калибровочной кривой, по отклонению этого показателя от контрольного оценивали токсичность исследованных растворов антипиренов.

Метод определения токсичности растворов антипиренов и продуктов фото- и термодеструкции декабромдифенилоксида с помощью одноклеточной водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer основан на регистрации различий в величине оптической плотности тест-культуры водоросли *C. vulgaris* Beijer, выращенной на среде, не содержащей исследуемых веществ (контроль), и в тестируемых растворах [4]. Измерение оптической плотности проводили при 565,5 нм на спектрофотометре КФК-3 «ЗОМЗ» после 22 часов культивирования в многокюветном культиваторе водорослей КВМ-05.

Определение токсичности растворов антипиренов и продуктов фото- и термодеструкции декабромдифенилоксида с использованием рачков *Daphnia magna* Straus основано на определении смертности дафний при воздействии токсических веществ, присутствующих в исследуемых растворах, по сравнению с контрольной культурой в среде, не содержащей токсических веществ [5].

Биотестирование токсичности растворов антипиренов с использованием ряски малой (*Lemna minor* L.) основано на регистрации ростовых характеристик ряски (число листецов, их колоний и корней в шт.), а также морфометрических показателей (размер листецов и корней) [6]. Через 7 сут проводилось исследование общего содержания хлорофиллов спектрофотометрически по величине поглощения спиртового экстракта из листецов при 665 нм [7].

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 153 источника на русском и английском языках. Работа изложена на 75 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 12 рисунками и 2 таблицами.

**Основное содержание работы.** В ходе проведенных экспериментов была проведена сравнительная оценка токсичности растворов меламина и ДБДФО с концентрациями 4 мг/л (ПДК для меламина), 20 мг/л (5 ПДК) и 40 мг/л (10 ПДК), основанная на изменении активности дегидрогеназ микроорганизма *D. maris* AM3 в сравнении с контролем. Было установлено, что по сравнению с контролем меламина в концентрации, равной ПДК, оказал стимулирующее воздействие на активность дегидрогеназ *D. maris* AM3, которая была на 40,4 % выше, чем в контроле. Предполагается, что высокое содержание азота стало причиной увеличения ферментативной активности. При концентрациях меламина, равных 5 и 10ПДК, разница в активности дегидрогеназ составила 19,3 и 10,5 %, что указывало на слабую токсичность (рисунок 1).

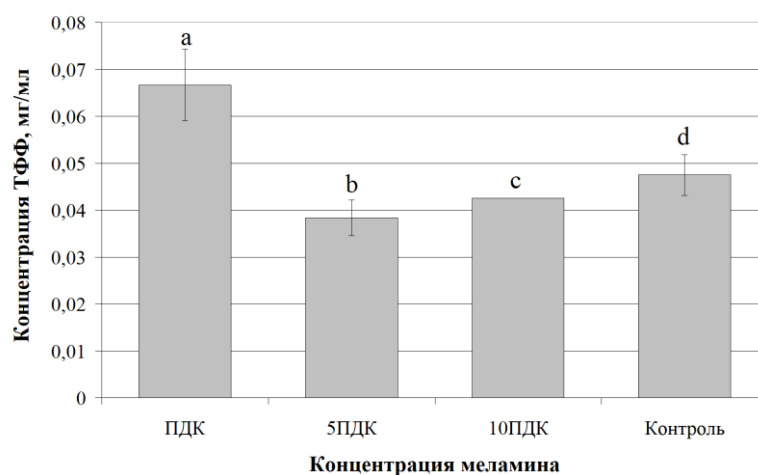


Рисунок 1 – Концентрация 2,3,5-ТФФ, образованного дегидрогеназами *D. maris* AM3 при оценке токсичности меламина в разных концентрациях

При исследованных концентрациях ДБДФО (4, 20 и 40 мг/л) в водных растворах разница в активности дегидрогеназ по сравнению с контролем составила 10,5, 42,9 и 13,6 %, соответственно, что указывало на слабую и среднюю степень токсичности проб воды с антипиреном (рисунок 2).

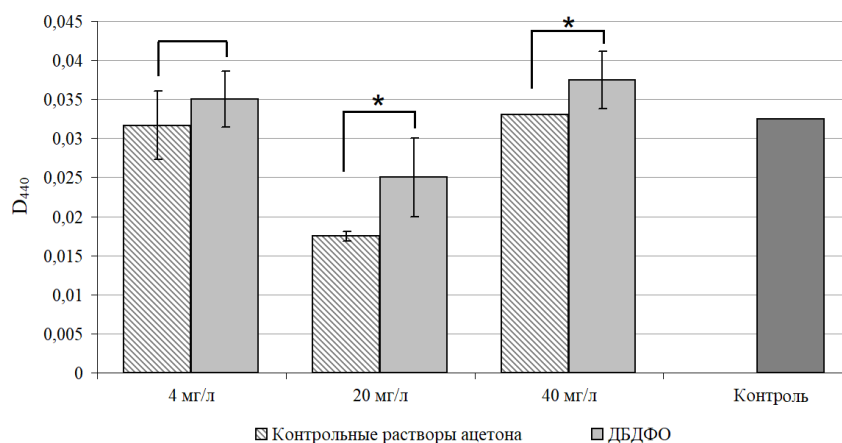


Рисунок 2 – Значения оптической плотности экстрактов 2,3,5-ТФФ, образованного дегидрогеназами *D. maris* AM3 при оценке токсичности ДБДФО в разных концентрациях

Было также обнаружено, что по сравнению с контрольными вариантами (растворы ацетона без антипирена) ДБДФО стимулировал активность дегидрогеназ, что может быть связано с участием этих ферментов в процессе деградации антипирена и в системах защиты от окислительного стресса. Таким образом, тест-организм *D. maris* AM3 показал более выраженное токсическое действие ДБДФО по сравнению с меламинам.

Меламин во всех исследуемых концентрациях (1, 5 и 10 ПДК) оказывает стимулирующее влияние на рост культуры *Chlorella vulgaris*, отклонения составили 21,4, 14,9 и 5,3 % соответственно (рисунок 3). Увеличение биомассы водоросли, вероятно, также связано с ассимиляцией различных форм азота.

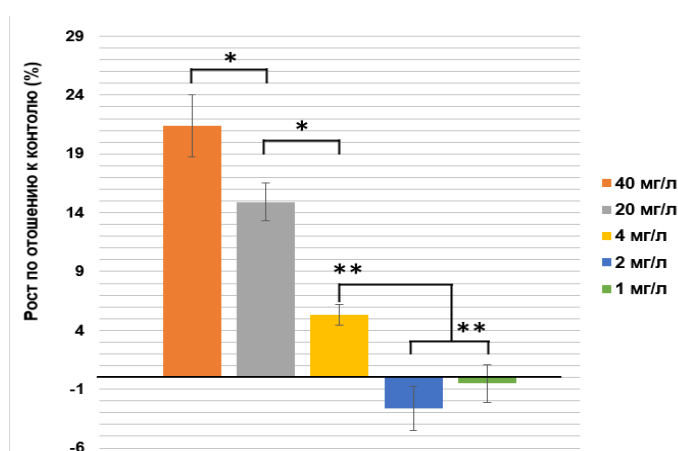


Рисунок 3 – Влияние меламина на рост микроводорослей *C. vulgaris* Beijer

Все исследуемые пробы воды, содержащие ДБДФО без воздействия УФ, в эксперименте с *C. vulgaris* оказали стимулирующее действие на рост культуры. Процентные отклонения от контрольных проб составили 40,25, 21,99, 19,09 и 15,35 % для дозовых нагрузок 50, 100, 150 и 300 мг/мл соответственно. В пробах с продуктами фотодегградации с увеличением дозовой нагрузки ДБДФО рост культуры увеличивался. Проба с дозовой нагрузкой 50 мг/мл, подавляла рост культуры на 32,08 % по сравнению с контролем, пробы с дозовой нагрузкой 100, 150 и 300 мг/мл стимулировали рост на 11,56, 34,20 и 39,86 % соответственно (рисунок 4).

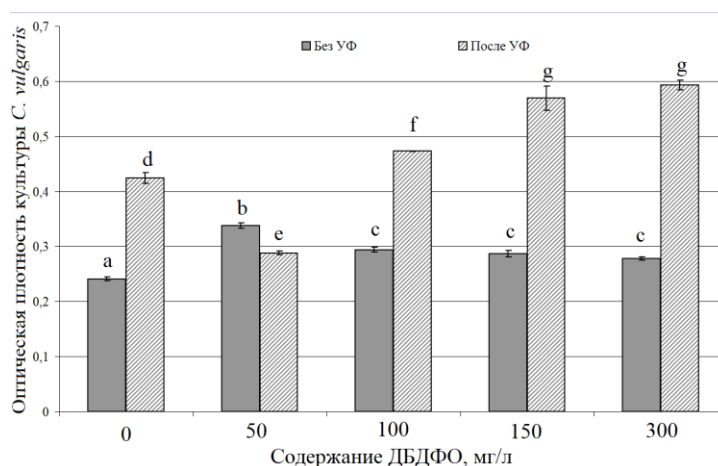


Рисунок 4 – Влияние ДБДФО, проконтактировавшего с водной пробой, без воздействия и после воздействия УФ, на рост *C. vulgaris*

Пробы воды, содержащие продукты термической деструкции 1000 мг ДБДФО, оказывали стимулирующее действие на рост культуры хлореллы (54,13 %); в пробах, содержащих продукты деструкции 4000 и 6000 мг, не наблюдалось достоверных отличий от контроля, стимулирующий эффект низких доз нивелировался.

Результаты эксперимента с использованием в качестве тест-организма ветвистоусых рачков *Daphnia magna* показали, что они оказались устойчивы к воздействию в течение 72 часов водных растворов ДБДФО с дозовой нагрузкой от 50 до 300 мг/мл (как без воздействия на них УФ, так и после него) и не проявили видимых признаков токсического поражения. При исследовании

токсичности продуктов термической деструкции смертность в опытных группах также не отличалась от смертности в контрольных. Растворы меламина с концентрациями равными ПДК и 5ПДК не оказывали токсического действия на дафний; при концентрации равной 10ПДК гибель дафний составила 25 %, что указывает на слабую токсичность.

По результатам биотестирования с водным растением *Lemna minor* L. было установлено, что через 7 сут культивирования меламина в концентрациях, равных ПДК и 5ПДК, оказывает ингибирующее действие на число листецов, колоний и корней ряски, а в концентрации, равной 10ПДК – стимулирующее (рисунки 5, 6). Предположительно, полученные результаты связаны с компенсацией токсического воздействия на прирост ряски повышением содержания азота в среде по мере минерализации меламина к 7 сут.

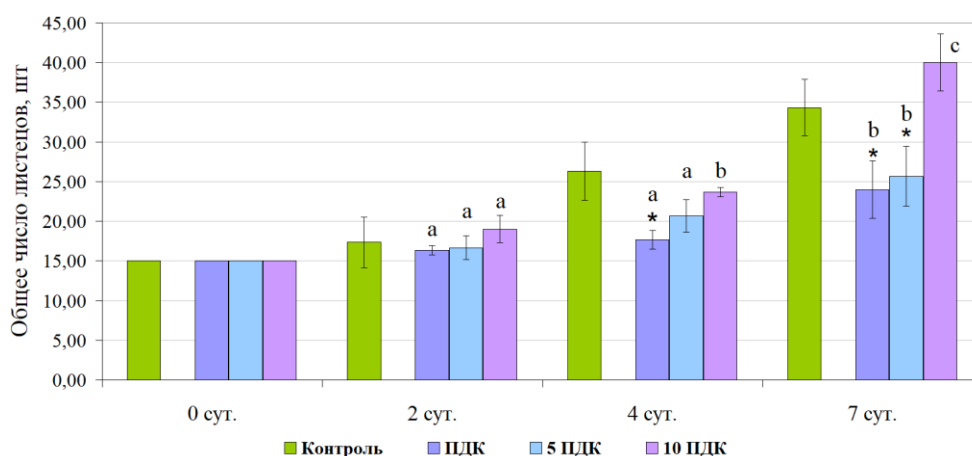


Рисунок 5 – Влияние меламина на прирост *L. minor* L.

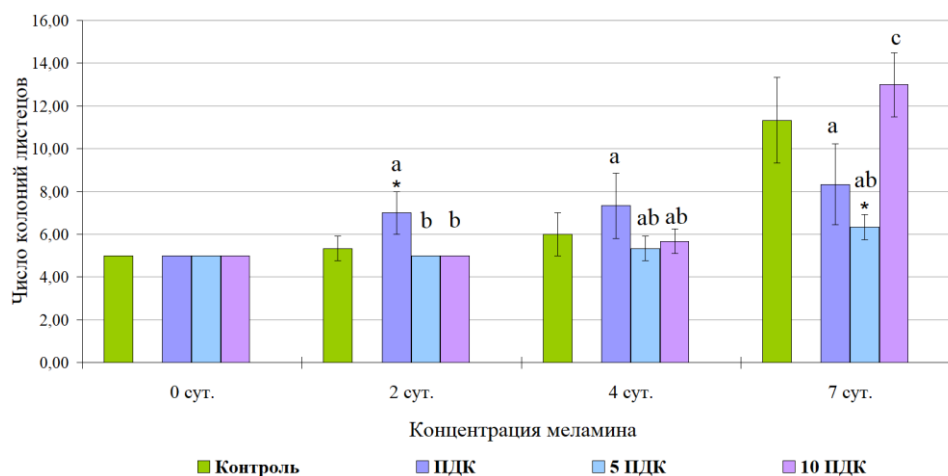


Рисунок 6 – Влияние меламина на число колоний *L. minor* L.



Содержание фотосинтетических пигментов служит чувствительным маркером нарушений метаболизма растительной клетки в целом. Установлено, что меламина во всех исследованных концентрациях вызывал значительное снижение (на 47-52 %) содержания хлорофилла в листецах *L. minor* через 7 сут культивирования.

**Заключение:** Результаты, полученные с помощью многокомпонентной тест-системы, показали различия в чувствительности тест-организмов к воздействию меламина и способствовали получению интегральной экологически значимой оценки токсичности. Наиболее чувствительным тест-объектом оказалось водное растение *Lemna minor* L., в особенности, показатель содержания хлорофилла в листецах. Полученные данные указывают на слабую экотоксичность меламина и соответствуют его санитарно-токсикологическим показателям вредности, разработанным на основании данных о токсичности для млекопитающих. Новые сведения об экотоксичности меламина необходимы для прогнозирования острого и хронического воздействия антипиренов на организмы окружающей среды, включая человека.

В совокупности с данными о невысокой токсичности меламина для млекопитающих в низких дозах, а также его низкой способности метаболизироваться и аккумулироваться в организме, отсутствию канцерогенного эффекта и генотоксичности, он может считаться более экологичным и безопасным для человека и животных антипиреном по сравнению с группой галогенсодержащих антипиренов.

**Выводы:** 1. Показатель активность дегидрогеназ тест-микроорганизма *Dietzia maris* AM3 при воздействии меламина в концентрации, равной ПДК (4 мг/л), был на 16 % выше, чем в контроле; в концентрациях, равных 5 и 10ПДК, был на 19,3 и 10,5 % ниже, чем в контроле, указывая на слабую токсичность меламина в этих концентрациях. 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. Установлена стимуляция роста *Chlorella vulgaris* Beijer при воздействии водных растворов меламина в концентрациях, равных 1, 5 и 10ПДК, на 21,4, 14,9 и 5,3 % и 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 дозовой 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 %.

3. Водные растворы меламина в концентрациях, равных 1 и 5ПДК, не вызывали гибели рачков *Daphnia magna* Straus в течение 72 ч, в концентрации, равной 10ПДК, гибель дафний составила 25 %, указывая на слабую 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.

4. Выявлено снижение суммарного прироста *Lemna minor* L. по сравнению с контролем через 4 сут культивирования в воде, содержащей меламина в концентрациях 1, 5 и 10ПДК и значительное снижение содержания хлорофилла (на 47-52 %) в листецах через 7 сут. Показано, что меламина в концентрациях, равных 1 и 5ПДК, через 7 сут культивирования ингибирует число листецов, колоний и корней ряски малой, в концентрации, равной 10ПДК – стимулирует.

#### **Список использованных источников**

- 1 Halogen-free flame retardants / Y. Z. Wang // Advances in Fire Retardant Materials / Eds. A. R. Horrocks, D. Price. – Sawston : Woodhead Publishing, 2008. – P. 67-94.
- 2 Melamine in the environment: a critical review of available information / L. H. Lütjens [et al.] // Environmental Sciences Europe. – 2023. – Vol. 35. – Article number 2.

- 3 Плешакова, Е. В. Разработка нового метода определения токсичности нефтезагрязнённой почвы / Е. В. Плешакова // Вестник СГТУ. – 2010. – № 3. – С. 188-193.
- 4 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.
- 5 ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.12-06. Токсикологические методы контроля. Методика измерений количества *Daphnia magna* Straus для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления методом прямого счета. – М. : ФБУ ФЦА, 2014. – 39 с.
- 6 Цаценко, Л. В. Рясковые как модельный объект в биотестировании водной и почвенной среды / Л. В. Цаценко, В. Г. Пасхалиди // Масличные культуры. – 2018. – Т. 4, № 176. – С. 146-151.
- 7 Лабораторный практикум по экологии / Н. А. Голубкина. – М. : ФОРУМ, 2009. – 64 с.

