

5. *Quan, J.* Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways / J. Quan, J. Tian // PloS ONE. – 2009. – Vol. 4, № 7. – P. 6441–6442.

6. *Green, M. R.* Molecular cloning. A laboratory manual. Fourth edition / M.R. Green, J. Sambrook // Cold Spring Harbor Lab. Press, New York. – 2012. – 630 p.

## **ПРИМЕНЕНИЕ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕПЕНИ И КЛАССА ОПАСНОСТИ ОТХОДОВ БОЯ ЗЕРКАЛ**

### **APPLICATION OF ALTERNATIVE TEST SYSTEMS FOR DETERMINATION OF HAZARD DEGREE AND CLASS OF BROKEN MIRRORS WASTE**

***С. Н. Камлюк, О. А. Борис, Т. Н. Гомолко,  
Т. В. Лисовская, Т. В. Деменкова, В. И. Иода***

***S. Kamliuk, O. Boris, T. Gomolko, T. Lisovskaya, T. Demenkova, V. Ioda***

*Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены»,  
г. Минск, Республика Беларусь  
Shevtsova308@gmail.com*

*Republican Unitary Enterprise «Scientific practical center of hygiene», Minsk, Republic of Belarus*

В статье изложены результаты испытаний отходов производства «бой зеркал при остеклении мебели» по показателю «экоотоксичность» с применением альтернативных тест-систем: культуры инфузорий *Tetrahymena pyriformis*, сельскохозяйственных культур (овса, огурца, редиса) в фитотесте. Описаны экспериментальные методы, приведено научное обоснование рациональных условий постановки эксперимента, критериев достоверности используемых тестов. Показана перспективность применения в практике биотестирования комплекса тест-моделей, поскольку данный подход наиболее адекватно моделирует процессы воздействия токсичных компонентов, содержащихся в отходах производства, на компоненты окружающей природной среды.

The article presents the results of tests of industrial wastes – broken mirrors waste according to the «ecotoxicity» indicator using alternative test-systems: protozoa *Tetrahymena pyriformis* culture as well as crops (oats, cucumber, radishes) on the phytotest. The experimental methods are described and the scientific substantiation of the rational conditions of the experiment, the reliability criteria of tests used are given. The prospects of using a complex of test models in practice for biotesting is shown, since this approach most adequately simulates the processes of the effects of toxic components contained in industrial wastes on environmental components.

*Ключевые слова:* отходы производства, класс опасности, экоотоксичность, токсичность, тест-система, *Tetrahymena pyriformis*.

*Keywords:* industrial wastes, hazard class, ecotoxicity, toxicity, test-system, *Tetrahymena pyriformis*.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2020-2-69-72>

На сегодняшний день проблема масштабного захоронения отходов производства продолжает оставаться весьма актуальной, особенно это касается ситуации с отходами, содержащими значительное количество токсичных компонентов [1].

В процессе производства, хранения, транспортировки и эксплуатации различных предметов бытовой и офисной мебели, имеющих зеркальные вставки, неизбежно образуются отходы битого зеркала (осколки и листы зеркал со сколами и другими повреждениями). Данному виду отходов согласно классификатору отходов, образующихся в Республике Беларусь, присвоено наименование «бой зеркал при остеклении мебели», код 3140844 [2]. Несмотря на то, что отходы боя зеркал состоят по большей части из неорганического стекла – материала относительно инертного и не представляющего угрозу для окружающей природной среды, – их компонентами являются также такие элементы, как серебро и алюминий, входящие в состав отражающего слоя, наносимого на заднюю поверхность стекла при производстве зеркал. Кроме того, в составе боя зеркал присутствуют и лакокрасочные материалы, предупреждающие механическое повреждение отражающего слоя.

Таким образом, отходы «бой зеркал при остеклении мебели» являются многокомпонентными и согласно классификатору отходов, образующихся в Республике Беларусь [2], подлежат оценке не только по показателю «токсичность», но и «экоотоксичность». В свою очередь, процедура исследований экоотоксичных свойств отходов в нашей стране на сегодняшний день проводится на основании батареи тест-объектов [3]. Данный подход предполагает применение альтернативных тест-систем, представленных водными и почвенными организмами из различных таксономических групп: пресноводными ресничными инфузориями *Tetrahymena pyriformis*, вторичноводным

моллюском *Lymnaea stagnalis* (большим прудовиком), дождевыми червями *Eisenia foetida*, а также сельскохозяйственными культурами (овес, огурец, редис и др.), на оценке длины проростков которых базируется широко используемый в экотоксикологических исследованиях фитотест [3]. Применение нескольких стандартизированных методов на ряде тест-систем – бактерии, водоросли, дафнии, почвенные олигохеты и высшие растения в процедуре оценки опасности отходов производства для окружающей природной среды предусмотрено также Рамочной директивой 2008/98/ЕС, что позволяет считать отечественные разработки и методические подходы в данном направлении вполне соответствующими научно-прикладным тенденциям, современным для стран Евросоюза [4].

В настоящей работе приведены методические аспекты и результаты проведения испытаний двух образцов отходов с наименованием «бой зеркал при остеклении мебели», код 3140844 [2], образованных на различных производственных предприятиях Республики Беларусь, по показателю «экоотоксичность». Источником образования отходов «бой зеркал при остеклении мебели» явился случайный бой зеркал в процессе осуществления производственной деятельности при остеклении мебели.

Оценку токсичности отходов в фитотесте проводили согласно [3]. Из образцов отходов получали нативный экстракт (вытяжку): при соотношении образца отходов и дистиллированной воды 1г:10мл, экспозиции в течение 3 суток при комнатной температуре ( $20 \pm 5$  °С), при периодическом встряхивании. На предварительном этапе фитотеста в качестве тест-объекта использовали семена огурцов сорта «Засолачны», редиса сорта «Чырвоны велікан», овса сорта «Стрелец П447q7». Семена высевали по 25 штук в чашки в трех повторностях и экспонировали 7 суток при температуре + 24 °С. Через 7 суток измеряли длину корешков проростков по корню максимальной длины. Определяли среднее значение ( $L_{cp}$ ) длины корней из трех повторностей на каждой культуре семян в опыте и контроле. Сравнивали  $L_{cp. опыта}$  и  $L_{cp. контроля}$  между собой и определяли эффект торможения  $E_T$  %. Оценку полученных результатов проводили на основании критериев: отходы оказывают фитотоксическое действие при  $E_T \geq 20$  % хотя бы в одной из культур семян; отсутствие фитотоксического действия отходов при  $E_T < 20$  %, либо  $L_{cp. опыта} >$  или  $= L_{cp. контроля}$  в каждой культуре семян.

Оценку токсичности отходов с применением *Tetrahymena pyriformis* проводили согласно [3]. Из образцов отходов готовили вытяжки: соотношение площади к объему модельной среды (дистиллированная вода) 1г/1см<sup>3</sup>. Экспозиция 10 суток при комнатной температуре. Изучение токсичности вытяжек из образцов отходов проводили в остром, подостром и хроническом экспериментах на тест-объекте *Tetrahymena pyriformis*. При проведении острого и подострого экспериментов из каждой вытяжки готовили серию разведений (концентраций): 100 мг/мл, 200мг/мл, 400мг/мл, 500 мг/мл, 600 мг/мл 800мг/мл, 1000 мг/мл. По

1 мл раствора каждой концентрации вносили в десяти миллилитровые флакончики в двух повторностях. В каждую пробу вносили инокулят инфузорий в стационарной фазе роста. При осуществлении острого эксперимента пробы инкубировали при 25°С 3 ч; при проведении подострого эксперимента – 24 ч. По истечении срока инкубации под микроскопом в нативном препарате наблюдали картину интоксикации. В счетной камере Фукса-Розенталя подсчитывали число погибших инфузорий до их фиксации и общее число инфузорий после фиксации. На основании расчета % летальности установлены основные параметры токсичности:  $LD_{16}$ ,  $LD_{50}$ ,  $LD_{84}$  – дозы, вызывающие гибель 16 %, 50 %, 84 % особей, соответственно;  $K_{кум}$  – коэффициент кумуляции как частное между средней смертельной дозой, полученной в подостром эксперименте и средней смертельной дозой, полученной в остром эксперименте. В хроническом эксперименте вытяжки из образцов отходов № 1 и № 2 были исследованы в диапазоне концентраций, охватывающих токсичные ( $LD_{50}$ ), пороговые и малые дозы: 100, 200, 500, 800, 1000 мг/мл. Исследования осуществлены в стерильных условиях. Вытяжку вносили в стандартную среду культивирования, разлитую по 10 мл в 50 мл колбочки с ватно-марлевыми пробками, которые в течение 96 часов выдерживали в термостате при 25°С. Через 24, 48, 72, 96 часов оценивали состояние популяции, и осуществляли подсчет организмов. По результатам подсчетов были определены:  $ED_{50}$  – доза, вызывающая угнетение генеративной функции на 50% через 24 и 72 часа инкубации;  $Kад$  – коэффициент адаптогенности, характеризующий адаптационный потенциал популяции; мутагенная активность образцов отходов. Класс опасности по результатам испытаний образцов отходов № 1 и № 2 был установлен согласно нормативным данным, приведенным в таблице 1.

Таблица 1 – Критерии отнесения отходов к классам опасности по показателям их токсичности на *Tetrahymena pyriformis* W

Показатель	Классы опасности отходов			
	1-й класс	2-й класс	3-й класс	4-й класс
$LD_{50}$ , мг/мл	менее 0,1	0,1 – 1,0	1,1 – 20	более 20
$K_{кум_{ac}}$	менее 0,1	0,10 – 0,30	0,31 – 0,50	более 0,50
$K_{кум_{chr}}$	менее 0,1	0,10 – 0,30	0,31 – 0,50	более 0,50
МНД, мг/мл	менее $10^{-6}$	$10^{-6}$ – $10^{-4}$	$10^{-4}$ – $10^{-1}$	более $10^{-1}$
$LD_{50}/МНД$	более $10^6$	$10^6$ – $10^5$	$10^5$ – $10^4$	менее $10^4$

В остром и подостром экспериментах в пробах, содержащих вытяжку из образца № 1 отходов в концентрациях 600-1000 мг/мл, и вытяжку из образца отходов № 2 в концентрациях 500-1000 мг/мл наблюдалось изменение формы тела и характера движения инфузорий *Tetrahymena pyriformis*, отмечено незначительное число мертвых организмов (табл. 2).

Таблица 2 – Результаты изучения токсичности образцов отходов № 1 и № 2 в остром и подостром экспериментах на *Tetrahymena pyriformis*

Показатель токсичности	Величина токсичности		Класс опасности	
	Образец № 1	Образец № 2	Образец № 1	Образец № 2
Острый эксперимент				
ЛД <sub>16</sub> , мг/мл	495	576	-	
ЛД <sub>50</sub> , мг/мл	581±0,44	623±0,32	4	
ЛД <sub>84</sub> , мг/мл	856	889	-	
Подострый эксперимент				
ЛД <sub>16</sub> , мг/мл	--	--	-	
ЛД <sub>50</sub> , мг/мл	1117±2,56	1002±1,56	-	
ЛД <sub>84</sub> , мг/мл	2900	2 800	-	
К <sub>кзм</sub>	1,92	1,74	4	

Данные, полученные в остром и подостром экспериментах свидетельствуют о том, что по показателю острой токсичности (ЛД<sub>50</sub>) образцы отходов № 1 и № 2 относятся к 4 классу опасности; по изучению кумулятивных свойств образцы отходов № 1 и № 2 обладают слабо выраженной кумуляцией и по величине коэффициента кумуляции относятся к 4 классу опасности. Согласно результатам хронического эксперимента, образцы отходов № 1 и № 2 в концентрациях 100 мг/мл – 500 мг/мл оказывали ростостимулирующее действие на протяжении всего жизненного цикла (0-96 часов). В пробах, содержащих образцы отходов № 1 и № 2 в концентрациях 800, 1000 мг/мл наблюдалось снижение жизненной активности инфузорий в интервале 48-96 часов наблюдения. Анализ адаптационных колебаний и их количественная оценка выявили снижение адаптационных возможностей популяции по сравнению с контролем на 43 % в пробах, содержащих вытяжку из исследуемого образца в нативном виде (1000 мг/мл). Вытяжки из образцов отходов № 1 и № 2 не проявили мутагенной активности, но изменили устойчивости клеточных мембран инфузорий к неблагоприятным условиям внешней среды в среднем на 50-80% (табл. 3).

Таблица 3 – Биологическое действие образцов отходов № 1 и № 2 на популяцию *Tetrahymena pyriformis*

Концентрация, мг/мл		Коэффициент адаптогенности		Кислотная резистентность	
Образец № 1	Образец № 2	Образец № 1	Образец № 2	Образец № 1	Образец № 2
0 (контроль)	0 (контроль)	1,00±0,05	1,00±0,05	1,00±0,00	1,00±0,00
100	100	1,26±0,04*	1,46±0,04*	1,00±0,00	1,00±0,00
200	200	1,38±0,01*	1,52±0,01*	1,00±0,00	1,00±0,00
500	500	1,24±0,02*	1,24±0,02*	1,00±0,00	1,00±0,00
800	800	0,99±0,02	1,00±0,03	1,10±0,00	1,10±0,00
1000	1000	0,59±0,01*	0,57±0,01*	0,90±0,00	0,90±0,00

По результатам токсиколого-гигиенической оценки в хроническом эксперименте на *Tetrahymena pyriformis* были определены значения МНД, рассчитаны значения Ккум<sub>chronica</sub> (табл. 4).

Таблица 4 – Токсичность образцов отходов № 1 и № 2 по результатам хронического эксперимента на *Tetrahymena pyriformis*

Показатель токсичности	Результат		Класс опасности	
	Образец № 1	Образец № 2	Образец № 1	Образец № 2
Острый эксперимент				
ЕД <sub>50</sub> , мг/мл, лог. фаза	1034,9±0,37	998,6±0,47	-	-
ЕД <sub>50</sub> , мг/мл, стац. фаза	1099,3±0,99	875,3±1,00	-	-
Ккум <sub>chronica</sub>	0,97	0,88	4 класс	4 класс
МНД, мг/мл	500	500	4 класс	4 класс

Согласно результатам изучения, в хроническом эксперименте на *Tetrahymena pyriformis*, образцы отходов № 1 и № 2 относятся к 4 классу опасности (малоопасным отходам).

Таким образом, по показателю острой токсичности (ЛД<sub>50</sub>) образцы отходов № 1 и № 2 относятся к 4 классу опасности, по изучению кумулятивных свойств в остром и подостром экспериментах образцы отходов № 1 и № 2 обладают слабо выраженной кумуляцией и по величине коэффициента кумуляции относятся к 4 клас-

су опасности; по результатам изучения в хроническом эксперименте и биологического действия на тест-объект *Tetrahymena pyriformis* образцы отходов № 1 и № 2 относятся к 4 классу опасности (малоопасным отходам).

Результаты предварительного этапа исследования фитотоксичности образцов отходов № 1 и № 2 представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты оценки токсичности образцов отходов № 1 и № 2 в фитотесте

№ образца	Тест-культура (семена)	Средняя длина корней проростков ( $L_{cp}$ ), мм	Тест-реакция	Эффект торможения $E_T$ , %
Отходы: бой зеркал при остеклении мебели, образец № 1				
контроль	Редис	6,73	норма	-
	Огурцы	7,69	норма	-
	Овес	8,09	норма	-
нативный экстракт образца № 1	Редис	6,48	торможение	3,72 %
	Огурцы	7,77	норма	+1,04 %
	Овес	8,10	норма	+0,12 %
Отходы: бой зеркал при остеклении мебели, образец № 2				
контроль	Редис	8,24	норма	-
	Огурцы	7,05	норма	-
	Овес	9,47	норма	-
нативный экстракт образца № 2	Редис	8,00	торможение	2,91 %
	Огурцы	6,54	торможение	7,23 %
	Овес	8,96	торможение	5,38 %

Полученные данные свидетельствуют о том, что в результате воздействия образца отходов № 1 наблюдался эффект торможения развития корешков проростков редиса  $E_T = 3,72$  %, который не достигает порога фитотоксичности, равного 20 %; эффектов торможения развития корешков проростков огурцов и овса отмечено не было (табл. 5).

По итогам эксперимента с образцом отходов № 2 наблюдались эффекты торможения развития корешков проростков редиса, огурцов и овса, равные 2,91 %, 7,23 % и 5,38 %, соответственно (таблица 5). При этом показатели эффекта торможения, зарегистрированные для образца отходов № 2 на всех протестированных культурах, не достигали порога фитотоксичности, равного 20 %. Результаты оценки токсичности образцов отходов № 1 и № 2 «бой зеркал при остеклении мебели» в фитотесте позволяют отнести исследованные отходы к неопасным по степени опасности отходов в соответствии с [3].

Поскольку отнесение испытанного образца отходов производства к определенному классу опасности по показателю «экоотоксичность» осуществляется по лимитирующему показателю (наиболее строгому показателю или значению, полученному в одной из ряда примененных тест-систем), то испытанные образцы отходов относятся к 4-му классу опасности отходов (малоопасным отходам). В свою очередь, положительная практика применения описанной методики подтверждает целесообразность использования изложенных в работе методических подходов и адекватность регистрируемых при этом откликов применяемых биологических тест-систем.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. База данных РУП «Бел НИЦ «Экология». Образование, использование и удаление отходов на предприятиях за 2010 г. – Минск: Бел НИЦ «Экология», 2011. – 196 с.
2. Классификатор отходов, образующихся в Республике Беларусь ОКРБ 021-2019. Утв. Постановлением Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь 09.09.2019 № 3-Т / Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь, 27.09.2019, 8/34631 / [Электронный ресурс]. Режим доступа: [http://pravo.by/upload/docs/op/W21934631p\\_1569531600.pdf](http://pravo.by/upload/docs/op/W21934631p_1569531600.pdf) – Дата доступа: 20.12.2019, Минск. – 88 с.
3. Метод экспериментального определения токсичности отходов производства: Инструкция по применению № 044–1215, утв. Гл. гос. сан. врачом Республики Беларусь 07.04.2016 г. – Минск, 2016. – 56 с.
4. Directive 2008/98/EC of the European parliament and of the council of 19 November 2008 on waste and repealing certain Directives / Official journal of the European Union, 2008. – L 312. – P.3–30.