

ПРИМЕНЕНИЕ ДИХРОМАТА КАЛИЯ В КАЧЕСТВЕ ЭТАЛОННОГО ВЕЩЕСТВА ПРИ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА МЕТОДАМИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ В КАЧЕСТВЕ ТЕСТ-ОБЪЕКТА ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ

О. А. Борис, С. Ю. Петрова, Т. Н. Гомолко, С. Н. Шевцова*

Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены»,
г. Минск, Республика Беларусь, *e-mail: olgaboris88@gmail.com

Поступила в редакцию 30.03.2018 г.

В статье представлены результаты тестирования дихромата калия как эталонного вещества в тест-модели *Eisenia foetida*, применяемой для оценки экотоксичности отходов производства. Установлен диапазон реагирования тест-организма в остром эксперименте LC_{50} 0,272 – 0,297 г/кг дихромата калия при внутрилабораторном тестировании.

Ключевые слова: биотестирование, *Eisenia foetida*, экотоксичность, отходы производства, эталонное вещество.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема безопасности отходов производства приобрела в настоящее время глобальное значение. Присутствие отходов производства в окружающей среде вызывает опасения в отношении возможного вредного воздействия на почву, водную среду и экосистемы в целом. Одним из ключевых функциональных элементов обеспечения экологически и экономически эффективного управления отходами является изучение и оценка потенциальных токсических свойств отходов [1]. В концепции Базельской конвенции заложено положение о необходимости постоянной методологической доработки и внедрения новых экотоксикологических тестов для изучения отходов. Комбинация тестов должна быть репрезентативной для почвы и водной среды. Конечная цель – это отнесение отходов к определенному классу опасности в результате системной оценки, включающей биотестирование на представителях различных систематических групп.

Для решения данной проблемы на базе Республиканского унитарного предприятия «Научно-практический центр гигиены» (Беларусь) разработана оригинальная модификация методики, изложенной в Руководстве [2], для оценки острой токсичности отходов производства с использованием дождевых червей вида *Eisenia foetida*. *Eisenia foetida* часто используется для оценки токсичности

химических веществ, пестицидов [2–4]. Дождевой червь вида *Eisenia foetida* является представителем одного из десяти родов семейства люмбрицид (*Lumbricidae*) и относится к типу кольчатые черви (*Annelida*) и к классу малощетинковые (*Oligochaeta*). *Eisenia foetida* является космополитом, обитает в почвах, богатых органическими веществами, имеет короткий жизненный цикл по сравнению с другими представителями семейства – ювенильные особи выводятся из коконов за 3–4 недели и достигают половой зрелости за 7–8 недель при температуре окружающей среды 20°C. Вид отличается высокой плодовитостью – взрослая особь производит от 2 до 5 коконов в неделю. На сегодняшний день изучены многие аспекты реализации механизмов токсического действия химических веществ на живые организмы. Отличительной особенностью *Eisenia foetida* является способность реагировать на воздействие липофильных соединений, механизм действия которых реализуется посредством разрушения клеточной мембраны при растворении их в липидной фазе, воздействия на нервную ткань, блокирования АТФ-азы и нарушения работы ионного насоса и других специфических механизмов [5]. Тест-отклик на воздействие химических веществ на организм *Eisenia foetida* выражается в гибели организмов, изменении поведенческих реакций, снижении веса, особенностях морфологии, снижении плодовитости.

Для тестирования отходов производства нами используется лабораторная популяция дождевого навозного червя вида *Eisenia foetida*, подвида *Eisenia foetida foetida*. Разработанная методика оценки токсичности отходов производства в тест-модели *Eisenia foetida* основана на экспозиции дождевых червей в серии модельных сред, содержащих различные концентрации отходов, в результате которой определяют токсические эффекты в виде средней летальной концентрации (далее – LC_{50}), снижения прироста коллумелярного веса в опытной группе животных на предельной концентрации 1000,0 г/кг по сравнению с отрицательным контролем, патологических поведенческих реакций и видимых морфологических изменений организмов животных, с последующей оценкой степени и класса опасности отходов по установленным критериям [6].

Использование в лабораторной практике вновь разработанных методов требует проведения их валидации [7]. Одна из важнейших метрологических характеристик в биотестировании – это чувствительность тест-организма к эталонному (референсному) токсиканту. Тест-отклик на воздействие эталонного вещества должен находиться в оговоренном диапазоне, что позволяет оценить воспроизводимость полученных результатов. В качестве эталонных токсикантов часто используют следующие вещества: дихромат калия, борная кислота, хлорацетамид, карбендазим, беномил, кадмия хлорид, меди сульфат, трихлор-2,4,5-феноксиацетат калия. Согласно [1], эталонное вещество в тесте для определения LC_{50} подбирается лабораторией по собственному усмотрению.

Цель работы – определение чувствительности тест-организма *Eisenia foetida* к эталонному веществу с установлением стандартного диапазона реагирования

LC_{50} при внутрилабораторном тестировании.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве эталонного вещества был выбран дихромат калия, $K_2Cr_2O_7$ (CAS № 7778-50-9) в виде кристаллического порошка ярко-оранжевого цвета.

С целью установления диапазона реагирования LC_{50} дихромата калия на *Eisenia foetida* эксперимент выполняли 4-х-кратно, в разные сезоны, в воспроизводимых стандартных условиях. При тестировании использовали модельный субстрат, оптимальный для целей и условий исследования. Состав экспериментального модельного субстрата включает следующие компоненты, в % от общей массы сухого вещества: песок мелкий – 40%; компост из ферментированного навоза крупного рогатого скота и соломы, имеющий pH около 8,3 (срок ферментации не менее 12 месяцев) – 20%; гумифицированная почва, образованная в результате жизнедеятельности червей – 20%; торф верховой (pH 5,2–5,8) – 20%. Субстрат после смешивания компонентов увлажняли отстоянной водопроводной водой. Параметры модельного субстрата перед использованием в эксперименте должны составлять: массовая доля влаги 65–80%, pH $7,0 \pm 0,5$. Для корректировки pH, в случае значений менее 6,5, используется карбонат кальция ($CaCO_3$ пудра).

Для исследований отбирались половозрелые особи *Eisenia foetida* (имеющие поперечный поясок) массой 250–650 мг, имеющие нормальную морфологию и реагирующие на механические раздражители [2].

Все серии экспериментов выполнялись при стандартных условиях среды помещения: температура воздуха 20–22°C, влажность воздуха 39–45%, атмосферное давление 731–740 мм рт.ст. Экспериментальная посуда: одноразовые пластиковые контейнеры объемом 1000 мл с перфорированными крышками. Параметры модельного субстрата до внесения исследуемого вещества: pH 7,1–7,4; массовая доля влаги 76,00–77,05%.

Предварительный этап эксперимента проводился однократно, с целью выявления биологически эффективных концентраций токсиканта. В ходе предварительного этапа тестировали 3 концентрации дихромата калия в одной повторности. Навески дихромата калия растворяли в дистиллированной воде, при этом количество воды не должно приводить к переувлажнению модельного субстрата. Использовали 3 особи *Eisenia foetida* на 300 г модельного субстрата. В контейнеры с модельным субстратом вносили водные растворы дихромата калия, соблюдая соотношение массы дихромата калия (порошок) к массе субстрата: 0,01 г/кг, 0,10 г/кг, 0,50 г/кг. После тщательного смешивания токсиканта с субстратом в контейнеры вносили особи *Eisenia foetida*. В качестве отрицательного контроля использовали субстрат без токсиканта, в который помещали особи *Eisenia foetida* при идентичных условиях. Экспозиция составляла 3 суток. В течение эксперимента наблюдались и регистрировались изменения поведенческих реакций животных, видимые морфологические изменения и гибель животных.

Основной этап эксперимента повторяли 4 раза в разные сезоны: летом, осенью, зимой, весной. В ходе основного этапа тестировали 4 концентрации дихромата калия в трех повторностях каждую. Навески дихромата калия также растворяли в дистиллированной воде. Использовали 7 особей *Eisenia foetida* на 500 г модельного субстрата. В контейнеры с субстратом вносили водные растворы дихромата калия, соблюдая соотношение массы дихромата калия (порошок) к массе субстрата: 0,20 г/кг, 0,30 г/кг, 0,35 г/кг, 0,40 г/кг. После смешивания токсиканта с субстратом в контейнеры вносили животных. В качестве отрицательного контроля использовали субстрат без токсиканта, в который помещали особи *Eisenia foetida* при идентичных условиях. Через 7 суток эксперимента регистрировалась гибель животных. В результате основного этапа эксперимента определялся основной оценочный показатель – LC_{50} . Критерий достоверности теста: допустимая гибель в отрицательном контроле – не более 1 особи.

Расчет показателя LC_{50} выполняли пробит-анализом по методу Финни с использованием программы Excel. Количественные параметры представлены в виде значения LC_{50} и 95% доверительного интервала (далее – 95% ДИ). Расчет коэффициента вариации выполняли с использованием пакета для анализа статистических и математических данных Statistica 7.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты предварительного этапа эксперимента выявили характерные тест-отклики в серии изученных концентраций токсиканта. Воздействие дихромата калия в концентрациях 0,01 г/кг и 0,10 г/кг не приводило к изменению поведенческих реакций – скорость зарывания животных в субстрат и двигательная активность не отличались от животных контрольной группы. Воздействие дихромата калия в концентрации 0,50 г/кг приводило к снижению скорости зарывания в субстрат, наблюдалось снижение двигательной активности животных. Через 3 суток зарегистрирована гибель 3 животных, подвергшихся воздействию дихромата калия в концентрации 0,50 г/кг. Воздействие дихромата калия в концентрациях 0,01 г/кг и 0,10 г/кг не приводило к гибели животных через 3 суток.

Таким образом, в ходе предварительного эксперимента определены недействующая концентрация дихромата калия – 0,10 г/кг и концентрация, вызывающая 100% гибель животных – 0,50 г/кг.

Как показано в таблице 1, в результате выполнения основных этапов во всех 4-х сериях экспериментов выявлен дозозависимый эффект гибели подопытных животных в диапазоне изученных концентраций дихромата калия.

В результате 7-суточной экспозиции дихромата калия в серии разведений в тест-модели *Eisenia foetida* из средних значений летальности рассчитывалось значение LC_{50} . Установленные величины LC_{50} приведены в таблице 2.

Таблица 1. Летальность *Eisenia foetida* в результате 7-суточной экспозиции дихромата калия

Концентрация дихромата калия, г/кг	количество погибших животных/количество животных в группе			
	повторность 1	повторность 2	повторность 3	среднее значение летальности
эксперимент № 1 – июль				
0,20	2/7	1/7	2/7	1,66
0,30	3/7	3/7	3/7	3,00
0,35	5/7	6/7	5/7	5,33
0,40	7/7	6/7	7/7	6,66
контроль без токсиканта	0/7	0/7	0/7	0,0
эксперимент № 2 – сентябрь				
0,20	2/7	1/7	1/7	1,33
0,30	3/7	3/7	3/7	3,00
0,35	5/7	5/7	5/7	5,00
0,40	6/7	6/7	6/7	6,00
контроль без токсиканта	0/7	0/7	0/7	0,0
эксперимент № 3 – январь				
0,20	1/7	2/7	1/7	1,33
0,30	3/7	4/7	3/7	3,33
0,35	6/7	5/7	6/7	5,66
0,40	7/7	6/7	6/7	6,33
контроль без токсиканта	0/7	0/7	0/7	0,0
эксперимент № 4 – март				
0,20	2/7	2/7	2/7	2,00
0,30	3/7	3/7	4/7	3,33
0,35	5/7	5/7	5/7	5,00
0,40	6/7	7/7	6/7	6,33
контроль без токсиканта	0/7	0/7	0/7	0,0

Таблица 2. Средняя летальная концентрация дихромата калия в серии экспериментов на *Eisenia foetida*

№ серии эксперимента	Средняя летальная концентрация, г/кг (95%ДИ)
1 (июль)	0,297 (0,26 – 0,34)
2 (сентябрь)	0,292 (0,24 – 0,35)
3 (январь)	0,279 (0,23 – 0,34)
4 (март)	0,272 (0,21 – 0,35)

В четырех сериях экспериментов наблюдалась высокая воспроизводимость результатов значений LC_{50} – коэффициент вариации равен 4,04. Установлено отсутствие сезонных колебаний уровней острой токсичности дихромата калия по критерию летальности *Eisenia foetida*.

Таким образом, диапазон реагирования *Eisenia foetida* в остром эксперименте следует принять LC_{50} 0,272 – 0,297 г/кг дихромата калия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлен диапазон реагирования тест-организма *Eisenia foetida* в остром эксперименте LC_{50} 0,272 – 0,297 г/кг дихромата калия при внутрилабораторном тестировании. Использование дихромата калия в качестве «положительного контроля» в практике тестирования отходов для оценки токсичности в тест-модели *Eisenia foetida* позволит контролировать чувствительность тест-организма и стабильность тест-модели.

Возможность объективного определения токсичности отходов производства в тест-модели с использованием дождевых червей достигается благодаря применению чувствительного тест-объекта, условий моделирования экспериментальной среды, которые обеспечивают биодоступность вредных компонентов отходов, применению объективных параметров учета эффекта, соблюдению критериев достоверности теста, контролю воспроизводимости результатов исследований с использованием эталонного вещества. Такой подход позволяет в полной мере оценивать токсичность отходов в лабораторных условиях.

Список литературы:

1. ОЭСР. Рекомендации по экологически оправданному управлению отходами. 2004.
<http://www.oecd.org/env/waste/environmentallysoundmanagementofwaste.htm> (дата обращения 30.03.2018).
2. OECD (1984). Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, No. 207, OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070042-en> (дата обращения 30.03.2018).
3. ISO 17512-1:2008. Soil quality – Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour – Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*).
4. OECD (2004), Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*), OECD Publishing, Paris, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070325-en> (дата обращения 30.03.2018).
5. Арбузова Л.Л. Ихтиотоксикология. Уч. пос. Владивосток: Дальрыбвтуз, 2015.
6. Борис О.А. и др. Метод исследования токсичности отходов в тест-модели *Eisenia foetida* // Сахаровские чтения 2017 года : экологические проблемы XXI века. Материалы 17-й междунар. науч. конф. Минск, 18-19 мая 2017 г. в 2 ч. МГЭУ им. А.Д. Сахарова БГУ. Под общ. ред. С.А. Маскевича, С.С. Позняка. Минск: ИВЦ Минфина, 2017. Ч. 1. С. 116.
7. ISO 5725-2:1994. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.

APPLYING POTASSIUM DICHROMATE AS REFERENCE MATERIAL IN TOXICOLOGICAL ANALYSIS OF INDUSTRIAL WASTE BY BIOASSAY METHODS USING EARTHWORM AS TEST OBJECT

O. A. Boris*, S. Yu. Petrova, T .N. Gomolko, and S. N. Shevtsova

Republican Unitary Enterprise “Scientific and Practical Centre of Hygiene”, Minsk, Republic of Belarus, *e-mail: olgaboris88@gmail.com

Received March 30, 2018

Abstract – The article presents the results of bioassay analysis of potassium dichromate as a reference chemical in *Eisenia foetida* test model applied for ecotoxicity assessment of industrial wastes. Test organism response range was determined to be as follows $LC_{50} = 0.272-0.297$ g/kg potassium dichromate under acute experimental conditions within intralaboratory testing.

Keywords: bioassay, *Eisenia foetida*, ecotoxicity, industrial wastes, reference chemical.