

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
ИНСТИТУТ ОЗЕРОВЕДЕНИЯ

КОНТРОЛЬ  
ПОСТАВИЛ  
*Кафедра*

На правах рукописи

УДК 574.64:591.524.1:676.014.34:547.992.3

КАЛИНКИНА

Наталья Михайловна

ЭКОЛОГО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА  
ОПАСНОСТИ СУЛЬФАТНОГО ЛИГНИНА  
ДЛЯ ГИДРОБИОНТОВ

03.00.16 - "экология"

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

1993

146047K

Работа выполнена в лаборатории водной токсикологии  
Института экологической токсикологии ВНИПОбупром Минлесбум-  
ром и в лаборатории охраны природы Института леса Карельского  
научного центра.

Научный руководитель - доктор биологических наук С.П. Китаев  
Официальные оппоненты -

доктор биологических наук Иванова М.Б.  
доктор медицинский наук Тонкопий В.Д.

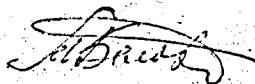
Ведущая организация - Государственный научно-исследователь-  
ский институт озерного и речного  
хозяйства

Защита состоится "\_\_\_" \_\_\_\_\_ 1993 г.  
в \_\_\_\_\_ час. на заседании специализированного совета  
Д.200.10.01. Института озераведения РАН по адресу:  
196199, г. Санкт-Петербург, ул. Севастьянова, 9.

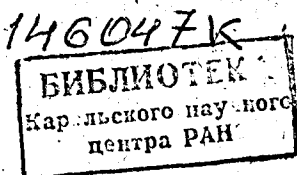
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института  
озераведения.

Автореферат разослан "\_\_\_" \_\_\_\_\_ 1993 г.

Ученый секретарь  
специализированного совета  
кандидат биологических наук



БЕЛОВА М.А.



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время главным источником поступления лигнинных веществ в водоемы являются предприятия целлюлозно-бумажной промышленности. При сульфатном способе получения целлюлозы 60% древесины переходят в черный целок, в котором половину органических соединений составляет лигнин. Его содержание в сточных водах большинства целлюлозно-бумажных комбинатов доходит до 300 мг/л и более. Даже после глубокой очистки, включая химическую, концентрация лигнина в стоках составляет около 20 мг/л.

Лигнинные вещества представляют большую опасность для крупных озер, которые являются конечными приемниками поверхностного стока, в том числе сточных вод. Значительные количества лигнинных веществ (до 5 тыс. тонн в год) поступают, например, со сточными водами Сегежского ЦБК в карельское озеро Выгозеро.

В этой связи весьма актуальными становятся работы, преследующие цель ограничить сброс лигнинных веществ в водоемы и тем самым оптимизировать среду для водных сообществ. Определение концентраций сульфатного лигнина, не действующих на водные организмы различных трофических уровней, служит основой для утверждения регламента на сброс лигнина в водоемы.

Важно изучить и опасность лигнина для гидробионтов при его деструкции, поскольку в природных водоемах продукты его распада могут быть более токсичными, чем исходное вещество.

Оценка патологического состояния гидробионтов при воздействии на них токсикантов, включая лигнинные вещества, возможна только при подробном исследовании нормального состояния организмов. Нормальная изменчивость важнейших признаков рачков *Daphnia magna* плодовитости и длины тела пока слабо изучена, хотя именно эти показатели используются в качестве основных в токсикологических экспериментах на рачках.

Цель и задачи исследований. Цель работы состояла в изучении токсичности растворенной формы сульфатного лигнина для водных животных. В связи с этим ставились следующие задачи.

1. Изучить нормальную изменчивость показателей "плодовитость" и "длина тела" ветвистоусых рачков *Daphnia magna*.

2. Определить диапазоны острой и хронической токсичности растворенного сульфатного лигнина для дафний, гаммарусов, планарий и рыб.

3. Определить недействующие концентрации растворенного сульфатного лигнина для дафний, гаммарусов, планарий и рыб.

4. Исследовать токсичность раствора сульфатного лигнина при длительном отстаивании методом биологического контроля.

Научная новизна. Впервые исследована токсичность растворенной формы сульфатного лигнина для водных животных. Проведен сравнительный анализ токсичности препаратов сульфатного лигнина хвойных и лиственных пород древесины. Впервые определены диапазоны острого и хронического действия сульфатного лигнина на водных животных: бычков-желтокрылок (*Cottocomephorus grewingki*); планарий (*Baicalobia guttata*); гаммарусов (*Eulimnogammarus cyaneus*); ветвистоусых рачков (*Daphnia magna*), для которых влияние лигнина изучено на пяти поколениях. Впервые изучена динамика токсичности для дафний раствора сульфатного лигнина хвойных и лиственных пород древесины при четырехмесячном отстаивании. Обнаружено двойственное действие водного раствора сульфатного лигнина: токсическое и ослабляющее токсичность химических соединений для гидробионтов. Впервые исследована динамика и статистическая природа плодовитости и длины тела *Daphnia magna* в норме.

Практическое значение. Выполняемая работа является частью исследований по теме 01Д. 01.02 "Исследования по установлению рыбохозяйственных и санитарно-гигиенических ПДК сульфатного лигнина сточных вод Архангельского, Соломбальского, Байкальского ЦБК". Исследования проводились лабораторией водной токсикологии Института экологической токсикологии ВНПОбумпром на основании решения Комиссии Президиума Совета Министров СССР по охране окружающей среды и рациональному использованию природных ресурсов "О нормах допустимых концентраций веществ в стоках Байкальского ЦБК" от 19.04.84. Материалы исследований вошли в отчеты Института экологической токсикологии ВНПОбумпром и послужили обоснованием ориентировочно безопасного уровня воздействия (ОБУВ) сульфатного лигнина для воды рыбохозяйственных водоемов. Разработан и апробирован табличный метод оценки патологий плодовитости и длины

тела дафний.

Апробация работы. Результаты работы обсуждались на 4-ой Межвузовской конференции молодых ученых (г. Иркутск, 1986); Всесоюзной конференции по биоиндикации и биотестированию природных вод (г. Ростов-на-Дону, 1986); заседаниях Иркутского отделения Всесоюзного научного общества токсикологов (г. Иркутск, 1987); заседании Южно-Байкальского отделения Всесоюзного гидробиологического общества (г. Байкальск, 1987); Всесоюзном семинаре по модельным видам водных беспозвоночных проекта 8-Б "Вид и его продуктивность в ареале" программы "Человек и биосфера" (п. Борок, 1987); 7-ой Всесоюзной конференции по химии и использованию лигнина (г. Рига, 1987).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на страницах машинописного текста, состоит из введения, пяти глав, выводов и заключения, иллюстрирована 11 рисунками и 30 таблицами. В списке литературы указаны 160 источников, в том числе 142 на русском и 18 на иностранных языках.

## ГЛАВА 1. ОПАСНОСТЬ ЛИГНИННЫХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ ВОДОЕМОВ

Лигнин представляет собой высокомолекулярное соединение ароматической природы. Различают три класса лигнинов: лигнин хвойной древесины, лиственной древесины и травянистых растений. Общей структурной единицей всех видов лигнина является фенилпропан. Различия в составе препаратов связаны с разным содержанием функциональных групп. Для лигнина лиственных пород свойственно большее содержание метоксильных групп.

В процессе сульфатной варки происходит деструкция лигнина. При этом в раствор переходят его фрагменты в виде макромолекул различного размера. В растворенной форме лигнин и поступает со сточными водами в водоемы тогда, как взвешенный лигнин практически весь улавливается на очистных сооружениях. В зависимости от условий варки и способов выделения лигнина широко варьирует его молекулярная масса: 10000 - 30000 (метод светорассеяния); 3000 - 73000 (метод ультрацентрифугирования).

Важнейшим свойством лигнина является его склонность к

реакциям конденсации, в процессе которых в макромолекуле становится больше прочных углерод-углеродных связей. Именно этой особенностью лигнина объясняется его высокая устойчивость к разрушению. В природных водоемах лигнин сточных вод разрушается примерно через 200 суток. В экспериментальных условиях за 10 месяцев разрушается до 30% исходного лигнина, за 20 месяцев - 50-60%. При разложении лигнина появляются токсичные низкомолекулярные продукты распада. Главные из них - фенолы, метанол и карбоновые кислоты.

Водоем представляет собой сложную систему, сохранение целостности которой зависит от состояния популяций организмов на различных трофических уровнях. При поступлении в водоемы лигнина, как и другие загрязняющие вещества, может оказать на них прямое токсическое воздействие или косвенное, изменяя санитарный режим водоема. В литературе отражены данные по токсичности растворенной формы лигнина лишь для некоторых компонентов экосистемы - для микроорганизмов, водорослей и частично для рачков. Но для рыб, бентосных организмов, серии поколений дафний токсичность лигнина не изучена.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Объем работ. Исследования по теме диссертации проводились в течение 1982-1989 гг. В опытах с дафниями было использовано 10332 экз., гаммарусами - 209 экз., планариями - 237 экз., рыбами - 200 экз. В опытах по биоконтролю за трансформацией сульфатного лигнина отобрано 1092 пробы на токсичность и 144 пробы - при определении цветности и pH растворов лигнина.

Физико-химическая характеристика образцов сульфатного лигнина и методика приготовления растворов лигнина. В экспериментах исследовали четыре образца сульфатного лигнина, выделенных из черного целлока от варки хвойной древесины на Байкальском целлюлозно-бумажном комбинате (БЦБК), Соломбальском целлюлозно-бумажном комбинате (СЦБК), Селенгинском целлюлозно-картонном комбинате (СЦКК) и из черного целлока от варки лиственной древесины на Архангельском целлюлозно-бумажном комбинате (АЦБК). Образцы, полученные по методике (Моисеева и

др., 1987); и способ их растворения были представлены нам сотрудниками лаборатории лигнина ВНИИ целлюлозно-бумажной промышленности ВНПОбумпром (г. Архангельск). В препаратах хвойных лигнинов (кроме лигнина ЦКК) содержится 11.7-11.85 % метоксильных групп, общих гидроксильных - 10.08-10.21 %; карбонильных - 5.06-8.2 %; фенольных гидроксидов - 5.25-6.32 %. В лиственном лигнине АЦБК содержание метоксильных групп составило 16.83 %; общих гидроксильных - 8.89%; карбонильных - 4.82 %; фенольных гидроксидов - 4.75 %. Средневесовой молекулярный вес препаратов составил 2000-2200; среднечисловой - 1000-1200; максимум полосы поглощения в УФ-области спектра - 284-290 нм.

Растворяли лигнин в байкальской и в онежской воде. Величина pH поверхностных вод открытого Байкала изменяется в пределах 7.6-8.5, содержание кислорода - 11-12 мг/л, при этом окисляемость - 1.59-2.2 мгО<sub>2</sub>/л, БПК<sub>5</sub> - 0.64-0.79 мгО<sub>2</sub>/л, цветность воды - 0-15 град. ХХШ. Химический состав воды Петрозаводской губы Онежского озера существенно иной: величина pH - 6.4-7.8, содержание кислорода - 10-12 мг/л, окисляемость - 8.1-25.3 мгО<sub>2</sub>/л, БПК<sub>5</sub> - 0.48 - 1.75 мгО<sub>2</sub>/л, цветность - 50-120 град. ХХШ.

1000 мг порошка лигнина выдерживали до полного растворения в течение 30 мин. в 50 мл 0.1н раствора едкого натра. Затем добавляли контрольную воду до объема 970 мл. Для доведения pH раствора до оптимальной величины (7-8) добавляли 30 мл 0.1н раствора соляной кислоты. В результате получали 1000 мл исходного раствора с концентрацией лигнина 1000 мг/л. Растворы, исследуемые в токсикологических опытах, получали путем разбавления исходного. Оптическую плотность растворов лигнина определяли на фотоэлектроколориметре (ФЭК-56) при длине волны 440 нм, цветность - по хромово-кобальтовой шкале (ХХШ), активную реакцию среды - на pH-метре 340.

Постановка экспериментов. Для оценки изменчивости плодовитости и длины тела дафний использовали данные наблюдения за токсичностью сточных вод Байкальского ЦБК (для чего применялась групповая посадка рачков с плотностью посадки 1 экз./20 мл), а также опыты с индивидуальной посадкой животных с плотностью посадки 1 экз./100 мл. Температура воды варьировала в

пределах 18 – 26°C. Концентрация корма (водоросли *Chlorella*) для дафний в опытных средах поддерживалась на уровне 10000 кл./мл в опытах с групповой посадкой и 100000 кл./мл – с индивидуальной. Дозы корма рассчитывали по прозрачности суспензии клеток водорослей согласно методикам (Побегайло и др., 1983; Калинин, 1990). Во всех токсикологических опытах с дафниями регистрировали период созревания, репродуктивный период (Т), суммарную плодовитость за репродуктивный период (Е), плодовитость ( $e = E/T$ ), длину тела дафний (L).

Токсичность растворов лигнина оценивали с использованием пробит-анализа (Прозоровский, 1976) и по табличному методу (Прозоровский и др., 1980). Продолжительность острых опытов составила 24–120 часов. Хронические опыты проводили согласно Методикам биологических исследований по водной токсикологии (1971), Методическим указаниям ГосНИОРХа (Лесников, 1975) и Методическим рекомендациям ВНИРО (1985). Продолжительность хронических опытов составила от 30 до 150 суток. Токсикологические эксперименты вели на ветвистоусых рачках, гаммарусах, планариях, бычках-желтокрылках. По шкале Л.А. Лесникова (1971) оценивали состояние гонад и яиц, кишечника и жирового тела дафний. Регистрировали выживаемость и поведенческие реакции гаммарусов, планарий и рыб. Проводили гематологический анализ, определяя количество эритроцитов, лейкоцитов и концентрацию гемоглобина в крови рыб, а также гистологическое обследование органов рыб: жабр, печени, почек, сердца, селезенки, кожных покровов (Кокуричева, 1976).

Биологический контроль токсичности растворов лигнина проводили по методике ГосНИОРХа (Лесников, 1979). Исследовали растворы лигнина БЦБК, СЦБК и АЦБК с исходными концентрациями 400, 500 и 600 мг/л на протяжении 125 суток; СЦКК с концентрациями 100, 141, 213 и 284 мг/л – на протяжении 67 суток. Опыт с концентрацией лигнина СЦКК 284 мг/л был поставлен в двух вариантах: с аэрацией раствора воздухом в течение всего опыта и без нее. Исходные объемы растворов составили 1 л. Пробы отбирали в первую неделю опыта – каждый день, затем – три раза в неделю. В пробы помещали однодневных дафний и регистрировали смертность в течение 24, 48 и 72 часов.

Методы математической обработки. При обобщении резуль-



татов экспериментов использовали лимит варьирования, дисперсию и коэффициент вариации, методы корреляционного и регрессионного анализа, а также автокорреляционную функцию, метод скользящей средней и компонентный анализ (Девис, 1977); для изучения распределения признаков использовали критерий хи-квадрат, а для сравнения средних – критерий Стьюдента (Лакин, 1980), таблицы гематологических показателей бычка-желтокрылки (Яхненко, 1984), границы нормы *Daphnia magna* (Калинкина, Коросов, 1987). Расчеты проводились на ПЭВМ IBM PC-AT.

### ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ НОРМАЛЬНОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ПРИЗНАКОВ ВЕТВИСТОУСНЫХ РАЧКОВ *Daphnia magna*

Границы изменчивости признаков организмов являются необходимыми критериями при оценке значительности отклонений показателей животных, находящихся под действием токсиканта, от контроля (Методы определения токсичности и опасности химических веществ, 1970). В связи с этим были изучены характер многолетней динамики признаков – длины и плодовитости дафний, связь этих колебаний с изменяющимися факторами среды, закон распределения признаков, зависимость статистических параметров друг от друга и от условий эксперимента.

На протяжении рассмотренного нами семилетнего периода средние величины плодовитости и длины тела дафний, отбираемых из большой культуры, относительно плавно изменялись от месяца к месяцу. Мелкие дафнии (до 3.25 мм) с малой плодовитостью (до 0.6 экз./1 самку в сут.) постепенно сменялись крупными рачками (до 4.3 мм), имеющими высокую плодовитость (до 4 экз./1 самку в сут.). Как показал статистический анализ, средние значения плодовитости и длины тела не были связаны с сезонными изменениями среднемесячной температуры воды (в диапазоне 20.5–24° С) и продолжительностью светового дня для 52 град. северной широты (г. Байкальск), поскольку коэффициенты корреляции были не велики и не достоверны (соответственно -0.19 и -0.17 для плодовитости; 0.01 и -0.11 для длины тела).

Расчет автокорреляционной функции выявил волнообразный характер изменения средней плодовитости. Максимум функции ( $r=0.42$ ,  $p<0.05$ ) был вычислен при смещении ряда наблюдений на

один месяц. При увеличении сдвига коэффициенты корреляции уменьшались, достигая экстремального значения ( $r=-0.21$ ) при длине лага восемь месяцев.

Наблюдаемый процесс изменения плодовитости и длины приводит к заключению о непостоянстве нормы. Действительно, для средней плодовитости 3.03 экз./1 самку в сут. пределы варьирования индивидуальной плодовитости составили 1.35-3.8, для средней плодовитости 5.3 пределы составили 4.1-6.3 и т.д. На каждой отдельной фазе динамики плодовитости и длины нормальная ее изменчивость существенно ниже, чем за весь период наблюдений. Более того, дисперсия признаков была примерно постоянной для любой средней плодовитости и длины - в среднем 0.641 экз./1 самку в сутки для плодовитости и 0.116 мм для длины тела. Коэффициенты корреляции между дисперсией и средней арифметической выборки были не достоверны ( $p=30$ ) и составили 0.26 (для плодовитости) и -0.147 (для длины тела). При этом распределение признаков "плодовитость" и "длина тела" как в целом, так и на каждой фазе динамики подчиняется нормальному закону ( $p=0.05$ ).

Эти данные дают возможность рассчитать таблицу нормальных значений плодовитости и длины тела. Интервалы индивидуальной изменчивости были рассчитаны по формуле  $M \pm 2SS$ , где  $M$  - средняя,  $SS$  - стандартное отклонение выборки. Поскольку между дисперсией и средней арифметической выборки нет зависимости, то основой для расчета интервала индивидуальной изменчивости для любого уровня средней арифметической послужила средняя дисперсия каждого признака. Эта величина для плодовитости составила  $M \pm 1.28$  экз./1 самку в сут., для длины -  $M \pm 0.232$  мм.

Приведенные интервалы представляют собой характеристику пределов нормальной индивидуальной изменчивости признаков. Для расчета пределов изменчивости средних величин (доверительный интервал) используют формулу  $M \pm 2\sigma$ , где  $\sigma$  - оценка статистической ошибки средней. Если же ставить целью сравнение средних выборочных значений признаков опытных и контрольных животных, то можно воспользоваться конструкцией критерия Стьюдента и построить такой доверительный интервал по формуле  $M \pm 2\sqrt{\sigma_k^2 + \sigma_0^2}$ , в которую входят значения ошибки средней признаков интактных животных ( $\sigma_k$ ) и животных, подвергавшихся

действием токсикантов (по). Для оценки последней была исследована дисперсия признаков интоксцированных животных. Оказалось, что при обнаруженных первых достоверных изменениях средних значений плодовитости и длины тела дафний под действием токсических веществ характер изменчивости признаков сохраняется, при этом разность средних арифметических контрольной и опытной группы не коррелирует с разностью дисперсий признаков из этих групп - коэффициенты корреляции были не достоверны (при стимуляции  $r = 0.33$  и  $r = -0.08$ ; при депрессии  $r = 0.04$  и  $r = -0.01$  соответственно для плодовитости и длины тела). Поэтому мы посчитали возможным приравнять дисперсию и ошибку контрольной группы к дисперсии и ошибке опытной группы и рассчитать интервалы варьирования средних по формуле  $M \pm 2\sqrt{2} \text{ мк}^2$ . Для плодовитости обобщенный доверительный интервал составил  $M \pm 0.57$  экз./1 самку в сут., для длины -  $M \pm 0.104$  мм.

Это значит, что при средней плодовитости животных из контроля, равной  $M_k = 3$  экз./1 самку в сут., достоверное отличие средних значений плодовитости животных из опыта  $M_o$  будет наблюдаться, если разность между ними ( $M_o - M_k$ ) составит более  $0.57$  экз./1 самку в сут., т.е. выйдет за границы интервала  $2.43-3.57$  экз./1 самку в сут.; для контрольного значения  $M_k = 2$  экз./1 самку в сут. эти границы составят  $1.43-2.57$  экз./1 самку в сут. Особо отметим, что эти оценки относятся к выборкам, в которых число как опытных, так и контрольных животных составило по 10 экз.

Так как реальные хронические эксперименты на дафниях продолжаются 30 суток, а период созревания дафний варьирует от 6 до 10 дней, то продолжительность репродуктивного периода рачков в опытах составляет 20-24 дня. Найденные интервалы плодовитости для различных уровней средней протабулировали для разных репродуктивных периодов, в результате чего получили таблицу нормальной изменчивости плодовитости дафний, в полном варианте которой приведены пределы индивидуальной изменчивости и доверительные интервалы средней плодовитости в норме (табл.).

Таблица

Границы изменчивости (доверительные интервалы)  
средней плодовитости *Daphnia magna*, экз.

Уровень плодовитости	Репродуктивный период, сут.				
	20	21	22	23	24
минимум	29	30	31	33	34
средняя	40	42	44	46	48
максимум	51	54	57	59	62
минимум	69	72	75	79	82
средняя	80	84	88	92	96
максимум	91	96	101	105	110

Приведенная таблица может быть использована для оценки достоверности различий между плодовитостью интактных и интоксигированных дафний. Для чего необходимо:

- по данным контрольного эксперимента определить репродуктивный период рачков и среднее значение плодовитости одной самки за этот период (для  $n=10$ );

- по таблице найти соответствующие границы доверительного интервала для данного среднего значения плодовитости и репродуктивного периода;

- сопоставить средние значения плодовитости для группы животных, подверженных действию токсикантов, с найденными в таблице границами нормы. Средние значения плодовитости, лежащие вне границ доверительного интервала, достоверно отличаются от средних нормальных и соответствуют патологическому состоянию организмов.

Результаты 47 токсикологических опытов обрабатывали описанным выше табличным методом и с применением критерия Стьюдента. Оказалось, что в 46 случаях оба метода показали одинаковые результаты. В одном случае нашли расхождение в результатах, что связано с гибелью в группе интоксигированных животных и, как следствие, увеличением ошибки при расчете по критерию Стьюдента. Поэтому в отличие от табличного метода критерий Стьюдента не выявил достоверности различий между па-

раметрами животных из контрольной и опытной группы. Применение табличного метода демонстрирует большую экономичность расчетов, корректность и адекватность выводов.

#### ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ЛИГНИННЫХ ВЕЩЕСТВ

Оценку токсичности сульфатного лигнина для водных животных проводили в краткосрочных и хронических экспериментах. Определение параметров острой токсичности вещества, т.е. концентраций, вызывавших гибель 50% организмов при краткосрочных экспозициях (2-4 дня), позволяет сравнить токсичность различных веществ и классифицировать их по степени опасности для водных организмов. На следующем этапе, в хронических опытах при длительном действии поллштанга (до нескольких месяцев) выявляются концентрации вещества, негативно влияющие на общее состояние организмов. Диапазоны хронического действия служат характеристикой опасности веществ, в течение долгого времени поступающих в водоемы, таких как, например, компоненты сточных вод различных видов производств. Безвредные концентрации для различных видов гидробионтов, определенные в длительных экспериментах, являются основой установления стандарта качества для воды водоемов, принимающих сточные воды (Строганов, 1971; Лесников, 1979).

В острых опытах с дафниями определили среднесмертельные концентрации сульфатного лигнина четырех видов производств (БЦБК, СЦБК, АЦБК и СЦКК), которые варьировали в пределах 163-312 мг/л. Для гаммарусов среднесмертельные концентрации хвойного сульфатного лигнина БЦБК и СЦБК составили 650 мг/л. Лиственный сульфатный лигнин АЦБК не оказал токсического действия на гаммарусов в диапазоне концентраций 100-1000 мг/л в течение даже девяти суток. Для планарий среднесмертельные концентрации лигнина БЦБК, СЦБК и АЦБК варьировали в пределах 178-410 мг/л; бычков-желтокрылка - 224-890 мг/л. Наиболее устойчивыми к действию сульфатного лигнина оказались гаммарусы. Среднесмертельные концентрации для всех животных лежат в одном диапазоне от 100 до 1000, что позволяет отнести сульфатный лигнин различных видов производств к одному классу малотоксичных веществ согласно классификации Л.А. Лесникова и

К.К. Врочинского (1979).

В хронических опытах с дафниями исследовали действие растворов лигнинов БЦБК, СЦБК и АЦБК с концентрациями 1; 50; 100; 150 и 200 мг/л на пяти поколениях; СЦКК с концентрациями 1; 10; 50 и 100 мг/л - на четырех. Образцы лигнина БЦБК, СЦБК, АЦБК и СЦКК в диапазоне концентраций 1-50 мг/л не влияли на выживаемость, частоту линьки, сроки созревания, показатели общего состояния рачков к концу опыта. Действие лигнина проявилось в изменении суммарной плодовитости и длины тела дафний. При концентрации 1 мг/л плодовитость дафний в большинстве опытов (11 из 19) и длина тела (в 14 опытах из 19) находились в пределах диапазонов нормальной изменчивости. Лишь во втором и четвертом поколениях в опытах с лигнинами БЦБК, СЦБК и АЦБК, в исходном поколении в опыте с лигнином АЦБК и третьем поколении в опыте с лигнином СЦКК средняя плодовитость превысила верхнюю границу диапазона нормальной изменчивости на 4-27%. Средняя длина тела рачков второго и четвертого поколения в опыте с лигнином БЦБК, второго поколения в опыте с лигнином СЦБК, исходного поколения в опыте с лигнином АЦБК и третьего поколения в опыте с лигнином СЦКК отклонилась за верхнюю границу нормы на 2-6%. При концентрации лигнина СЦКК 10 мг/л плодовитость и длина тела рачков исходного поколения были в границах нормы, а плодовитость трех последующих превысила верхнюю границу нормы на 7-32%, длина тела - на 2-4%. При концентрации четырех образцов лигнина 50 мг/л плодовитость и длина тела рачков всех исследованных поколений превысили верхнюю границу нормы на 9-77% и 2-13% соответственно.

Таким образом, при концентрациях 1-50 мг/л наблюдается все возрастающий эффект увеличения среднего размера тела дафний и связанной с ним плодовитости. Это вызвано, очевидно, улучшением кормовой базы дафний за счет развития сапрофитной микрофлоры при отсутствии явного токсического эффекта.

При 100-150 мг/л длина тела дафний все еще возрастает на 2-27% по сравнению с верхней границей нормы, но часть яиц погибает и сбрасывается вместе с панцирями. В растворах с концентрациями 200 мг/л гибель яиц дафний носит массовый характер, что вызывает отклонение плодовитости за нижнюю границу

нормы на 14-37%. Хотя размеры дафний все еще увеличиваются на 5-11% относительно верхней границы диапазона нормальной изменчивости. Приведенные данные свидетельствуют, что при концентрациях выше 50 мг/л (100, 150, 200 мг/л) начинается проявление токсического действия лигнина (гибель яиц).

Лучшей иллюстрацией проявления токсического эффекта на плодовитости может стать экстраполяция ожидаемых значений плодовитости в диапазоне 100-200 мг/л, полученная на уравнении для диапазона 0-50 мг/л. В диапазоне концентраций 0-50 мг/л, например, сульфатного лигнина АЦБК зависимость плодовитости (E) от длины тела (L) дафний исходного поколения описывается уравнением вида:  $Y = 0.732 * X^{3.586}$  (n = 28, p < 0.05)

Рассчитанные по уравнению значения плодовитости, вычисленные по значениям длины тела при концентрациях 0, 1, 50, 100 и 150 мг/л равны 87, 109, 127, 141 и 142 экз./1 самку тогда, как реальные значения - 81, 115, 131, 109 и 45 экз./1 самку. Таким образом, при концентрациях сульфатного лигнина 100-200 мг/л наблюдаемая зависимость плодовитости от длины тела нарушается, в чем проявляется угнетающее действие лигнина на плодовитость, но не на размеры рачков.

По результатам хронических опытов на дафниях исследованные концентрации сульфатного лигнина классифицировали следующим образом: 1 мг/л - недействующая на рачков; 10 мг/л - вызывающая начальные сдвиги показателей плодовитости и длины тела за пределы нормальной изменчивости (пороговая); 50 мг/л - действующая на плодовитость и длину тела (стимуляция); 100-200 мг/л - угнетающие жизнедеятельность рачков (гибель молоди).

Для гаммарусов диапазон недействующих концентраций образцов хвойного лигнина БЦБК и СЦБК в длительных экспериментах составил 1-10 мг/л, листовного лигнина АЦБК - 1-400 мг/л. В этих концентрациях препараты лигнина не влияли на выживаемость и поведенческие реакции бокоплавов. В растворах хвойных лигнинов с концентрацией 100 мг/л гибель животных составила 25-75%; с концентрациями 400-500 мг/л - 100%. Листовный лигнин вызвал частичную гибель (25%) к концу хронического опыта лишь при концентрации 1000 мг/л. Для гаммарусов лигнин хвойных пород оказался значительно токсичнее лигнина

лиственных пород.

В хроническом опыте препараты лигнинов хвойных (БЦБК и ЦЦБК) не влияли на планарий в диапазоне концентраций 0.1-10 мг/л, а лиственного лигнина АЦБК - 0.1-100 мг/л. В указанных средах выживали все планарии, поведенческие реакции животных оставались в норме. Токсичными при длительном воздействии оказались концентрации хвойных лигнинов 100-200 мг/л и концентрация лиственного лигнина 200 мг/л. В данных опытных средах погибло 10-100% животных.

В длительных опытах с рыбами были исследованы концентрации 0.1; 1 и 10 мг/л. Все они не действовали на бычков-желтокрылок. В течение опыта рыбы были активны, выживаемость была на уровне контроля. Количество эритроцитов, лейкоцитов и концентрация гемоглобина в крови рыб достоверно ( $p > 0.05$ ) не отличались от контрольных (за исключением единичного случая достоверного уменьшения числа эритроцитов у рыб из растворов с концентрацией 1 мг/л лигнина БЦБК) и соответствовали показателям природной нормы для бычков-желтокрылок.

При проведении гистологического анализа органов рыб ожидали изменения, которые свидетельствовали бы об угнетенном состоянии животных: набухание респирационного эпителия жаберных лепестков, увеличение кровенаполнения органов, некроз гепатоцитов. Однако патологических отклонений в состоянии жабр, печени, почек, сердца, селезенки и кожных покровов найдено не было.

По результатам хронических экспериментов концентрация сульфатного лигнина 1 мг/л является недействующей на все виды тест-объектов. Концентрация 10 мг/л является пороговой по показателям плодовитость и длина тела дафний и недействующей на гаммарусов, планарий и рыб. Поэтому в качестве ориентировочно-безопасного уровня воздействия (ОБУВ) сульфатного лигнина для воды рыбохозяйственных водоемов рекомендовали диапазон концентраций 1-10 мг/л.

Для условий естественного водоема важно было бы возможную токсичность воды, загрязненной лигнинными веществами, оценить по ее цветности. Мы располагали серией образцов раствора лигнина четырех предприятий, для которых исследовали связь цветности и токсичности для дафний растворов разных



концентраций. Для каждого отдельного образца, естественно, со снижением концентрации при разбавлении снижалась и цветность и токсичность ( $r = 0.82$  и  $r = 0.84$ ). Однако, в растворах разных образцов с равными концентрациями их токсичность была тем выше, чем ниже была цветность ( $r = -0.53$ ,  $p < 0.05$ ). Следовательно, у нас нет оснований для простого прогноза токсичности по цветности раствора в любом случае, поскольку свойства лигнина, сбрасываемого одним и тем же предприятием изменяются. Общую регрессионную модель для прогноза токсичности по цветности для всех образцов лигнина построить нельзя.

## ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСФОРМАЦИИ СУЛЬФАТНОГО ЛИГНИНА

Высокая устойчивость лигнина к разрушению может привести к накоплению этого вещества в воде в концентрациях, опасных для водных организмов. Чтобы оценить биологический эффект аккумуляции лигнина в водоеме, нами исследована динамика токсичности его растворов при длительном отстаивании.

По данным Н.Ф.Комшилова и соавторов (1978), сразу после растворения сульфатного лигнина в щелочной среде образуется несколько фракций: макромолекулы сульфатного лигнина с молекулярным весом около 10000 и 3000, а также низкомолекулярные продукты деструкции лигнина (алифатические и ароматические соединения). В течение первых 80 суток в процессе реакции конденсации к макромолекуле лигнина присоединяются низкомолекулярные продукты распада, что приводит к увеличению молекулярного веса лигнина первой фракции. При этом менее прочные углерод-кислородные связи разрушаются, процентное содержание более прочные углерод-углеродных связей возрастает, что обуславливает высокую устойчивость лигнина к разрушению. Спустя около 200 суток после начала опыта начинается деструкция макромолекулы, т.е. рост числа фракций, уменьшение ее молекулярного веса и уменьшение оптической плотности раствора.

Очевидное отличие химических свойств фракций позволяет предположить их различную роль в формировании токсичности раствора лигнина. Опыт с длительным отстаиванием позволяют исследовать токсичность растворов при разном соотношении низко- и высокомолекулярных соединений на начальных и конечных

стадиях деструкции.

По данным экспериментов с отстаиванием растворов лигнина можно констатировать общее снижение их токсичности. Растворы хвойного сульфатного лигнина БЦБК и СЦБК с исходными концентрациями 400, 500 и 600 мг/л вызывали гибель дафний в течение длительного времени (30-77 суток). Для первых 10-20 суток характерна высокая токсичность: смертность дафний доходила до 50-100%. Далее происходит резкое уменьшение смертности, которая поддерживается на уровне 20-50% в продолжение следующих 20-40 суток в зависимости от исходной концентрации лигнина. Наконец, по истечении 30-80 суток и до конца эксперимента (125 суток) гибели дафний в пробах не наблюдается. При сохранении описанной общей картины токсичность растворов сильно изменялась от пробы к пробе, вследствие чего кривая смертности дафний имела характерную пилообразную форму.

Токсичность растворов лигнина БЦБК и СЦБК с различными исходными концентрациями (400, 500 и 600 мг/л) увеличивалась и уменьшалась синхронно, что свидетельствует о сходстве процессов трансформации лигнина, протекающих в растворах с разными концентрациями. Тесную корреляцию показателей смертности дафний в пробах различных растворов позволил выявить метод главных компонент. Высокие значения весовых коэффициентов первой компоненты (0,98-1,0) указывают на хронологическую согласованность, совпадение в изменениях химических свойств раствора лигнина с различной исходной концентрацией.

Для хвойного лигнина СЦБК с исходными концентрациями 141, 213 и 284 мг/л периоды сохранения токсичности составили соответственно 13, 26 и 43 дня. Растворы с исходной концентрацией 100 мг/л вообще не вызывали гибели дафний в течение всего периода наблюдения (66 суток). Аэрация уменьшала сроки сохранения токсичности растворов почти в три раза: растворы (284 мг/л) стали безвредными за 15 суток вместо 43 дней.

В отличие от растворов лигнинов хвойных растворы листового лигнина АЦБК теряли свою токсичность очень быстро. При исходной концентрации 600 мг/л полная гибель рачков произошла в первый день опыта, а затем лишь изредка наблюдалась гибель 1-2 особей в группе из 10 животных. При исходных концентрациях 400 и 500 мг/л в пробах раствора значительной

смертности (более 30%) не происходило. В нескольких пробах на протяжении всей 125-суточной экспозиции произошла гибель 1-3 из 10 экземпляров.

Для выяснения причин изменения токсичности растворов лигнина при отстаивании была прослежена динамика величины pH и цветности растворов. Величина активной реакции среды растворов лигнинов хвойных и лиственного изменялась в течение опыта в пределах 7,55-8,74 и не коррелировала со смертностью дафний в пробах (коэффициенты корреляции от 0,1 до 0,33).

Цветность растворов лигнинов хвойных с начала опыта была весьма высокой, принимая значения от 668 до 3920 град. ХКШ. в зависимости от исходной концентрации, и в течение опытов слабо повышалась до 675-4725 град. Показатели цветности и токсичности (смертность дафний) раствора лигнина, изменяясь параллельно, сильно коррелировали друг с другом. Коэффициенты корреляции между ними для разных лигнинов имели значения от -0,69 до -0,98 и были достоверны ( $p < 0,05$ ). В опытах с растворами лиственного лигнина эта закономерность отсутствует.

После отстаивания растворов лигнинов хвойных до полной детоксикации (от 14 до 41 суток) исследовали их способность изменять токсичность свежеприготовленных растворов этих же лигнинов. Если в качестве разбавителя использовали воду, то среднесмертельная концентрация (CL50) составила 205-304 мг/л. Использование в качестве разбавителя витального (отстояного) раствора лигнина более, чем на 50% повышало этот показатель: CL50 была равна 340-447 мг/л. Токсичность лигнина снижалась (среднесмертельные концентрации увеличивались на 30-100%) и при замене байкальской разбавляющей воды на онежскую. Оценки параметров токсичности растворов лигнина БЦБК и АЦБК для дафний находились в диапазоне 171-201 мг/л (байкальская вода) и 224-515 мг/л (онежская вода).

Эти данные соответствуют химической модели водного раствора лигнина, согласно которой в нем присутствуют по крайней мере две компоненты. Одна из них (макромолекула сульфатного лигнина) придает цветность раствору, другая (низкомолекулярные продукты распада макромолекулы) обуславливает токсические свойства. С течением времени в процессе отстаивания постоянно идущие процессы деструкции и конденсации обуславливают зако-

номерную изменчивость токсичности, которая уменьшается до нуля, когда все продукты трансформации исчезли (конденсировались, присоединились к макромолекуле). Это влечет за собой увеличение молекулярной массы и связанное с ним увеличение цветности раствора. Снижение токсичности сульфатного лигнина при смене разбавителя можно связать с различием в химическом составе разбавляющей воды. В онежской воде выше содержание органических веществ и цветность, чем у байкальской. Видимо, при детоксикации свежеприготовленного раствора лигнина происходила сорбция токсических компонентов органическим веществом отстояного раствора лигнина.

Наблюдаемые отличия в динамике смертности дафний в пробах растворов хвойного и лиственного лигнина вполне объяснимы особенностями химического строения макромолекулы лигнина разных типов. Для лиственного лигнина характерно большее количество метоксильных групп и, следовательно, большее число более слабых углерод-кислородных связей. По-видимому, с этим связана его меньшая токсичность и быстрая потеря токсических свойств в результате меньшей стабильности.

Растворенный лигнин в течение длительных сроков сохраняет свою токсичность, что обуславливает опасность лигнина для водоемов.

## ВЫВОДЫ

1. Сульфатный лигнин хвойных и лиственных пород древесины, выделенный из черного щелока сульфатцеллюлозных производств, является малотоксичным веществом для дафний, гаммарусов, планарий и рыб. Параметры острой токсичности сульфатного лигнина лежат в диапазоне 100-1000 мг/л.

2. Исследование влияния раствора сульфатного лигнина на дафний, гаммарусов, планарий и рыб позволяет предложить для рыбохозяйственных водоемов ориентировочный безопасный уровень воздействия (ОБУВ) сульфатного лигнина - 1-10 мг/л.

3. Сульфатный лигнин не одинаково опасен для исследованных тест-объектов. Наименее устойчивы дафнии и планарии, более устойчивы рыбы, затем - гаммарусы.

4. Сульфатный лигнин хвойных пород является более

токсичным веществом, чем лигнин лиственных пород. Максимально недействующие концентрации образцов лигнина из хвойных пород для всех исследованных видов животных составили 10 мг/л, лигнина лиственных пород – 400, 100 и 10 мг/л для гаммарусов, планарий, рыб и дафний соответственно.

5. Действие растворенного лигнина в концентрациях 10-200 мг/л приводит к увеличению длины тела дафний. Связанная с размерами плодовитость увеличивается в диапазоне концентраций 10-50 мг/л, но уменьшается при больших концентрациях.

6. При отстаивании токсичность растворов хвойного лигнина с равными исходными концентрациями (600 мг/л) сохраняется в течение 60-80 суток, лиственного лигнина – 3 суток. Скорость детоксикации увеличивается при аэрации растворов.

7. Наблюдаемые изменения токсичности и окраски при отстаивании раствора лигнина соответствуют химической модели взаимодействия крупной молекулы, определяющей окраску раствора, и небольших молекул, обуславливающих токсичность.

8. В культуре ветвистоусых рачков происходит постоянное плавное изменение плодовитости и длины тела. Эти колебания не связаны с сезонной изменчивостью температуры воды и продолжительностью светового дня.

9. Применение таблицы диапазонов нормальной изменчивости плодовитости и длины тела дафний при обработке результатов токсикологических экспериментов показало ее эффективность и большую экономичность по сравнению с общепринятым критерием Стьюдента.

#### Список публикаций по теме диссертации

1. Калинкина Н.М., Коросов А.В. Интерпретация результатов токсикологических экспериментов в опытах на дафниях // Биомониторинг и биотестирование природных вод (Тез. докл. к Всесоюз. конф., Ростов-на-Дону, 30 сент.-4 окт., 1986). - Ростов-на-Дону, 1986. - С. 99-100.

2. Калинкина Н.М. Изучение детоксикации лигнинных веществ в модельных водоемах биологическим методом контроля. // 4-ая межвузов. конф. молодых ученых. Тез. докл. Иркутск, 1986. - С. 60-61.

3. Бейм А.М., Зоммер Е.А., Калинкина Н.М., Королева Л.А., Ян Н.А., Гребенкина Л.А. Токсикологический скрининг лигнинных веществ//7-ая Всесоюз. конф. по химии и использованию лигнина. Тез. докл. - Рига, 1987. - С.158.

4. Калинкина Н.М., Коросов А.В. Оценка естественных колебаний плодovitости в культуре *Daphnia magna* Sträus// Биология внутренних вод (инф.бюллетень). - Л.:Наука, 1988. - N78. - С.25-28.

5. Калинкина Н.М., Гребенкина Л.А., Доржиева А.Н. Токсичность препаратов сульфатного лигнина из хвойных и лиственных пород деревьев для некоторых видов водных организмов//Некоторые актуальные вопросы современной биологии. Тез. докл. - Ярославль, 1988. - С. 14-16.

6. Калинкина Н.М. Исследование показателей нормы лабораторной культуры *Daphnia magna*//5-ая Всесоюз. конф. по водной токсикологии. Тез. докл. - Одесса, 1988. - С.122.

7. Калинкина Н.М., Бейм А.М., Зоммер Е.А. Токсикология лигнинных веществ//5-ая Всесоюз. конф. по водной токсикологии. Тез. докл. - Одесса, 1988. - С. 123.

8. Зоммер Е.А., Ян Н.А., Королева Л.А., Калинкина Н.М., Дидоренко С.И., Морошенко Г.Г., Доржиева А.Н., Синева Л.Н., Деревцова Ф.И., Сергиенко Г.А. Экологическая токсикология лигнинных веществ. Байкальск, 1989. - 35 с.

9. Калинкина Н.М. Экспресс-метод определения численности клеток водорослей в культуре// Актуальные проблемы биологии и рационального природопользования. Тез. докл. - Петрозаводск: Изд-во Кар.НЦ СССР, 1990. - С.40-41.

10. Калинкина Н.М. Токсичность лигнинных веществ и зависимость их от региональных особенностей состава воды//Проблемы экологической химии и токсикологии в охране природы. Тез. докл. - Байкальск, 1990. - С.36-37.

Жаппик