

БИОТЕСТИРОВАНИЕ ПОДЗЕМНЫХ И ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД В РАЙОНЕ ХРАНИЛИЩА ОТХОДОВ ЯДЕРНОГО ПРОИЗВОДСТВА

С.В. Пяткова, Е.В.Бахвалова, Е.И.Егорова, Г.В.Козьмин

*Обнинский государственный технический университет атомной энергетики,
г.Обнинск*



Цель работы – биологическая оценка качества подземных и поверхностных вод в районе хранилища РАО и сброса сточных вод предприятия атомной энергетики ГНЦ РФ-ФЭИ. В качестве тест-объектов использовались гидробионты разных систематических групп: водоросли *Chlorella vulgaris*; инфузории *Spirostomum ambiguum*; ракообразные *Daphnia magna* Straus, а также высшее растение – лук *Allium cepa*. Результаты тестирования воды в районе сброса сточных вод ФЭИ и расположения хранилища РАО продемонстрировали, что вода оказывает негативное действие на функционирование, выживаемость и генетическую стабильность тест-объектов. Показана необходимость проведения регулярного физико-химического и биологического мониторинга водной среды из критических точек зоны наблюдения для оценки экологического благополучия региона.

Для анализа состояния природных сред, в том числе подвергающихся хроническому антропогенному воздействию, порой важно знать не только содержание поллютантов в воздухе, воде, почве, донных отложениях или живых организмах, но и изменения жизненно важных параметров наиболее чувствительных к такому воздействию представителей биоты. В подобных исследованиях важно не дифференцирование загрязнений, а оценка их совместного действия на экосистему по интегральным показателям ответных реакций живых организмов на загрязнение среды их обитания. Результаты биотестирования позволяют выявить критические ситуации и являются необходимыми для получения объективной информации в целях разработки мероприятий по уменьшению влияния загрязнения на окружающую среду [1, 2].

Представленная работа выполнена летом и осенью 2005 г. в ходе комплексного обследования состояния подземных вод, выходы которых расположены в нижней части склона под хранилищем радиоактивных отходов (РАО) ГНЦ РФ-Физико-энергетический институт (ФЭИ) г.Обнинска и воды р.Протвы в районах сброса очистных сооружений данного предприятия [3].

Захоронения РАО находятся за промплощадкой ГНЦ РФ-ФЭИ и примыкают к территории городских очистных сооружений. Заполнение траншей хранилища производилось в 1954–1961 гг. Во время эксплуатации хранилище было единственным в Центральном регионе, куда отходы свозили из организаций городов Москвы и Ленинграда. Часть траншей выполнена из бетона (емкости № 2, 3 и 4), емкость № 1 –

земляная (рис. 1). После заполнения РАО они были перекрыты железобетонными плитами и обвалованы грунтом высотой до 1 м. Хранилище является законсервированным и находится за пределами охраняемой зоны предприятия. Сооружение обнесено железобетонным ограждением.

Контроль за миграцией радионуклидов в окружающую среду проводится отделом радиационной безопасности и охраны окружающей среды (РБ и ООС) ГНЦ РФ-ФЗИ путем отбора проб грунтовых вод из наблюдательных скважин, расположенных на территории хранилища, с периодичностью 2 раза в год. Результаты многолетних наблюдений уровней активности радионуклидов в наблюдательных скважинах хранилища с 1961 по 1998 гг. соответствовали фоновым значениям активности естественных радионуклидов. Впервые значительное увеличение активности (от десятых долей Бк/л до 40 Бк/л в октябре 1998 г., а затем и до 100 Бк/л в январе – мае 1999 г.) было отмечено при отборе проб воды в районе емкости № 4. Проведенные гамма- и бета-спектрометрические измерения показали, что радиоактивность воды обусловлена ^{90}Sr [4].

Весна–начало лета 2005 г. характеризовались повышенным количеством атмосферных осадков, в результате чего в нижней части склона непосредственно под хранилищем сформировались выходы подземных вод – верховодки. Одним из дополнительных источников грунтовых вод могут быть аэротэнки городских очистных сооружений, из трещин которых сточные воды поступают в грунт и, следуя общему уклону местности, движутся через нижнюю часть территории хранилища. Постоянное наличие воды в грунте под хранилищем способствует преждевременному разрушению емкостей для хранения твердых радиоактивных отходов (ТРО) и выносу радионуклидов за пределы хранилища с последующим распространением их в окружающей среде.

ФЗИ имеет три выпуска промышленных сточных вод в р. Протву, общим объемом сброса примерно 25000 тыс. м³/год (0,8 м³/с) с учетом сброса сточных вод очистных сооружений г.Обнинска. Режим выпуска и сбросов по расходу воды во всех точках постоянный.

Впервые радиоактивное загрязнение Протвы выявлено в 1989–1990 гг. Было ус-

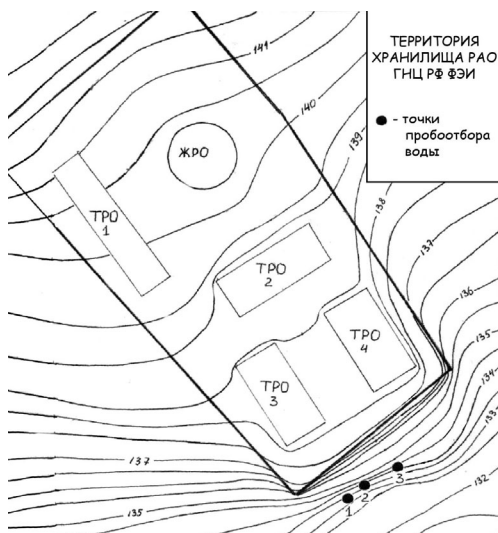


Рис. 1. Карта-схема точек пробоотбора воды верховодки в районе хранилища РАО

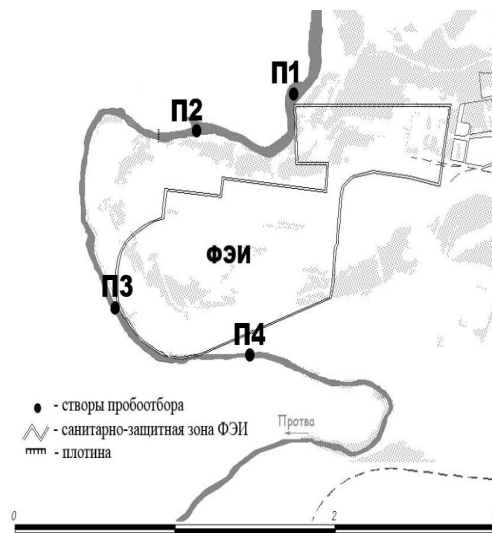


Рис. 2. Карта-схема точек пробоотбора воды р. Протвы

тановлено, что на протяжении 70 км от промстоков ФЭИ до устья иловые отложения Протвы загрязнены радионуклидами ^{137}Cs и ^{134}Cs [4]. Участки наибольшего загрязнения выявлены непосредственно у промстоков ФЭИ. Площадь загрязнения превышала 1000 м² при мощности дозы гамма-излучения до 1200 мкР/ч. Содержание ^{134}Cs в донных отложениях составляло до $7,8 \cdot 10^{-8}$ Ки/кг. По мере удаления от источника концентрация радионуклидов убывала. В 1989 г. были проведены работы по удалению радиоактивного ила.

Нерадиоактивные загрязняющие вещества поступают в сточные воды промышленной канализации от системы химической водоподготовки котельной. Анализ многолетних данных показал превышение в сточных водах предельно допустимого сброса (ПДС) взвешенных веществ, хлоридов, сульфатов, аммонийного азота, нитратов и нитритов, хрома, железа, меди, цинка и СПАВ [4]. Суммарная активность сточных вод определяется в основном продуктами распада естественных радионуклидов ряда урана и тория. Концентрация искусственных радионуклидов ^{137}Cs и ^{90}Sr не превышает 10 Бк/м³ [4]. Технические воды, используемые для охлаждения элементов оборудования стандов и установок, удаляются в промканализацию с осуществлением непрерывного контроля со стороны служб радиационного контроля (РК) на содержание радионуклидов и других загрязнений.

Точно оценить соотношение загрязняющих веществ, поступающих в Протву от разных источников, достаточно сложно. Одной из причин является весьма условная оценка степени очистки сточных вод, а также разнообразие путей поступления загрязняющих веществ в природную среду. Необходимо подчеркнуть, что городские очистные сооружения не производят целенаправленной специальной очистки стоков от металлов. Биологические методы очистки направлены в основном на разрушение органических веществ. Очистка же сточных вод от тяжелых металлов происходит, как правило, попутно за счет механического осаждения, сорбции и т.д. Эффективность очистки сточных вод от неорганических соединений даже при использовании специальных фильтров, коагуляции, отстаивания и фильтрования в стоках оставляет 40 – 50% этих веществ [4]. Таким образом, целью настоящей работы явилось биотестирование подземных и поверхностных вод в районе хранилища РАО и сброса сточных вод предприятия атомной энергетики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор проб для биотестирования проводился в соответствии с ландшафтно-геохимическими особенностями местности, изученными в ходе полевых маршрутных наблюдений, а также с учетом данных по содержанию техногенных радионуклидов в пробах почв, растений, вод, отобранных в контрольных точках (1; 2; 3) в районе хранилища РАО [3]. Обзорная карта с точками пробоотбора представлена на рис.1.

Содержание радионуклидов в пробах воды получено в отделе радиационной безопасности и охраны окружающей среды (РБ и ООС) ФЭИ. Карта-схема точек отбора проб воды Протвы в районах сброса промканализации ФЭИ (П1; П2; П3; П4 – частично через сброс сточных вод г.Обнинска) представлена на рис.2.

Для определения состояния экосистем в районе хранилища радиоактивных отходов осенью 2005 г. в трех точках зоны наблюдения были отобраны пробы верховодки. Отбор проб из Протвы в четырех точках в районах выпуска сточных вод ФЭИ и очистных сооружений Обнинска проводился летом 2005 г. в летней межени в середине июня.

Биологическая оценка воды в точках пробоотбора определялась методами биотестирования по выживаемости и поведенческим реакциям пресноводных гидробионтов нескольких систематических групп: водоросли *Chlorella vulgaris*; инфузории

Spirostomum ambiguum; ракообразные *Daphnia magna* Straus. Использовались гостированные методики и научно-исследовательские методы, которые имеют многолетнее применение в научно-практических работах, проводимых на кафедре биологии ИАТЭ.

Для определения потенциальной мутагенности среды в зоне наблюдения была использована классическая методика, основанная на изучении реакции клеток меристемы молодых растущих корешков лука (*Allium cepa*) [5].

Хлорелла (*Chlorella vulgaris*) – одноклеточная зеленая водоросль, используется для биотестирования широкого класса веществ (тяжелые металлы, хлор и фосфорорганические соединения, ПАВ, детергенты), сточных вод различных отраслей народного хозяйства, загрязненных природных вод и грунтов [6, 7]. В работе применен метод определения экологического состояния воды по изменению биомассы культуры клеток *C. vulgaris*, который включен в Международные стандарты ИСО 14000 (10260:1992) [8]. Перед внесением водорослей в исследуемые растворы проводили концентрирование культуры *Chlorella* до 10^5 – 10^6 клеток/мл. Разливали исследуемую воду по 100 мл в конические колбы объемом 250 мл. В контрольную колбу такого же объема наливали 100 мл среды Тамия. В каждую колбу добавляли по 10 мл концентрированной суспензии водорослей. Пробы ставили в освещенный лампами дневного света шкаф для культивирования на 24 ч; после времени инкубации проводили определение прироста биомассы *Chlorella* во всех пробах воды и в контроле. Эксперимент проводили в трех повторностях. Определение концентрации хлорофилла регистрировали по оптической плотности экстракта водорослей, полученной в области красного максимума поглощения (663–665 нм) на фотометре КФК-3. Расчет проводили по стандартной методике [7, 8]. По данным концентрации хлорофилла *a* рассчитывали ориентировочную величину биомассы фитопланктона. Проводили сравнительный анализ полученных результатов, учитывая прирост биомассы в контрольной пробе.

Метод оценки качества воды с использованием пресноводных рачков-дафний применяется у нас в стране и за рубежом как обязательный тест на токсичность сточных и природных вод и установления ПДК веществ-загрязнителей [9]. Метод включен в Международные стандарты ИСО 14000 (6341:1996) [8]. Биотестирование проводили в трехкратной повторности, в каждый стакан заливали по 100 мл исследуемой воды и помещали по 10 дафний. Контролем служили дафнии, помещенные по 10 шт. в 100 мл водопроводной воды (рН~7,7, общая жесткость 4 мг экв/л). Физико-химические показатели исследуемой воды представлены в работе [10]. По результатам кратковременных опытов, длительностью 96 ч, определяли среднее (медианное) время выживания 50% особей (ЛВ₅₀). Если в исследуемой пробе ЛВ₅₀ < 1 ч, то пробу характеризовали как гипертоксичную, при ЛВ₅₀ < 24 ч – высокотоксичную, при ЛВ₅₀ < 96 ч – среднетоксичную и при ЛВ₅₀ более 96 ч – не обладающей острым токсическим действием.

Во многих исследованиях, в том числе проводимых авторами, показана высокая чувствительность физиологических характеристик инфузорий на антропогенное воздействие [2, 11]. Инфузория спиростома (*Spirostomum ambiguum*) – одна из наиболее широко распространенных ресничных инфузорий. Передвигаются спиростомы с помощью ресничек, которые часто рассматриваются как хеморецепторы, обладающие высокой чувствительностью к изменениям внешней среды. Ресничная система позволяет инфузории менять направление движения в горизонтальном и вертикальном направлениях. В норме *Sp. ambiguum* совершает свободные передвижения в толще воды с характерным чередованием сжатия/вытягивания клетки [12]. *Sp. ambiguum* культивировали в водопроводной дехлорированной воде (рН~7,7, общая жесткость

4 мг экв/л) в биологических пробирках на 15 мл [8]. Количественную оценку спонтанной двигательной активности спиростомы (СДА) определяли по числу пересечений спиростомой визира окуляра микроскопа МБС-10 за 1 мин. Методика просчета СДА подробно описана в [11, 13].

Токсичность воды можно быстро и точно определить, используя современные цитогенетические методы. Наиболее чувствительными к неблагоприятным воздействиям внешней среды являются молодые делящиеся клетки лука. Лук имеет 16 крупных карiotипически хорошо изученных хромосом, что является удобным для цитогенетического анализа [14, 15]. Для тестирования воды отбирали луковички –одинаковые по весу и размеру, на каждый вариант опыта брали по 10 луковок *Allium cepa* сорта Штуттгартер Ризен. Обеспечивали равномерное прорастание и синхронизацию деления клеток предварительной выдержкой в дистиллированной воде в течение суток в холодильнике при $t = +5-8\text{ }^{\circ}\text{C}$. После этого луковички проращивали в пробирках с анализируемыми пробами воды в течение 3 сут в термостате при $t = +24^{\circ}\text{C}$ [15]. В качестве контроля использовали отстоянную водопроводную воду (рН $\sim 7,2$, общая жесткость 4 мг экв/л). Корешки, достигшие длины 1,5 см, фиксировали в «уксусном спирте» (3 части этилового спирта и 1 часть уксусной кислоты) в течение суток. Анализ клеток меристемы проводили на давленных препаратах, окрашенных ацетоорсеином по известной методике [16]. Цитотоксичность проб воды оценивали по изменению митотической активности клеток корневой меристемы. Генотоксичность проб воды оценивали по частоте абберрантных ана-телофаз, наблюдаемых в первом митозе клеток меристемы корней лука. Абберрантными считали клетки, в которых происходят видимые нарушения деления: хромосомные или хроматидные мосты, фрагменты, отставания хромосом, трехполюсные митозы [17, 18].

Все результаты биотестирования обработаны статистически по критерию Стьюдента [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 3 представлены результаты оценки изменения биомассы хлореллы в исследуемых пробах верховодки в районе хранилища РАО и сброса сточных вод ФЭИ.

В соответствии с принятой в биотестировании шкалой [1, 2] проба воды в точке 2 статистически достоверно соответствует среднему уровню токсичности. Пробы воды из точек 1 и 3 хранилища РАО статистически достоверно характеризуют высокую степень токсичности. Вода Протвы в районе сбросов ФЭИ имеет среднюю и высокую степень токсичности.

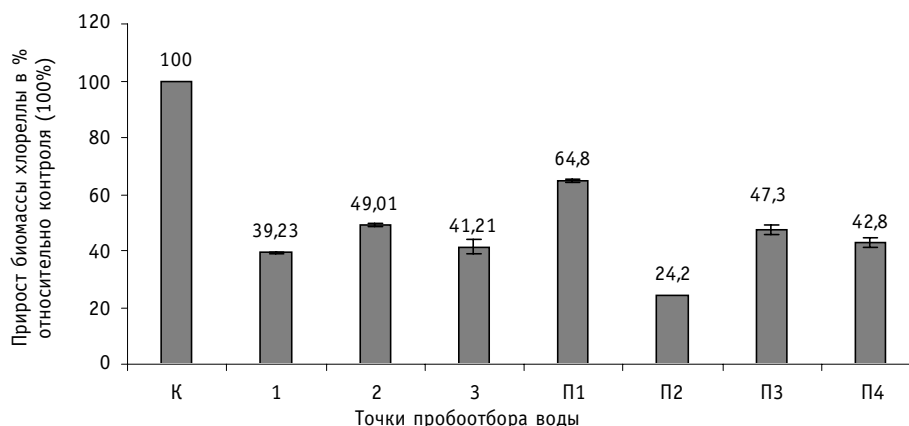


Рис. 3. Изменения биомассы хлореллы в исследуемых пробах верховодки и в районе сброса сточных вод ФЭИ в р. Протву

Таблица 1

Выживаемость дафний в исследуемых образцах воды

Проба воды	Выживаемость, %			Степень токсичности
	1 ч	24 ч	96 ч	
Контроль	100*	100	100	Не токсична
1	100	96,6	95,2	Не токсична
2	100	100	100	Не токсична
3	100	98,6	98,2	Не токсична
П1	100	100	95	Не токсична
П2	100	95	95	Не токсична
П3	95	95	85	Не токсична
П4	100	100	90	Не токсична

* В таблице приведены средние показатели выживаемости дафний в пробах воды Протвы. Ошибка эксперимента по каждой пробе не превышала 5–8%.

Результаты выживаемости *Daphnia magna Straus* в образцах исследуемой воды верховодки в районе расположения хранилища РАО и Протвы в районе сброса сточных вод ФЭИ в 2005 г. представлены в табл. 1.

Данные, полученные в кратковременных опытах на дафниях по их выживаемости, не показали острого токсического действия проб воды из исследуемых источников. Для более глубокого анализа качества воды необходимо проводить хронический опыт до 30 сут и более, т.к. известно, что многие поллютанты накапливаются в организме, и в результате даже малые дозы этих веществ вызывают патологические изменения. В наших многолетних исследованиях выявлены тест-реакции гидробионтов, которые оказались более чувствительными к загрязнению в сублетальных дозах. Они могут быть более пригодными для целей биотестирования природных сред [2]. Результаты биотестирования с использованием показателя спонтанной двигательной активности (СДА) инфузории спиростомы представлены на рис. 4.

Изменения СДА спиростомы в пробах воды из точек 2 и 3 характерны для среднего уровня токсичности. Двигательная активность инфузорий значительно замедле-

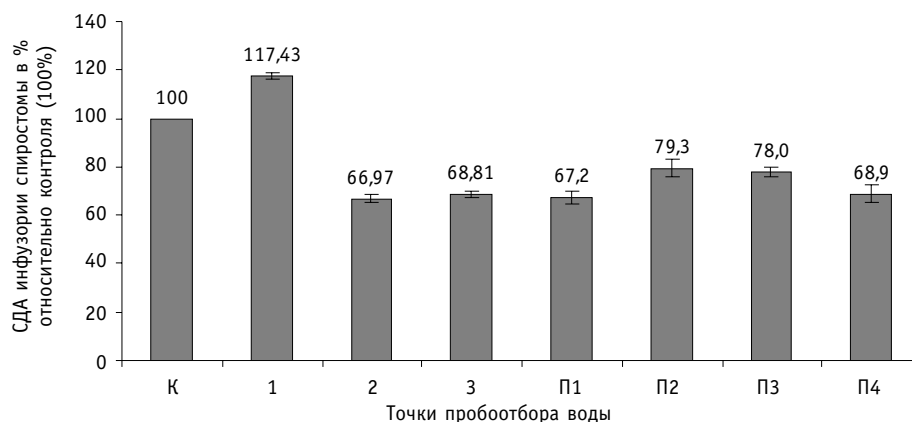


Рис. 4. Изменение СДА инфузории спиростомы в исследуемых пробах воды верховодки в районе расположения хранилища РАО

на, наблюдается закручивание спиростом в «запятую», интенсивное вращение их на месте, что характеризует некоторые функциональные изменения. Результаты анализа воды Протвы показали, что в точках пробоотбора, расположенных ниже плотины по течению реки, уровень спонтанной двигательной активности спиростом отличается от контроля более чем на 20%, что свидетельствует о начальных этапах снижения самоочищающей способности Протвы, поскольку спиростомы являются основными представителями планктона, профильтровывающего органические и минеральные вещества, в том числе антропогенного происхождения. По нашему мнению, низкая самоочищающая способность Протвы в силу неравномерного внутригодового распределения стока, значительного уменьшения расходов в меженные периоды и небольшой скорости течения [4] может привести, при довольно больших объемах сбрасываемых сточных вод, к значительному загрязнению ее акватории и нарушению экологии водоема.

Биотестирование водной среды по уровню цито- и генотоксичности с помощью Аллиум-теста показало, что вода из анализируемых проб неблагоприятно сказывается на активности деления меристематических клеток и вызывает aberrации хромосом. На рис. 5 представлены полученные результаты.

Видно, что в исследуемых пробах воды из верховодки наблюдается статистически достоверное снижение на 16–30% митотической активности корешков лука.

Помимо выраженного цитотоксического эффекта, результаты свидетельствуют и о генотоксичности анализируемых проб воды. Во всех указанных пробах процент наблюдаемых клеток с измененными ана- и телофазами выше аналогичного контрольного показателя. Однако достоверный уровень генетических изменений отмечен в делящихся клетках корешков лука, протестированных в воде из точки 1, находящейся в самой нижней части склона, прилегающего к территории хранилища РАО и на границе с территорией городских очистных сооружений. По результатам тестирования воды можно предположить возможность проявления токсического эффекта воды на живых организмов. Реакция меристематических клеток на антропогенное воздействие носит универсальный характер, т.е. молодые делящиеся клетки могут одинаковым образом реагировать на факторы химической, физической и радиационной природы [20, 21. Установить четкую связь между проявлением цитотоксического эффекта с каким-либо одним из комплекса факторов в настоящей работе не представляется возможным.

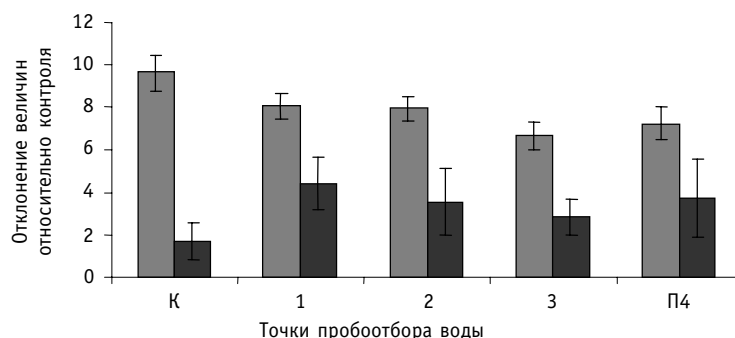


Рис. 5. Величина митотического индекса и процент хромосомных aberrаций в клетках корешков лука:
 ■ – митотический индекс, %; ■ – aberrации, %

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Живые организмы реагируют на воздействие факторов окружающей среды посредством сложной системы биохимических, физиологических и поведенческих механизмов, обеспечивающих гомеостаз. Чувствительность биотестов порой отражает начальные изменения, происходящие в биогеоценозах под воздействием того или иного фактора. Биотестирование позволило выявить возможные критические зоны негативного влияния хранилища радиоактивных отходов и сброса сточных вод ФЭИ на водные экосистемы в районе Обнинска.

Анализируя полученные данные, можно заключить, что организмы разных систематических групп, используемые нами в качестве тест-объектов, имеют сходную реакцию на содержание в исследуемой воде веществ антропогенного происхождения. Так, грунтовые воды, выходящие на поверхность в непосредственной близости от хранилища радиоактивных отходов, обладают явно выраженным негативным биологическим действием по отношению к живым организмам. Об этом свидетельствуют низкий прирост биомассы хлореллы, отклонение в этиологии инфузорий, проявление цитологического и генотоксического эффектов в делящихся клетках лука. Максимально неблагоприятна в этом отношении вода из точки 1 верховодки, расположенной в нижней заболоченной части склона. Физико-географические условия здесь способствуют накоплению радионуклидов, тяжелых металлов, органических веществ в грунтовых водах, чем, по-видимому, и обусловлены наблюдаемые негативные эффекты исследуемых проб воды на тест-объекты.

Представленные данные биотестирования показывают необходимость проведения регулярного биологического мониторинга водной среды из критических точек зоны наблюдения для оценки экологического благополучия региона.

Литература

1. Егорова Е.И., Белолипецкая В.И. Биотестирование и биоиндикация окружающей среды: Уч. пособие по курсу «Биотестирование». – Обнинск: ИАТЭ, 2000. – 80 с.
2. Егорова Е.И. Исследование природных вод и почв методами биотестирования: Уч. пособие по летней практике. – Обнинск: ИАТЭ, 2004. – 52 с.
3. Латынова Н.Е., Вайзер В.И., Козьмин Г.В. и др. Изучение геосистем в районе хранилища твердых радиоактивных отходов с целью обоснования радиоэкологического мониторинга/Сб. докл. III Международной научно-практической конференции «Экология речных бассейнов». – Владимир, 2005. – С. 243-249.
4. Силин И.И. Экология и экономика природных ресурсов бассейна р. Протвы (Калужская и Московская области). – Калуга: ВИЭМС, 2003. – 324 с.
5. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. – ВОЗ, Женева: Медицина, 1989.
6. Федоров В.Д. О методах изучения фитопланктона и его активности. – М.: МГУ, 1979. – С. 58–61.
7. Методы биотестирования вод/Под ред. А.Н. Крайнюкова. – Черногоровка, 1988. – С. 18, 80-83, 89-90.
8. Паишкова Е.В., Фомин Г.С., Красный Д.В. Международные стандарты ИСО 14 000. Основы экологического управления. – М.: ИПК Изд. Стандартов, 1997.
9. Мелехова О.П., Силина Е. К., Фокин В. С. Экспресс-метод биотестирования качества воды по метаболическому критерию. – М., 2000. – 29 с.
10. Васильева А.Н., Козьмин Г.В., Латынова Н.Е., Старков О.В., Вайзер В.И. Общие закономерности загрязнения геосистем в районе размещения регионального хранилища радиоактивных отходов// Известия вузов. Ядерная энергетика. – 2007. – № 2. – (в печати).
11. Бахвалова Е.В., Егорова Е.И., Тушмалова Н.А. Поведение инфузории спиростомы как индикатор наличия тяжелых металлов в водной среде//Биология внутренних вод. – Борок, 2006. – № 3.

12. Тушмалова Н.А., Бурлакова Е.Б., Лебедева Н.Е. и др. Поведение донервных организмов – индикатор эффекта сверхмалых доз // Вестник МГУ. – 1998. – №4. – С. 24-26.
13. Тушмалова Н.А., Данильченко О.П., Бресткина М.Д. Метод биотестирования природных и сточных вод по уровню двигательной активности инфузории спиростомы: Методы биотестирования вод. – Черногоровка, 1988. – С. 44-47.
14. Grant W.F. Chromosome aberration assays in Allium. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox program // Mutation Research. – 1982. – V. 99. – P. 273-291.
15. Fiskesjo G. The Allium test as a standard in environmental monitoring // Hereditas. – 1985. – V. 102. – P. 99-112.
16. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Агропромиздат, 1988. – 217 с.
17. Бочков Н.П., Демин Ю.С., Лучник Н.В. Классификация и методы учета хромосомных aberrаций в соматических клетках // Генетика. – 1972. – Т.8. – № 5. – С. 133-141.
18. Макаров В.Б., Сафронов В.В. Цитогенетические методы анализа хромосом. – М.: Наука, 1978.
19. Плохинский Н.А. Математические методы в биологии: Уч.-метод. пособие. – М.: МГУ, 1978. – С. 340.
20. Гродзинский Д.М. Радиобиология растений. – Киев: Наукова думка, 1989. – 378 с.
21. Дмитриева С.А., Парфенов В.И. Кариология флоры как основы цитогенетического мониторинга. На примере Березинского заповедника. – Минск: Навука і тэхніка, 1991. – 260 с.

Поступила в редакцию 14.07.2006