

УДК 504.064

## БИОДОСТУПНОСТЬ ИОНОВ МЕДИ В ВОДАХ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

А. Н. Вишняков, Н. С. Давыдова, Е. С. Стравинскене, Ю. С. Григорьев

*Сибирский федеральный университет  
Россия, 660041, Красноярск, просп. Свободный, 79  
E-mail: gr2897@gmail.com*

Поступила в редакцию 30.06.15 г.

**Биодоступность ионов меди в водах различного происхождения.** – Вишняков А. Н., Давыдова Н. С., Стравинскене Е. С., Григорьев Ю. С. – Исследован характер действия ионов меди на тест-культуру водоросли хлорелла в природной (реки Енисей и Кача), сточной и водопроводной водах (г. Красноярск). Установлено, что токсичность меди в пробах этих вод может значительно снижаться. Степень понижения токсичности, которая значительно различалась у исследуемых проб вод, может быть вызвана связыванием потенциально токсичных веществ компонентами тестируемых вод. Для природных вод связующая способность и биодоступность в них токсикантов были неодинаковы в разные сезоны года.

*Ключевые слова:* *Chlorella vulgaris*, замедленная флуоресценция хлорофилла, биодоступность тяжёлых металлов, биотестирование, природные и сточные воды.

**Copper ion bioavailability in waters of various origin.** – Vishnyakov A. N., Davydova N. S., Stravinskene E. S., and Grigoriev Yu. S. – The toxic effect of copper ions upon a test culture of alga *Chlorella* in natural (the Yenisei and Kacha rivers), waste and tap water (the Krasnoyarsk city) was estimated. It has been found that the copper toxicity in samples of these waters can greatly reduce. This toxicity reduction, which differed highly in the samples examined, could be caused by binding of potential toxic substances by some compounds in the waters. In natural water, the binding capacity and bioavailability of toxicants vary through seasons.

*Key words:* *Chlorella vulgaris*, delayed chlorophyll fluorescence, bioavailability of heavy metals, bioassay, natural and waste water.

DOI: 10.18500/1684-7318-2016-2-123-130

### ВВЕДЕНИЕ

В результате антропогенного воздействия в природную среду поступает большое количество отходов, содержащих различные формы соединений тяжёлых металлов, являющихся токсичными для большинства живых организмов. Металлы поступают в атмосферу в составе аэрозольных и газообразных соединений дыма, в виде пыли (Ильин, 1989). Почвы и растительность являются биогеохимическим барьером на пути миграции элементов от источника выбросов в атмосферу и осадения на поверхность суши до водного объекта, однако в конечном итоге основная часть их все же оказывается в водоёмах и водотоках. Вместе с тем значительно большее количество металлов попадает в водные объекты непосредственно в составе прямых сбросов (Моисеенко и др., 2006). Главная опасность тяжёлых металлов состоит в том, что в отличие от органических токсикантов, которые в различ-

ной степени разлагаются в природных водах, ионы тяжёлых металлов сохраняются в неизменном виде (Сафонова, 1989).

Среди мероприятий по охране и контролю за состоянием окружающей среды важное значение имеют биологические исследования, связанные с проведением экологического мониторинга. Успешное проведение экологического мониторинга должно позволить спрогнозировать изменение характеристик отдельных звеньев экологической системы. Принципиальное значение при этом имеет получение экспресс-информации о состоянии организмов в результате различных внешних воздействий (Рубин, 2003).

В настоящее время экологический мониторинг включает в себя два основных направления. Первое из них представляет физико-химический анализ объектов окружающей среды, который связан с системой установления ПДК химических веществ. Второе направление, которое в настоящее время активно развивается, заключается в контроле окружающей среды с помощью биологических организмов. Оно в свою очередь включает две группы методов: биоиндикация и биотестирование.

Биологические методы позволяют получить интегральную оценку воздействия загрязняющих веществ на живые организмы и установить начальные проявления их влияния на экосистемы. Биотестирование – это один из приемов исследования в токсикологии, который используется для установления характера действия токсикантов на тест-организмы в лабораторных условиях. Наряду с исследованием токсичности тяжёлых металлов для различных гидробионтов в последнее время большое внимание уделяется таким аспектам, как миграция и трансформация форм существования этих металлов в среде (Линник, Набиванец, 1986). Становится все более очевидным тот факт, что одних только данных о концентрации металлов в воде не достаточно, чтобы спрогнозировать их токсическое воздействие на организмы (Исидоров, 1999). При использовании одного и того же тест-организма токсический эффект разных проб с одинаковым содержанием металлов может существенно отличаться (Холин, 2001). Важной причиной, определяющей токсичность металлов в природных водах, является содержание в них органического вещества (Григорьев и др., 2005; Mercier, 2001; Janssen et al., 2003). В результате процессов комплексообразования или связывания с органическими веществами биодоступность тяжёлых металлов для фитопланктона может значительно снижаться. Наличие процессов связывания токсикантов в сточных водах также затрудняет оценку загрязнения стоков с помощью биотестов (Janssen et al., 2003).

Цель настоящей работы – исследование биодоступности тяжёлых металлов (на примере ионов меди) для одноклеточной водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer в водах различного происхождения.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве тест-объекта использовали термофильный штамм зелёной водоросли *Chlorella vulgaris*. Накопительную культуру водоросли выращивали в культиваторе КВ-05 в течение 20 – 26 часов при постоянной температуре 36°C, интенсивности света 60 Вт/м<sup>2</sup> и непрерывном перемешивании, обеспечивающем посту-

## БИОДОСТУПНОСТЬ ИОНОВ МЕДИ В ВОДАХ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

пление углекислого газа из воздушной среды (0.03%). В качестве питательной среды использовали 10%-ную среду Тамия. Пересев культуры в свежую среду проводился 1 раз в сутки. При таких условиях выращенная культура была альгологически чистой и находилась в экспоненциальной стадии роста. Засев культуры производился с исходной оптической плотностью 0.010, измеряемой прибором ИПС-03 в кювете размером 2 см, при длине волны 560 нм.

Оценка физиологической активности тест-объекта производилась путем регистрации замедленной флуоресценции (ЗФ) хлорофилла на специализированном приборе Фотон-10 (Григорьев и др., 1996; Григорьев, Стравинскене, 2009). Из выращенной культуры суспензии клеток вносили в кюветы Фотона-10 в таких объемах, чтобы оптическая плотность суспензии в кюветах с 5 мл дистиллированной (контроль), природной или сточной (опыт) воды соответствовала 0.030. При этом концентрация среды Тамия в них не превышала 1%. Модельный токсикант в виде раствора  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  вносили в концентрации 0.04 мг/дм<sup>3</sup> в расчете на ион меди. Миллисекундную замедленную флуоресценцию регистрировали в красной области спектра (680 – 750 нм) при возбуждении импульсами синего света (длина волны 480 нм).

Суть флуоресцентного метода определения токсичности проб состоит в том, что замедленная флуоресценция (ЗФ) измеряется при двух интенсивностях возбуждающего света. В «режиме высокого света» интенсивность ЗФ представлена в основном быстрыми компонентами затухания, которые при токсическом воздействии значительно снижаются. В «режиме низкого света» в свечении доминируют медленные компоненты затухания ЗФ, интенсивность которых в присутствии токсикантов существенно возрастает. В результате отношение этих двух параметров (относительный показатель замедленной флуоресценции – ОПЗФ) снижается в десятки раз при неблагоприятном воздействии на растительный тест-организм. При этом длительность измерения состояния объекта не превышает нескольких секунд (Григорьев и др., 2013).

При исследовании токсичности и связующей способности воды р. Енисей пробы отбирались в 4 точках выше и ниже г. Красноярск с апреля по октябрь 2012 года. Первая станция для отбора проб находилась на 0.5 км ниже плотины Красноярской ГЭС, вторая станция – 20 км выше г. Красноярск, третья и четвертая станции – на 15 и 35 км ниже г. Красноярск. Изучение сточных вод проводилось на пробах, отобранных с первичных отстойников городских очистных сооружений, до их биологической очистки. Пробы воды из р. Енисей и малой р. Кача, протекающей по левобережной части г. Красноярск, отбирались в феврале – апреле 2013 г.

Оценку связующей способности тестируемых вод проводили путем регистрации изменения ОПЗФ водоросли в контрольной и опытных водах после добавления в них модельного токсиканта – ионов меди (0.04 мг  $\text{Cu}^{+2}$ /дм<sup>3</sup>). Для этого использовался 2-кратный ряд разбавлений опытных проб воды (от 100% до 0.39%). В качестве относительного показателя связующей способности вод (ОПССВ) была взята величина разбавления тестируемых проб воды, при которой ОПЗФ хлореллы в присутствии ионов меди соответствовал таковому в контрольной воде после вне-

сения модельного токсиканта. Чем больше величина данного показателя, тем выше в нем содержание компонентов, способных связывать потенциально токсичные вещества.

Расчет ОПССВ проводился по формуле:

$$\text{ОПССВ} = 10^{\lg R_6 - \frac{(\lg R_6 - \lg R_m) \times (I_k - I_m)}{I_6 - I_m}},$$

где  $R_6$  – величина разбавления (большая), при которой ОПЗФ был ниже  $I_k$ ;  $R_m$  – величина разбавления (меньшая), при которой ОПЗФ был выше  $I_k$ ;  $I_6$  и  $I_m$  – величины ОПЗФ, соответствующие этим разбавлениям;

$$I_k = (\text{ОПЗФ}_k - \text{ОПЗФ}_{k+\text{медь}}) / 2,$$

где  $\text{ОПЗФ}_k$  и  $\text{ОПЗФ}_{k+\text{медь}}$  – величины относительного показателя замедленной флуоресценции водоросли хлорелла в контрольной воде до и после внесения ионов меди соответственно.

В качестве  $R_6$  и  $R_m$  берется та пара наибольших разбавлений пробы воды, между которыми имеет место переход к более низкому значению ОПЗФ по сравнению с  $I_k$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты экспериментов показали, что 100%-ная вода р. Енисей не вызывала снижения ОПЗФ культуры водоросли хлорелла. Отсутствие токсического эффекта может быть обусловлено как низким содержанием в пробах загрязнителей, так и тем, что потенциально токсичные вещества находятся в связанном состоянии, не доступном для тест-организма. В этой ситуации контролировать загрязнение вод методом биотестирования можно путем определения их токсичности до и после внесения модельного токсиканта. Если при добавлении внешнего токсиканта в нетоксичную пробу проявится его воздействие на тест-организм, то это означает, что она не содержит токсичные вещества. И наоборот, если внесенный токсикант не действует, то в этой пробе могут присутствовать опасные загрязнители, которые находятся в связанном состоянии с компонентами самой воды.

Для проверки последнего предположения была исследована связующая способность проб воды р. Енисей методом оценки снижения токсичности ионов  $\text{Cu}^{2+}$  в этих водах. Как видно из рис. 1, данный модельный токсикант при внесении в контрольную воду (1%-ная среда Тамия в дистиллированной воде) вызывает снижение величины ОПЗФ более чем в 10 раз. В природной воде действие той же концентрации вносимого токсиканта проявляется в гораздо меньшей степени. Степень ослабления действия ионов меди в природной воде можно установить путем ее разбавления. Тогда, чем большего разбавления дистиллятом требует тестируемая вода для проявления в полном объеме действия добавляемого токсиканта, тем больше в ней примесей, способных его связывать и переводить в недоступное для тест-организма состояние. Так, из рис. 1 видно, что для полного проявления токсического действия ионов меди в пробе р. Енисей, ее необходимо разбавить в 32 раза (3.12%).

Было также обнаружено, что связующая способность вод р. Енисей не одинакова в разные месяцы года. В апреле, мае и октябре она была невысокой (рис. 2),

## БИОДОСТУПНОСТЬ ИОНОВ МЕДИ В ВОДАХ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

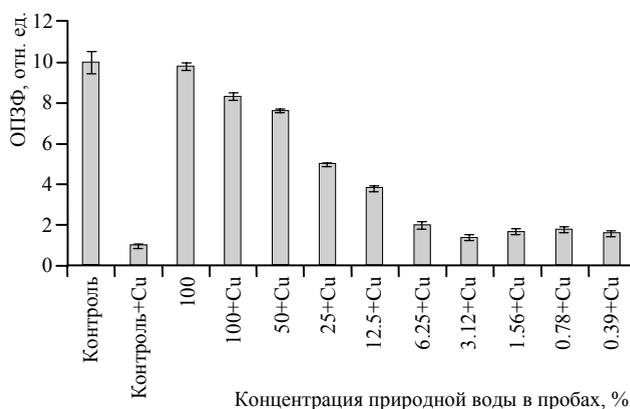
тогда как в летние месяцы способность снижать токсичность ионов меди у вод была существенно выше. Это согласуется с литературными данными, согласно которым наибольшее количество гумусовых соединений в водоёмы поступает летом. По этой причине максимум содержания в природных водах комплексов ТМ с гумусовыми веществами приходится на летне-осенний период, а зимой возрастает доля гидратированных форм (Линник, Набиванец, 1986). Известно также,

что концентрация органического углерода в водах подвержена сезонным колебаниям, которые обусловлены сменой гидрологического режима водных объектов и изменениями интенсивности биологических процессов (Smirnov, 2008).

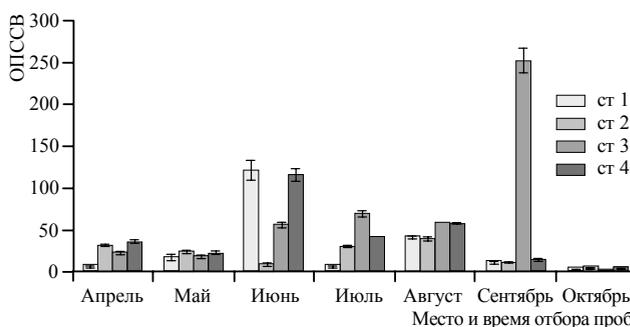
Результаты, представленные на рис. 2, демонстрируют разную связывающую способность воды р. Енисей, взятой в одно и то же время, но на разных ее участках. Особенно большое снижение токсичности модельного токсиканта наблюдалось в пробах воды со станций 3 и 4, расположенных ниже г. Красноярска по течению реки. Это может свидетельствовать о поступлении в реку значительного количества городских стоков, содержащих комплексообразующие вещества.

Проведенные исследования с пробами воды разного происхождения показали (рис. 3), что медь оказывает в них различное токсическое действие на водоросль хлорелла.

В водопроводной воде внесимые ионы меди начинают оказывать заметное токсическое действие на хлореллу уже после двукратного разбавления тестируемой пробы дистиллированной водой.

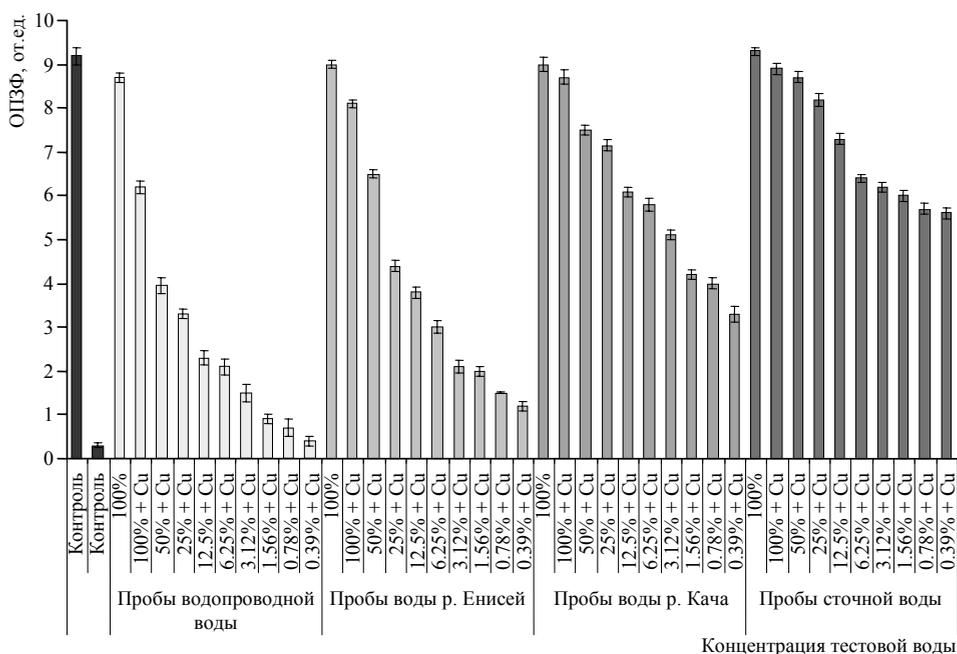


**Рис. 1.** Характер действия ионов меди ( $0.04 \text{ мг/дм}^3$ ) на относительный показатель замедленной флуоресценции (ОПЗФ) водоросли хлорелла в контрольной воде и пробах воды р. Енисей различного разбавления. Указано процентное содержание речной воды в тестируемых образцах после ее разбавления дистиллированной водой



**Рис. 2.** Относительный показатель связывающей способности (ОПССВ) проб вод р. Енисей, отбираемых на 4 станциях с апреля по октябрь 2012 г.

При дальнейшем разбавлении водопроводной воды воздействие токсиканта на культуру водоросли возрастает. Это может свидетельствовать о том, что в водопроводной воде г. Красноярска содержание соединений, способных связывать ионы меди, сравнительно не велико. В пробах воды, взятых из р. Енисей, действие токсиканта проявлялось слабее (см. рис. 3). Пробы воды, взятые из р. Кача, также исходно не токсичные, снижали действие вносимых ионов меди в значительно большей степени, что указывает на присутствие в данном водотоке большого количества примесей, способных связывать потенциально токсичные вещества. В сточной воде, взятой на входе городских очистных сооружений и содержащих в своем составе хозяйственно-бытовые стоки, ионы меди проявляли свои токсические свойства только при очень большом разбавлении проб.



**Рис. 3.** Значения относительного показателя замедленной флуоресценции (ОПЗФ) в контрольной, водопроводной, речной и сточной водах. Концентрация вносимых ионов меди – 0.04 мг/дм<sup>3</sup>

Таким образом, чем большего разбавления дистиллятом требует тестируемая вода для проявления в полном объеме действия добавляемого токсиканта, тем больше в ней содержится примесей, способных связывать и переводить его в недоступное для тест-организма состояние. На этой основе можно не только оперативно оценивать буферную ёмкость тестируемых вод, но и контролировать качество очистки сточных вод на городских очистных сооружениях.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Биодоступность ионов меди в водопроводной, природной и сточной водах для культуры водоросли хлорелла существенно различается. Водопроводная вода слабо связывает вносимый токсикант. Пробы воды р. Енисей и особенно более загрязненной р. Кача снижали токсичность ионов меди значительно сильнее. Это указывает на наличие в воде примесей природного и антропогенного происхождения, способных связывать присутствующие в ней токсиканты и переводить их в состояние, недоступное для живых организмов. В наибольшей степени данное явление характерно для многокомпонентных стоков, поступающих на городские очистные сооружения.

В биодоступности вод р. Енисей четко прослеживалась сезонная динамика. В летне-осенний период связывающая способность вод была выше, что может быть вызвано большим поступлением в водоёмы гумусовых соединений.

Методом регистрации замедленной флуоресценции водоросли хлорелла можно не только быстро оценивать токсичность и биодоступность загрязняющих веществ в тестируемых водах, но и оперативно контролировать качество очистки сточных вод.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

*Григорьев Ю. С., Стравинскене Е. С.* Методика измерений относительного показателя замедленной флуоресценции культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления. М., 2009. 37 с. ПНД 14.1:2:4.16-09 / Т 16.1:2.3:3.14-09.

*Григорьев Ю. С., Фуряев Е. А., Андреев А. А.* Способ определения содержания фитотоксических веществ / Патент № 2069851. Бюл. изобр. № 33 от 27.11.96.

*Григорьев Ю. С., Бурмакин В. Н., Бондарев Н. С.* Влияние связывания тяжелых металлов на результаты биотестирования токсичности природных и сточных вод // Вестн. Красноярского гос. ун-та. Сер. Естественные науки. 2005. № 5. С.125 – 128.

*Ильин А. В.* Биологические основы и методы культивирования корма беспозвоночных. М. : Наука, 1989. 145 с.

*Исидоров В. А.* Введение в химическую экотоксикологию : учеб. пособие. СПб. : Химиздат, 1999. 144 с.

*Линник П. Н., Набиванец Б. И.* Формы миграции металлов в пресных поверхностных водах. Л. : Гидрометеиздат, 1986. 241 с.

*Моисеенко Т. И., Кудрявцева Л. П., Гашкина Н. А.,* Рассеянные элементы в поверхностных водах суши : Технофильность, биоаккумуляция и экотоксикология. М. : Наука, 2006. 261 с.

*Рубин А. Б.* Регуляция первичных процессов фотосинтеза // Успехи биологической химии. 2003. Т. 43. С. 225 – 256.

*Сафонова Т. А.* Поведение ртути и других тяжелых металлов в экосистемах : в 3 ч. Ч. 2. Процессы биоаккумуляции и экотоксикологии / Сиб. отд-ние АН СССР. Новосибирск, 1989. 154 с.

*Холин Ю. В.* Гумусовые кислоты как главные природные комплексообразующие вещества // UNIVERSITATES. Наука и просвещение (Харьков). 2001. № 4. С. 28 – 34.

А. Н. Вишняков, Н. С. Давыдова, Е. С. Стравинскене, Ю. С. Григорьев

*Janssen C. R., Heijerick D. G., De Schamphelaere K. A. C., Allen H. E.* Environmental risk assessment of metals : tools for incorporating bioavailability // *Environment International*. 2003. Vol. 28, № 8. P. 793 – 800.

*Mercier F., Moulin V., Barré N., Casanova F., Toulhoat P.* Study of the repartition of metallic trace elements in humic acids colloids : potentialities of nuclear microprobe and complementary techniques // *Analytica Chimica Acta*. 2001. Vol. 427, № 1. P. 101 – 110.

*Smirnov M. P.* The effect of horizontal and altitudinal zonality on the Concentrations and ratios of humic and fulvic acids in river waters // *Water Resources*. 2008. Vol. 35, № 4. P. 460 – 468.