

УДК 574.64

**МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПРИРОДНЫХ ВОД  
НА ТОКСИЧНОСТЬ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ ДЛЯ ВОДОРΟΣЛИ  
*Chlorella vulgaris***

© 2012 г. Е. С. Стравинскене, Ю. С. Григорьев

Сибирский федеральный университет  
660041 Красноярск, просп. Свободный, 79  
E-mail: grig@lan.krasu.ru

Поступила в редакцию 29.12.2010 г.

Изучен характер действия тяжелых металлов (меди, цинка и кадмия) на тест-культуру водоросли хлорелла в природной воде (реки Енисей и Кача). Показано, что токсичность металлов в пробах этих вод может значительно снижаться. Степень снижения токсического действия исследованных поллютантов зависит от вида тестируемой воды и значительно варьирует во времени.

*Ключевые слова:* тяжелые металлы, биодоступность, водоросль хлорелла, биотестирование, токсичность.

Тяжелые металлы (ТМ) попадают в водоемы с промышленными стоками, из атмосферы, при внесении в почву химикатов, в том числе удобрений. Повышенное содержание ТМ в водных экосистемах может быть обусловлено также геохимическими особенностями региона [9].

В природных водах ТМ находятся преимущественно в трех формах: в составе взвешенных частиц, в виде свободных (гидратированных) ионов, а также в составе комплексных соединений с неорганическими и органическими веществами различной молекулярной массы и химической природы [1]. Экспериментально было показано, что наиболее токсичными для гидробионтов являются свободные (незакомплексованные) ионы металлов [1, 2, 7, 10, 12]. Металлы, адсорбированные на поверхности взвешенных частиц или находящиеся в составе комплексов с органическими веществами, менее токсичны для фитопланктона [8] в связи с их малой доступностью для гидробионтов. Кроме того, известно, что в природной воде основную комплексобразующую роль играют лиганды органического происхождения [15].

Буферная емкость природной среды по отношению к загрязняющим веществам, понимаемая как ее способность переводить мобильные соединения в малоподвижное состояние [6], во многом будет определяться содержанием растворенного органического вещества (РОВ), прежде всего гумусовых веществ. Их концентрация в реках, в свою очередь, существенно зависит от зоны расположения водного объекта, его типа, а также от сезона [14]. В водоемах с разными климатически-

ми и геохимическими показателями соотношение гуминовых и фульвокислот в составе РОВ может различаться, что будет влиять на биодоступность и токсичность ТМ [13]. Цель настоящей работы – исследование характера изменения биодоступности ТМ (меди, цинка и кадмия) для одноклеточной водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer в водах различных природных объектов.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовалась токсичность трех ТМ (меди, цинка и кадмия) по отношению термофильному штамму микроводоросли *Chlorella vulgaris* в воде двух рек: Енисей и Качи (левобережный приток Енисей). Пробы воды отбирались в этих водотоках в черте г. Красноярск и не требовали дополнительной подготовки (фильтрации). Токсичность металлов оценивалась по двум тест-функциям: замедленной флуоресценции (ЗФ) хлорофилла и скорости роста тест-культуры водоросли. Тестирование всех вариантов проводилось в трех повторностях.

Культура водоросли выращивалась в культиваторе КВ-05 при постоянной температуре 36°C, интенсивности света 60 Вт/м<sup>2</sup> и непрерывном перемешивании, обеспечивающем поступление углекислого газа из воздушной среды (0.03%). В качестве питательной среды использовалась 10- и 50%-ная среда Тамия для опытов по ЗФ и проросту водоросли соответственно. Пересев культуры в свежую среду проводился один раз в сутки. При таких условиях выращенная культура была альго-

логически чистой и находящейся в экспоненциальной стадии роста. Суточный прирост культуры водоросли, измеряемый по оптической плотности суспензии с помощью прибора ИПС-03, достигал 20-кратной величины.

При проведении опытов по воздействию ионов ТМ на параметры  $3\Phi$  водоросли выращенная культура профильтровывалась через вату и вносилась в контрольную (дистиллированную) воду и в пробы речной воды таким образом, чтобы оптическая плотность суспензии водоросли в кювете толщиной 2 см при длине волны 560 нм составляла 0.04 ( $3 \times 10^5$  клеток на 1 мл), а концентрация питательной среды Тамия была равна 1%. Низкий процент содержания солей минимизировал процесс образования с ними комплексов ионов ТМ. Растворы ТМ вносились в пробы природной и контрольной (дистиллированной) воды в форме сульфатов меди, цинка и кадмия. Ингибирующее действие ионов ТМ на культуру водоросли определяли по снижению интенсивности миллисекундной замедленной флуоресценции, возбуждаемой в режиме высокого света (480 нм, 180 Вт/м<sup>2</sup>). Регистрация замедленной флуоресценции ( $3\Phi_B$ ) в этих условиях проводилась на флуориметре Фотон-10 после экспонирования проб тест-культуры водоросли в течение 1 ч в многокюветном культиваторе КВМ-05.

В опытах по воздействию ионов ТМ на прирост культуры водоросли исходная оптическая плотность образцов составляла 0.005 ( $3.6 \times 10^4$  клеток на 1 мл), а концентрация питательной среды Тамия – 2%. Ингибирующее действие ионов ТМ, вносимых в тест-культуру водоросли, определяли путем сравнения оптической плотности контрольных и опытных проб после 22 ч выращивания в культиваторе КВМ-05 [3]. Все используемые в работе приборы разработаны в Сибирском федеральном университете (г. Красноярск).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение характера действия трех ТМ (меди, цинка и кадмия) на  $3\Phi$  и прирост тест-культуры водоросли хлорелла в природной воде показало, что их токсичность может значительно снижаться. На рис. 1 представлен типичный характер неравноценного действия ионов меди на  $3\Phi$  водоросли хлорелла в 1%-ной среде Тамия, приготовленной на дистиллированной (контроль) и речной водах. Показано, что в контроле уже 0.04 мг/л ионов меди вызывают снижение  $3\Phi_B$  на 70%, тогда как в пробах вод рек Енисей и Качи близкий по величине токсический эффект наблюдался только в присутствии значительно более высоких концентраций ионов меди. Для сравнения токсич-

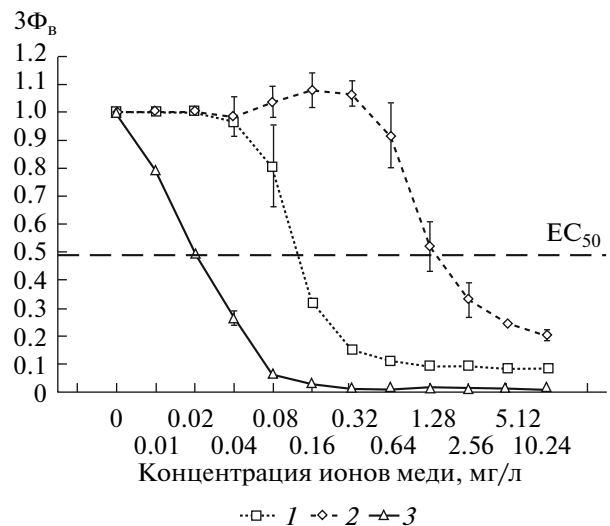


Рис. 1. Зависимость интенсивности  $3\Phi$  культуры водоросли хлорелла от концентрации ионов меди в контрольной воде и в воде рек Енисей и Качи (пробы взяты в январе 2007 г.). В качестве величины разброса значений указана стандартная ошибка среднего: 1 – Енисей, 2 – Кача, 3 – контроль.

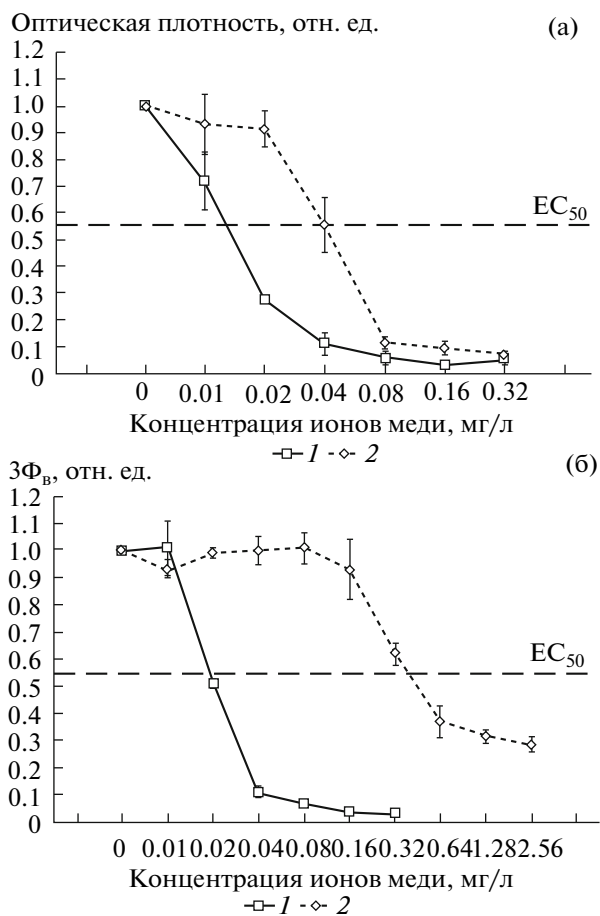
ческого действия ионов ТМ в различных пробах рассчитаны показатели  $EC_{50}$ , отражающие концентрацию токсиканта, вызвавшую 50%-ное снижение тест-функции, по формуле

$$EC_{50} = 10^{\frac{\lg C_6(E_M - 0.5) - \lg C_M(E_6 - 0.5)}{E_M - E_6}},$$

где  $C_6$  – концентрация ионов ТМ, при которой показатель  $3\Phi_B$  снизился более чем на 50% от контроля;  $C_M$  – концентрация ионов ТМ, при которой показатель  $3\Phi_B$  снизился менее, чем на 50% от контроля;  $E_6$  и  $E_M$  – величины  $3\Phi_B$ , соответствующие этим концентрациям ТМ, выраженные в долях по отношению к контролю.

Данные, полученные расчетным методом, показали, что  $EC_{50}$  для дистиллята равен 0.015 мг/л, для вод Енисей – 0.12 мг/л, Качи – 1.3 мг/л ионов меди. Следовательно, токсичность ионов меди уменьшалась в воде Енисей в 8, Качи – 87 раз.

Снижение неблагоприятного воздействия ионов меди на культуру водоросли в пробах речной воды, по всей вероятности, обусловлено уменьшением их доступности для клеток хлореллы в результате взаимодействия токсиканта с компонентами этих вод. Большое содержание комплексобразующих веществ, способных связывать данный ТМ в загрязненных водах р. Качи, вызывает более значительную нейтрализацию токсического действия ионов меди на тест-организм по сравнению с чистыми водами р. Енисей. Это предположение хорошо согласуется с результатами проведенных ранее ис-



**Рис. 2.** Токсическое действие ионов меди на прирост (а) и  $3\Phi_V$  (б) культуры водоросли в контрольной (дистиллированной) и природной воде (р. Енисей, проба взята в сентябре 2008 г.): 1 – Контроль, 2 – Енисей. В качестве величины разброса значений указана стандартная ошибка среднего.

следований [4], согласно которым сточные воды на входе городских очистных сооружений вызывали существенно большее снижение токсичности ионов меди по воздействию на  $3\Phi$  водоросли хлореллы, чем вода, прошедшая очистку. Поскольку

Показатели  $EC_{50}$  для ионов меди в дистиллированной воде и воде р. Енисей, рассчитанные по данным опытов на прирост и  $3\Phi_V$  культуры водоросли хлореллы

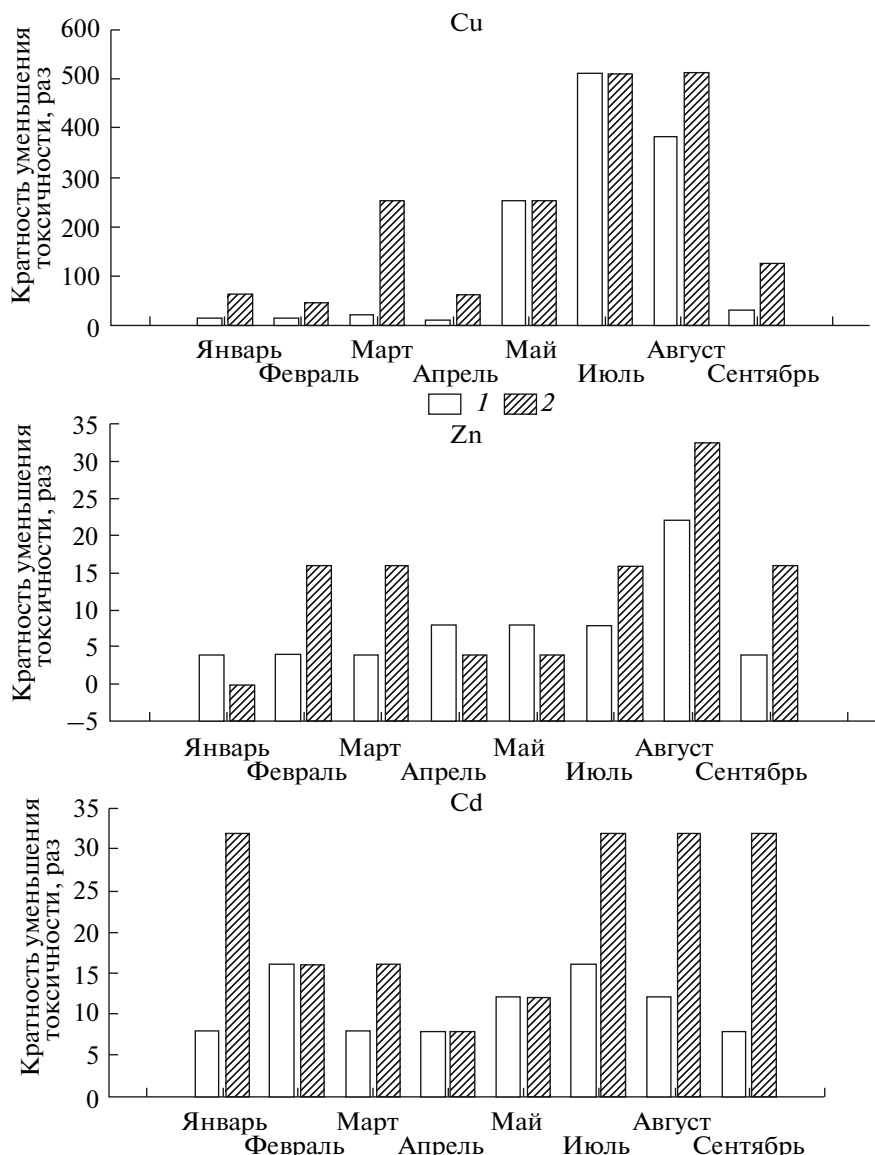
Тест-функция	$EC_{50}$		Кратность снижения токсичности ионов меди
	в дистиллированной воде	в пробе воды р. Енисей	
$3\Phi$	0.02	0.44	22 раза
Прирост	0.014	0.044	3 раза

выполнение оперативного биотеста на основе регистрации замедленной флуоресценции водоросли хлорелла предусматривает только кратковременный контакт (1 ч) тест-организма с токсикантами, то представляет интерес изучение характера действия ТМ в природных водах при более длительных экспозициях. Для этого использован биотест по воздействию токсических веществ на рост водоросли хлореллы, выполняемый в течение 22 ч.

Эксперименты показали (рис. 2), что данные по связывающей способности воды одного и того же объекта, полученные двумя биотестами на основе разных тест-функций водоросли хлореллы, могут существенно различаться. Так, если кратность снижения токсичности ионов меди в воде р. Енисей в биотесте по  $3\Phi$  составляла около 22 раз, то в биотесте по приросту водоросли эта величина для тех же проб воды не превышала 3 раз (рис. 2, таблица).

Возможно, комплексы, образуемые ТМ с присутствующими в пробах веществами, обладают недостаточной прочностью и со временем диссоциируют, высвобождая токсиканты. Согласно результатам исследований [5] для фульвокислот, которые доминируют в речной воде среди гумусовых веществ [14], характерна дезактивация активных центров связывания при хранении, в результате чего существенно снижается их поглощательная способность по отношению к ТМ. Однако в более ранних работах отмечено, что связывающая способность проб природной воды не изменялась в течение нескольких месяцев [15].

Другой вероятной причиной различий в величинах связывания, полученных двумя биотестами, может быть ограниченное количество веществ, присутствующих в природных водах и способных оказывать защитное действие на клетки водоросли. Согласно [13], защитная роль таких веществ (в частности гуминовых и фульвокислот) может проявляться через уменьшение количества свободных ионов металлов при образовании комплексов, а также вследствие абсорбции гумусовых веществ на поверхности самих клеток водоросли и создания таким образом барьера на пути проникновения в них свободных ионов ТМ [13]. Но по мере роста культуры водоросли хлореллы и соответственно увеличения общей площади поверхности клеток экранирующий эффект, вызванный компонентами природных вод, может снижаться. Кроме того, возможна конкуренция возросшего количества клеток с этими веществами за ионы ТМ [12]. Исследования динамики связывающей способности воды проводились в течение восьми месяцев 2007 г. с помощью биотеста на основе  $3\Phi$  тест-культуры. Результаты,



**Рис. 3.** Кратность уменьшения токсичности ионов ТМ (показатель  $3\Phi_{\text{в}}$ ) по отношению к культуре водоросли хлорелла в пробах воды рек Енисея и Качи, взятых с января по сентябрь 2007 г., 1 – Енисей, 2 – Кача.

представленные на рис. 3а–3в показывают, что связывающая способность воды природных объектов значительно изменялась во времени. Максимальная кратность уменьшения токсичности ионов меди за весь период исследования составила 512 раз в пробе воды р. Енисея, взятой в июле, и в пробах воды р. Качи, взятых в июле и августе (рис. 3а). Цинк и кадмий связывались в гораздо меньшей степени в пробах воды обеих рек (рис. 3б). Максимальная кратность снижения токсичности ионов цинка составляла 33 раза в пробе воды р. Качи, взятой в августе. Для ионов кадмия ее значение в пробах воды р. Качи, взятых в январе, июле, августе и сентябре, достигало примерно той же величины. Связывающая

способность воды обеих рек по отношению ко всем исследованным ТМ была выше в летний период. Полученные результаты хорошо согласуются с данными [11, 14], по которым в летний период происходит повышение продукции РОВ внутри водоема в связи с ростом планктона. Кроме того, увеличение поверхностного стока в весенне-летний период ведет к возрастанию концентрации аллохтонного РОВ, что также может существенно влиять на биодоступность металлов. Однако по отношению к кадмию высокий уровень связывающей способности был отмечен и в январской пробе воды р. Качи. Одной из возможных причин такого повышения буферной емкости воды по отношению к ТМ в зимние месяцы

может быть поступление в реку комплексообразующих веществ антропогенного происхождения.

### ВЫВОДЫ

Проведенные исследования показали, что токсичность ТМ для водоросли *Chlorella vulgaris* может значительно снижаться в природной воде. При этом степень снижения токсических свойств ТМ существенно зависит от типа природного объекта. В пробах воды р. Енисея связующая способность значительно ниже, чем ее небольшого, но достаточно загрязненного притока — р. Качи. С помощью биотеста на основе ЗФ показано наличие сезонной динамики связывающей способности воды обоих природных объектов с максимумом связывания в летний период. Данные по кратности снижения токсического действия ТМ в пробах природной воды, полученные двумя биотестами на основе прироста и ЗФ культуры водоросли, существенно различались.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брагинский Л.П., Линник П.Н. К методике токсикологического эксперимента с тяжелыми металлами на гидробионтах // Гидробиол. журн. 2003. Т. 39. № 1. С. 92–104.
2. Будников Г.К. Тяжелые металлы в экологическом мониторинге водных систем // Соросовский образовательный журн. 1998. № 5. С. 23–29.
3. Григорьев Ю.С. Методика определения токсичности проб поверхностных пресных, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных вытяжек из почвы, осадков сточных вод и отходов по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer). М., 2007. 37 с.
4. 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.
5. Дину М.И. Влияние комплексообразующих способностей гуминовых и фульвокислот с ионами железа (III), железа (II) и цинка (II) на содержание лабильных фракций отдельных металлов // Матер. III Всерос. конф. по водной токсикологии, посвященной памяти Б.А. Флерова. Борок: Ин-т биологии внутренних вод, 2008. Ч. 1. С. 26–29.
6. Ильин В.Б. Тяжелые металлы в городских почвах // Сиб. экол. журн. 2002. № 3. С. 285–292.
7. Линник П.Н. Тяжелые металлы в поверхностных водах Украины: содержание и формы миграции // Гидробиол. журн. 1999. Т. 35. № 1. С. 22–42.
8. Линник П.Н., Набиванец Б.И. Формы миграции металлов в пресных поверхностных водах Л.: Гидрометеоиздат, 1986. 241 с.
9. Малева М.Г., Некрасова Г.Ф., Безель В.С. Реакция гидрофитов на загрязнение среды тяжелыми металлами // Экология. 2004. № 4. С. 266–272.
10. Мур Дж.В., Рамамурти С. Тяжелые металлы в природных водах. Контроль и оценка влияния М.: Мир, 1987. 288 с.
11. Gondar D., Thacker S.A., Tipping E., Baker A. Functional variability of dissolved organic matter from the surface water of a productive lake // Water Res. 2008. № 42. P. 81–90/
12. Gueguen C., Koukal B., Dominik J., Pardos M. Competition between alga (*Pseudokirchneriella subcapitata*), humic substances and EDTA for Cd and Zn control in the algal assay procedure (AAP) medium // Chemosphere. 2003. № 53. P. 927–934.
13. Koukal B., Gueguen C., Pardos M., Dominik J. Influence of humic substances on the toxic effects of cadmium and zinc to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* // Chemosphere. 2003. № 53. P. 953–961.
14. 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. V. 35. № 4. P. 460–468.
15. Sunda W.G., Lewis J.A.M. Effect of complexation by natural organic ligands on toxicity of copper to a unicellular alga, *Monochrysis lutheri* // Limnol.Oceanogr. 1978. № 23. P. 870–876.