

А.С. Коновалов

ОЦЕНКА ДЕТОКСИКАЦИИ ГУМАТАМИ РАСТВОРОВ СОЛИ МЫШЬЯКА
МЕТОДАМИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ*

Байкальский музей ИНЦ СО РАН (Иркутск)

Методами биотестирования исследованы токсичность и детоксикация модельных растворов соли мышьяка (Na_3AsO_4). Показано снижение токсического действия мышьяка при помощи препаратов гуминовых веществ («Powhumus», «Лигногумат», «Гумат-80»). Изучена возможность использования гуминовых веществ для детоксикации мышьякового загрязнения в модельных опытах.

Для изучения возможности детоксикации модельного загрязнения солями мышьяка применяли гуминовые препараты (ГП) Powhumus (гумат из леонардита «Humintech Ltd.», Германия), Гумат-80 (гумат калия ООО «Аграрные технологии») и Лигногумат (гумат калия ООО «НПО «РЭТ»).

В качестве тест-объектов брали семена *Lepidium sativum* L. (ЗАО «Иркутские семена»), водоросли (*Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb.).

Токсичность оценивали по влиянию на прорастание семян и длину корней проростков *L. sativum*, по изменению интенсивности флуоресценции хлорофилла клеток водорослей *S. quadricauda*. Полученные результаты статистически обработаны с использованием общепринятых методов при $p \leq 0,05$.

Арсенит натрия в концентрации 8 мг/гм^3 угнетал прорастание семян кресс-салата на $70,1 \pm 6,9 \%$. При содержании $9 \text{ мг/гм}^3 \text{ Na}_3\text{AsO}_4$ снижал количество проросших семян на $75,1 \pm 6,6 \%$. LC_{50} для данного метода составила $5,7 \text{ мг/гм}^3$.

При применении ГП в концентрации $0,2 \text{ г/гм}^3$ наблюдали снижение токсического эффекта арсенита натрия на $25,3 \pm 2,7 \%$. Наибольшую эффективность в отношении снижения токсичности модельного мышьякового загрязнения наблюдали при использовании Powhumus в концентрации $1,0 \text{ г/гм}^3$ — количество проросших семян составило $90,1 \pm 8,7 \%$.

Следующим этапом явилось биотестирование с использованием метода регистрации снижения уровня флуоресценции хлорофилла клеток водорослей *S. quadricauda*. Величина LC_{50} для данного метода составила $1,5 \text{ мг/гм}^3$.

Концентрации арсенита натрия $1,8$ и $1,5 \text{ мг/гм}^3$ подавляли уровень флуоресценции хлорофилла более чем на 30% (уровень флуоресценции хлорофилла составил $26,4 \pm 3,2 \%$ и $54,5 \pm 6,1 \%$ соответственно). Powhumus в концентрации $0,05 \text{ г/гм}^3$ снижал токсичность проб на $36,7 \pm 3,9 \%$ и $31,8 \pm 3,4 \%$ соответственно.

Методика биотестирования по изменению интенсивности флуоресценции хлорофилла клеток водорослей *S. quadricauda* показала большую чувствительность и скорость получения ответа, чем методика по оценке влияния на прорастание семян и длину корней проростков *L. sativum*.

* Работа частично проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Соглашения: ГК № 14.В37.21.0785 от 24.08.12, ГК № 11.519.11.5016 от 28.10.11) и Программы стратегического развития.

Ключевые слова: детоксикация, мышьяк, мышьяковое загрязнение, гуминовые препараты, биотестирование

EVALUATION OF DETOXIFICATION ARSENIC SALT SOLUTION BY HUMATES
BY BIOTESTING

A.S. Konovalov

Baikal museum of ISC SD RAS, Irkutsk

We investigated toxicity and detoxification of model solutions of arsenic salts (Na_3AsO_4) by biotesting. Decreasing the toxicity of arsenic using humic substances («Powhumus», «Lignohumate», and «Humate-80») is shown. The possibility of use of humic substances to detoxify arsenic contamination in model experiments is studied. To study the possibility of detoxification model contamination by salt of arsenic we used humic substances Powhumus (humate from leonardite «Humintech Ltd.», Germany), Humate-80 (potassium humate LLC «Agricultural Technology») and Lignohumate (potassium humate «SPA «RET»).

As test objects seeds of *Lepidium sativum* L. (JSC «Irkutsk seeds») and algae (*Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb.) were taken.

Toxicity was evaluated by effect on seed germination and root length of *L. sativum*, the change in intensity of chlorophyll fluorescence of algae cells *S. quadricauda*. The significance of differences was determined by Student's test. The table shows the mean values and standard deviations for $p > 0,95$.

Sodium arsenite at a concentration of 8 мг/гм^3 inhibited seed germination of cress to $70,1 \pm 6,9 \%$. The content of $9 \text{ мг/гм}^3 \text{ Na}_3\text{AsO}_4$ reduced the number of germinated seeds to $75,1 \pm 6,6 \%$. LC_{50} for this method was equal $5,7 \text{ мг/гм}^3$.

In applying the HS in a concentration of $0,2 \text{ г/гм}^3$ a decrease toxicity of sodium arsenite to $25,3 \pm 2,7 \%$ was observed. The most effective model in reducing the toxicity of arsenic contamination was observed at a concentration of Powhumus $1,0 \text{ г/гм}^3$ — the number of germinated seeds was $90,1 \pm 8,7 \%$.

The next stage was the bioassay using the registration reducing chlorophyll fluorescence of algae cells *S. quadricauda*. Value of LC_{50} for this method was $1,5 \text{ мг/гм}^3$.

The concentration of sodium arsenite $1,8$ and $1,5 \text{ мг/гм}^3$ suppressed levels of chlorophyll fluorescence by more than 30% (the level of chlorophyll fluorescence was $26,4 \pm 3,2 \%$ and $54,5 \pm 6,1 \%$ respectively). Powhumus in concentration of $0,05 \text{ г/гм}^3$ reduced toxicity of samples for $36,7 \pm 3,9 \%$ and $31,8 \pm 3,4 \%$, respectively.

Bioassay method of changing the intensity of chlorophyll fluorescence of cells of algae *S. quadricauda* showed greater sensitivity and speed of the response than the method of assessing the impact on seed germination and seedling root length of *L. sativum*.

Key words: detoxification, arsenic, arsenic pollution, humic substances, biotesting

Одним из негативных моментов влияния антропогенной деятельности на окружающую среду является загрязнение последней высокотоксичными соединениями мышьяка [6].

Гуминовые вещества представляют собой высокомолекулярные склонные к ассоциации полидисперсные, полифункциональные природные лиганды. Их комплексообразующая способность обусловлена присутствием карбоксильных, фенольных, а также других функциональных групп. Гуминовые вещества способны связывать загрязнители и за счет ван-дер-ваальсовых и донорно-акцепторных взаимодействий. Во многих случаях после связывания гуминовыми производными веществами токсичных веществ агрессивный потенциал загрязнителей существенно уменьшается [10].

Цель работы: изучение возможности использования гуминовых веществ для детоксикации мышьякового загрязнения в модельных опытах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали соль Na_3AsO_4 марки х.ч.

Для изучения возможности детоксикации модельного загрязнения солями мышьяка применяли гуминовые препараты Powhumus (гумат из леонардита «Humintech Ltd.», Германия), Гумат-80 (гумат калия ООО «Аграрные технологии») и Лигногумат (гумат калия ООО «НПО «РЭТ»).

В качестве тест-объектов брали семена *Lepidium sativum* L. (ЗАО «Иркутские семена»), водоросли (*Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb.), равноресничные инфузории (*Paramecium caudatum* Ehrenberg).

Токсичность оценивали по влиянию на прорастание семян и длину корней проростков *L. sativum*, по изменению интенсивности флуоресценции хлорофилла клеток водорослей *S. quadricauda*, по выживаемости инфузорий *P. caudatum*.

Семена *L. sativum* помещали в чашки Петри, куда добавляли 5 см³ испытуемого раствора. Чашки выдерживали сутки при температуре 31 °С. После

подсчета проросших семян чашки инкубировали еще сутки и измеряли длины корешков проростков кресс-салата [4, 13].

Измерение уровня флуоресценции проводили на «Флюорат-02-3М» в режиме непрерывных измерений. Для каждой пробы рассчитывали среднее значение уровня флуоресценции по двум измерениям. Замеры уровня флуоресценции в исследуемых колбах проводили через трое суток инкубирования на люминистате [1, 14].

Острое токсическое действие исследуемой пробы на парameций оценивали по их смертности за 24-часовой период экспозиции. Критерием острой токсичности служила выживаемость 50 % и менее парameций за сутки в исследуемой пробе [2].

Все эксперименты проводили не менее чем в 5 независимых опытах с 3 параллельными измерениями в каждом. Для обработки полученных данных использовали пакет программ MS Excel. Достоверность различия определяли с помощью критерия Стьюдента. В таблицах представлены средние значения и их стандартные отклонения при $p > 0,95$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе первого этапа работы оценивали влияние различных гуминовых препаратов (ГП) в диапазоне концентраций 0,1–10 г/дм³ на семена кресс-салата. Результаты биотестирования, представленные на рисунке 1.

Все исследованные препараты гуминовых веществ (Powhumus, Лигногумат, Гумат-80) не оказывали негативного влияния на прорастание семян в концентрациях от 0,1 до 2 г/дм³. Вместе с тем при содержании выше 2 г/дм³ наблюдали снижение количества проросших семян кресс-салата. Впрочем, даже при концентрации ГП 9 г/дм³ проросло $50,2 \pm 4,8$ % семян. Опираясь на полученные результаты, в дальнейшей работе использован диапазон концентраций от 0,1 до 1,0 г/дм³.

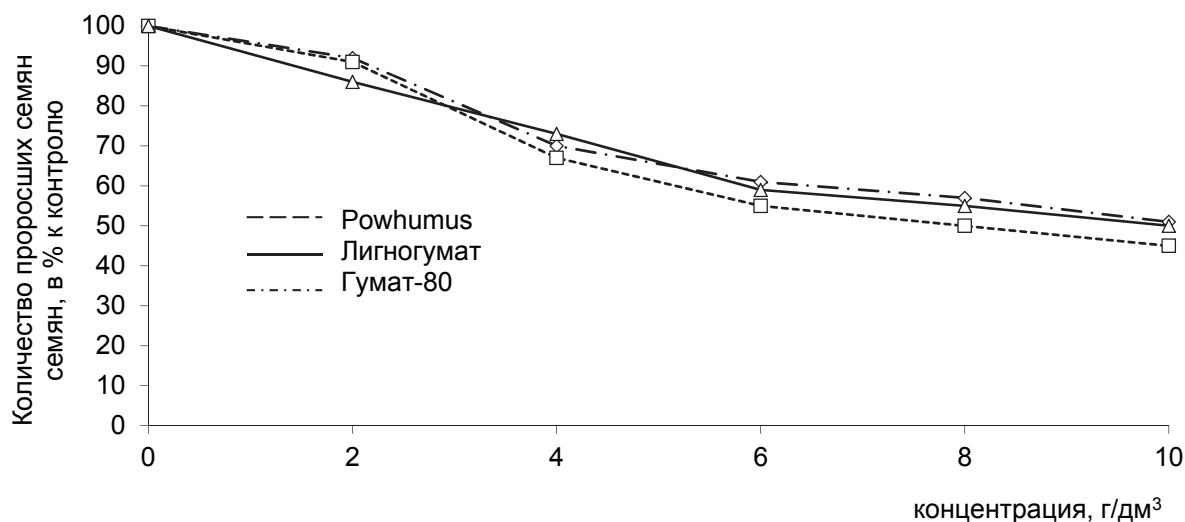


Рис. 1. Влияние различных концентраций ГП на прорастание семян кресс-салата (в % к контролю – дехлорированная вода).

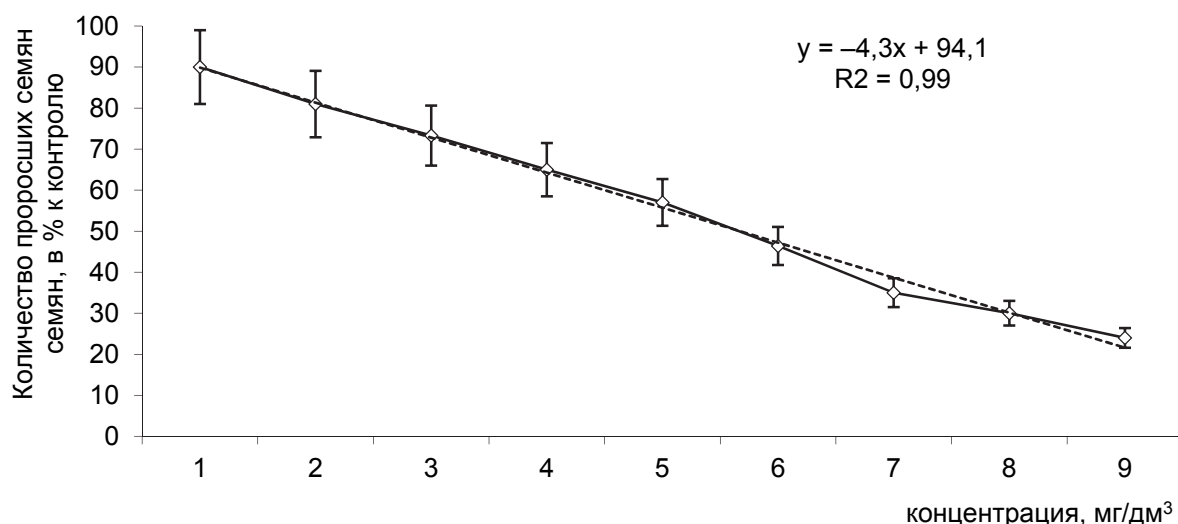


Рис. 2. Влияние различных концентраций растворов Na_3AsO_4 на прорастание семян кресс-салата (в % к контролю – дехлорированная вода).

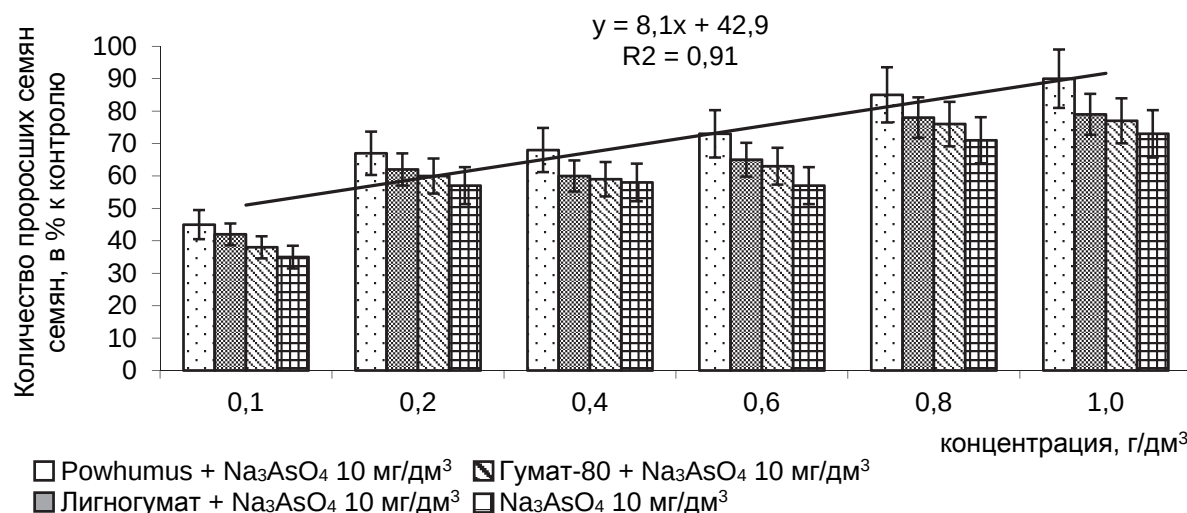


Рис. 3. Совместное влияние ГП и растворов Na_3AsO_4 на прорастание семян кресс-салата (в % к контролю – дехлорированная вода).

Из рисунка 2 следует, что арсенит натрия в концентрации 8 мг/дм³ угнетал прорастание семян кресс-салата на $70,1 \pm 6,9\%$. При содержании 9 мг/дм³ Na_3AsO_4 снижал количество проросших семян на $75,1 \pm 6,6\%$. LC_{50} для данного метода составила 5,7 мг/дм³.

Провели серию опытов с использованием ГП Powhumus, Лигногумат, Гумат-80 в концентрациях 0,1 – 1,0 г/дм³ и растворов 10 мг/дм³ арсенита натрия (рис. 3).

При применении ГП в концентрации 0,2 г/дм³ наблюдали снижение токсического эффекта арсенита натрия на $25,3 \pm 2,7\%$. Наибольшую эффективность в отношении снижения токсичности модельного мышьякового загрязнения наблюдали при использовании Powhumus в концентрации 1,0 г/дм³ – количество проросших семян составило $90,1 \pm 8,7\%$.

Следующим этапом явилось биотестирование с использованием метода регистрации снижения уровня флуоресценции хлорофилла клеток водорослей *S. quadricauda* (рис. 4).

Величина LC_{50} для данного метода составила 1,5 мг/дм³.

Как видно из рисунка 5, концентрации арсенита натрия 1,8 и 1,5 мг/дм³ подавляли уровень флуоресценции хлорофилла более чем на 30 % (уровень флуоресценции хлорофилла составил $26,4 \pm 3,2$ и $54,5 \pm 6,1\%$ соответственно). Powhumus в концентрации 0,05 г/дм³ снижал токсичность проб на $36,7 \pm 3,9$ и $31,8 \pm 3,4\%$ соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, для изучения токсичности и детоксикации мышьякового загрязнения пригодны такие методы биотестирования, как оценка влияния на: прорастание семян и длину корней проростков кресс-салата, уровень флуоресценции хлорофилла клеток водорослей *S. quadricauda*, выживаемость инфузорий *P. caudatum*, уровень биолуминесценции бактерий *P. phosphoreum*, а также определение влияния на скорость пенообразования в горожовой суспензии. ГП «Powhumus», «Лигногумат», «Гу-

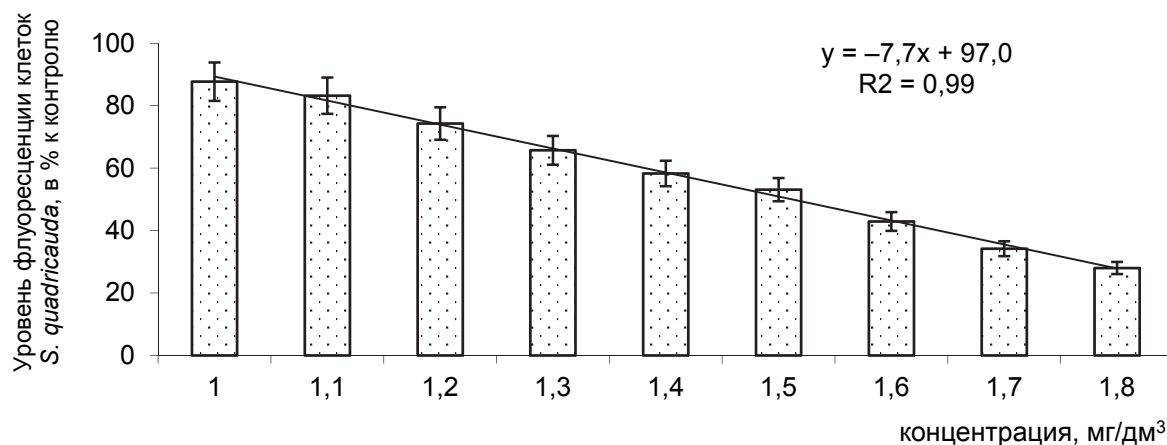


Рис. 4. Влияние различных концентраций растворов Na_3AsO_4 на флуоресценцию клеток водорослей *S. Quadricauda* (в % к контролю – дехлорированная вода).

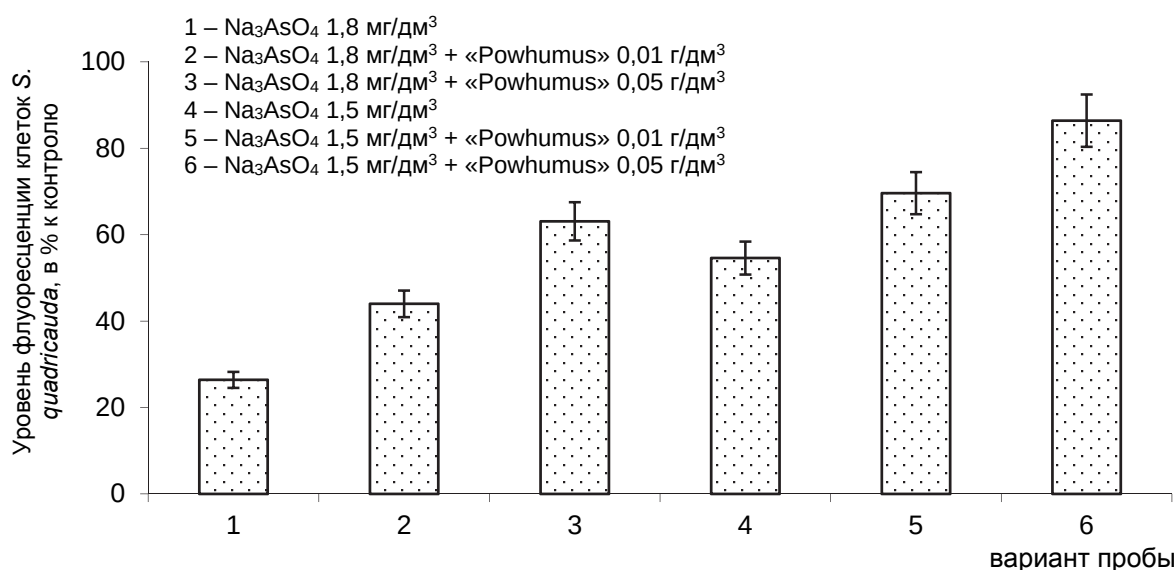


Рис. 5. Совместное влияние Powhumus и растворов Na_3AsO_4 на флуоресценцию клеток водорослей *S. quadricauda* (в % к контролю – дехлорированная вода).

мат-80» эффективно снижают токсическое действие мышьякового загрязнения в модельных опытах.

Построен следующий ряд по чувствительности использованных биотестов: изменение уровня биолюминесценции бактерий *P. phosphoreum* > изменение скорости пенообразования в дрожжевой суспензии > изменение уровня флуоресценции хлорофилла клеток водорослей *S. quadricauda* > прорастание семян *L. sativum* > выживаемость инфузорий *P. caudatum*.

По скорости получения ответа биотесты можно расположить в следующем порядке: изменение уровня биолюминесценции бактерий *P. phosphoreum* > выживаемость инфузорий *P. caudatum* > изменение интенсивности флуоресценции хлорофилла клеток водорослей *S. quadricauda* > прорастание семян *L. sativum*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и

отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей. — М.: Акварос, 2007. — 48 с.

2. Методика определения токсичности отходов, почв, осадков сточных, поверхностных и фунтовых вод методом блокирования с использованием равноресничные инфузии (*Paramecium caudatum* Ehrenberg) // ФР. 1.39.2006.02506 ПНДФ 14.1:2:3.13-06 16.1:2:3.10-06 М.: МГУ им. М.В. Ломоносова. — 2006. — 31 с.

3. Почва, очистка населенных мест, отходы производства и потребления, санитарная охрана почв: Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в почве. ГН 2.1.7.2041-06. — М., 2006.

4. Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. — М.: РЭФИА, НИИ-Природа, 2002. — 118 с.

5. Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. ГОСТ 12.1.007-76

6. Arsenic in the environment — Part I: Cycling and characterization / ed. J.O. Nriagu. — New York: John Wiley & Sons, Inc., 1994.
7. Buschmann J., Kappeler A., Indauer U., Kistler D. et al. Arsenite and arsenate binding to dissolved humic acids: influence of pH, type of humic acid, and aluminum // Environ. Sci. Technol. — 2006. — Vol. 40. — P. 6015—6020.
8. Haw-Tarn Lin, Wang M.C., Gwo-Chen Li. Complexation of arsenate with humic substance in water extract of compost // Chemosphere. — 2004. — Vol. 56. — P. 1105—1112.
9. Humic substances: structures, models and functions / Eds: E.A. Ghabbour, G. Davies. — Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2001.
10. Perminova I., Grechishcheva N., Kovalevskii D., Kudryavtsev A. et al. Quantification and prediction of the detoxifying properties of humic substances related to their chemical binding to polycyclic aromatic hydrocarbons // Environmental science and technology. — 2001. — Vol. 35, N 19. — P. 3841—3848.
11. Saada A., Breeze D., Crouzet C., Cornu S. et al. Adsorption of arsenic (V) on kaolinite and on kaolinite-humic acid complexes. Role of humic acid nitrogen groups // Chemosphere. — Vol. 51. — 2003. — P. 757—763.
12. Steinberg C.E.W. Ecology of humic substances in freshwaters. — Heidelberg: Springer, 2003.
13. Stom D.I., Effect of Polyphenols on Shoot and Root Growth and on Seed Germination // Biologia Plantarum. — 1982. — Vol. 24 (1). — P. 1—6.
14. Stom D.I., Geel T.A., Schachova G.V., Kuznetsov A.M. et al. Bioluminescent method in studying the complex effect of the various components // Archives of Environ. Contam. Toxicol. — 1992. — Vol. 22. — P. 203—208.
15. Tan K.H. Humic matter in soil and the environment. Principles and Controversies. — New York: Marcel Dekker Inc., 2003.
16. Warwick P., Inam E., Evans N. Arsenic's interaction with humic acid. — Department of Chemistry, Loughborough University, 2004.

Сведения об авторах

Коновалов Александр Сергеевич — аспирант третьего года подготовки Байкальский Музей ИНЦ СО РАН (664003, г. Иркутск, а/я 24; тел.: 8-902-173-44-65; e-mail: fray87@live.ru, stomd@mail.ru)