

ВЛИЯНИЕ ФУЛЬВОКИСЛОТ НА ТОКСИЧНОСТЬ ФЛУОРАНТЕНА И ФЕНАНТРЕНА В ВОДНОЙ СРЕДЕ

И. П. Перминова, Н. Ю. Ященко, В. А. Полюнов,
В. С. Петросян и П. С. Венедиктов

Московский Государственный университет,
химический факультет, 119899, Москва

(Поступила в редакцию 20 ноября 1994 г.,
принята к опубликованию 3 марта 1995 г.)

На основании результатов токсикологических экспериментов для модельных систем флуорантен (фенантрен) – тест-объект в присутствии и отсутствии фульвокислот установлено наличие существенного эффекта детоксикации фульвокислот, пропорционального их содержанию в растворе. В качестве механизма, обеспечивающего снижение токсичности ПАУ в присутствии фульвокислот, предложено образование ассоциатов между этими веществами, сопровождающееся уменьшением концентрации свободно-растворенного ПАУ в растворе.

Ключевые слова: фульвокислоты, ПАУ, флуорантен, фенантрен, токсичность, *Daphnia magna*, *Chlorella vulgaris*, детоксикация.

Полиядерные ароматические углеводороды (ПАУ) являются одним из наиболее опасных классов веществ, загрязняющих водную среду, что определяется их мутагенными, канцерогенными и токсическими свойствами. Согласно целому ряду работ [1–10], при поступлении в природные водные экосистемы биологическая активность ПАУ может существенно изменяться в результате взаимодействия с растворенным органическим веществом, которое на 60–80% представлено гумусовыми (гуминовыми и фульво-) кислотами (ГК). При этом большинство авторов уделяет основное внимание влиянию ГК на коэффициент биоаккумуляции ПАУ [3–10, 12], тогда как изменение их токсичности в присутствии ГК изучено значительно меньше [5, 11–14].

Практически все опубликованные результаты указывают на существенное уменьшение коэффициента биоаккумуляции ПАУ в присутствии ГК, при этом эффект усиливается по мере повышения трофического уровня водных организмов [14]. Принимая во внимание, что токсичность многих ПАУ пропорциональна коэффициенту их аккумуляции в биоте, можно ожидать наличия аналогичных закономерностей и для воздействия ГК на токсичные свойства ПАУ. Однако окончательные вы-

воды о существовании такого эффекта и его значимости могут быть сделаны только на основании токсикологических экспериментов для модельных систем ПАУ–тест–объект в присутствии ГК.

В связи с изложенным наша работа была посвящена исследованию влияния фульвокислот природных вод на токсичность модельных ПАУ для зеленой водоросли *Chlorella vulgaris* и представителя ракообразных — *Daphnia magna*.

Экспериментальная часть

Препарат фульвокислот (ФК) был выделен из вод реки Москвы в районе Звенигорода сорбцией на диэтиламиноэтил (ДЭАЭ)-целлюлозе, предварительно переведенной в ОН-форму по процедуре [15, 16]. Элюирование ФК осуществляли 0.1 М NaOH. Обессоливание раствора проводили на катионообменнике «Dowex-50». Данные ИК-спектроскопии для выделенного препарата ФК приведены в табл. 1. Полученные данные хорошо согласуются с литературными [3, 19].

Для проведения экспериментов в качестве модельных ПАУ использовали флуорантен (F1), фенантрен (Phen) и бенз(а)-пирен (B(a)P), с содержанием основного вещества не ниже 97, 97 и 98% соответственно.

Таблица 1

Данные ИК-спектроскопии препарата ФК, выделенного из вод р. Москвы

Функциональные группы	Полосы поглощения (ν , см ⁻¹)
R-OH, Ar-OH	3690-3300, 3400-3000*
R-H	2950-22850, 1460-1350**
>C=O	1750-1680, 1630*
>C=C<	1630
R-COO	1460-1350
>C=oo	1200

*Колебания для функциональных групп, связанных водородной связью. **Деформационные колебания.

Приготовление водных растворов ПАУ осуществляли внесением аликвоты ацетонового раствора исследуемого углеводорода на стенки бутылей емкостью 5 л. После испарения растворителя добавляли 5 л дистиллированной воды. Для достижения равновесной концентрации емкости встряхивали на механическом вибраторе в течение суток. Содержание ПАУ в водных растворах контролировали спектрофотометрически с предварительным концентрированием трехкратной экстракцией *n*-гексаном. Определение степени извлечения исследуемых ПАУ проводили методом «введено-найдено». Результаты приведены в табл. 2.

Постановку токсикологических экспериментов осуществляли с применением методики альгологического биотестирования, описанной в работах [20-23]. В качестве токсикологической мишени использовали культуру одноклеточной зеленой водоросли

Chlorella vulgaris и рачков-фильтратов *Daphnia magna*.

В экспериментах с хлореллой в качестве тест-функции использовали фотосинтетическую активность водорослей, которую регистрировали, измеряя быструю флуоресценцию. В опытах с *Daphnia magna* тест-функцией служила пищевая активность дафний, определяемая по уменьшению концентрации клеток хлореллы, регистрируемой по интенсивности флуоресценции водорослей. Активность питания (Na) дафний рассчитывали по формуле:

$$Na = \ln \frac{(Ft - G) \cdot k \cdot V}{Ft_0 - G} \cdot \frac{1}{nt}$$

где Ft_0 и Ft — значения флуоресценции в начальный момент времени и спустя время t , соответственно; G — величина, учитывающая фон прибора; V — объем тестируемого раствора; n — количество дафний; k — поправочный коэффициент. Единица измерения Na — миллилитры на 1 дафнию в час [20].

Результаты и их обсуждение

Исследование диапазона токсичности ПАУ для зеленой водоросли *Chlorella vulgaris* показало, что достоверный токсический эффект (снижение фотосинтетической активности водорослей более чем на 25%) наблюдается только для экстремально-высоких концентраций, на порядок превышающих их растворимость в воде (табл. 3). Как было установлено, для растворов флуорантена этот диапазон составляет 0.5-2, а для фенантрена — 2.5-25 мг·л⁻¹. Это обстоятельство заставляет сделать вывод о неприменимости альгологического биотес-

Таблица 2

Воспроизводимость и правильность экстракционно-спектрофотометрического метода определения ПАУ в водных растворах ($n = 3$, $P = 0,95$).

ПАУ	Введено мкг·л ⁻¹	Найдено мкг·л ⁻¹	$\rho \frac{t_p}{V_n}$	Доверительный интервал	Полнота извлечения, %
Фенантрен	420	420	20	420 ± 20	100
Бенз(а)пирен	3.65	3.63	0.06	3.63 ± 0.06	99
Флуорантен	160	150	20	150 ± 20	94

Таблица 3

Изменение фотосинтетической активности хлореллы в присутствии ПАУ в условиях шестичасового эксперимента

ПАУ	Водная растворимость, мг·л ⁻¹	Концентрация, мг·л ⁻¹	Фотосинтетическая активность, % от контроля*			
			0 час	2 час	4 час	6 час
Фенантрен	1.6	0.450	86	90	90	100
		14.0	90	66	-	-
Флуорантен	0.265	0.117	89	89	95	94
		4.0	98	0	0	0
Бенз(а)пирен	0.003	0.00423	98	100	100	100
		2.2	113	0	0	0

*Фотосинтетическая активность контрольного раствора принята за 100%.

тирования качества водной среды при использовании тест-объекта зеленой водоросли *Chlorella vulgaris* для индикации токсического воздействия ПАУ.

Принимая во внимание сведения о возрастании токсического эффекта ПАУ для гидробионтов по мере продвижения вверх по трофической цепи [14], в качестве потенциально более чувствительного тест-объекта нами был выбран представитель ракообразных *Daphnia magna*. Действительно, как видно из табл. 4, токсическое воздействие модельных ПАУ на новый тест-объект проявляется уже на уровне их растворимости в воде. При этом максимальный токсический эффект наблюдался и в случае фенантрена и флуорантена.

Таблица 4

Пищевая активность *Daphnia magna* в присутствии ПАУ (время инкубации — сутки)

ПАУ	Концентрация ПАУ мг·л ⁻¹	Пищевая активность, % от контроля
Флуорантен	0.00	100
	0.06	20
	0.13	0
Фенантрен	0.00	100
	0.5	0
Бенз(а)пирен	0.00	100
	0.0047	33

В связи вышеизложенным дальнейшие токсикологические эксперименты по исследованию влияния ФК на токсичность ПАУ проводили с использованием модельных углеводородов флуорантена и фенантрена и тест-объекта *Daphnia magna*.

На рис. 1. показана динамика токсического действия флуорантена на пищевую

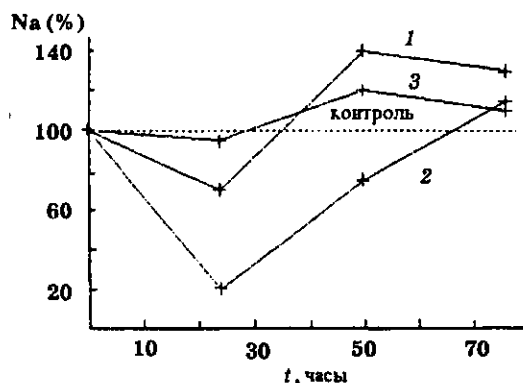


Рис. 1. Динамика токсического действия флуорантена (0.06 мг·л⁻¹) на активность питания дафний (% от контроля) в присутствии ФК (12 мг·л⁻¹) (1), без ФК (2), контроль с ФК (3).

активность дафний в присутствии ФК. Как видно из представленных результатов, токсический эффект этого ПАУ нивелируется на 60% в присутствии фульвокислот. Результаты аналогичных экспериментов с фенантреном приведены на рис. 2.

Наблюдаемый детоксицирующий эффект ФК по отношению к исследуемому ПАУ (рис. 1, 2), по-видимому, определится снижением концентрации свободно-растворен-

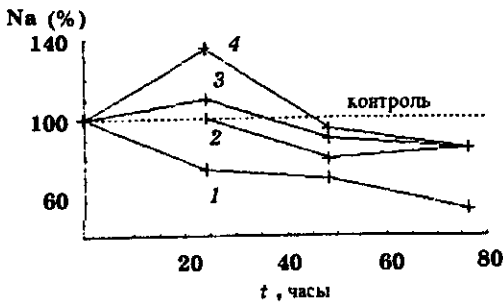


Рис. 2. Динамика действия финантрена (0.5 мг·л⁻¹) на активность питания дафний (% от контроля) в присутствии ФК (мг·л⁻¹): 1-0, 2-1, 3-10, 4-50.

ных углеводов за счет их ассоциации с ФК. Подтверждением наличию «ассоциативных» взаимодействий ФК с ПАУ является углубление процесса детоксикации по мере увеличения содержания ФК, установленное при исследовании коэффициента

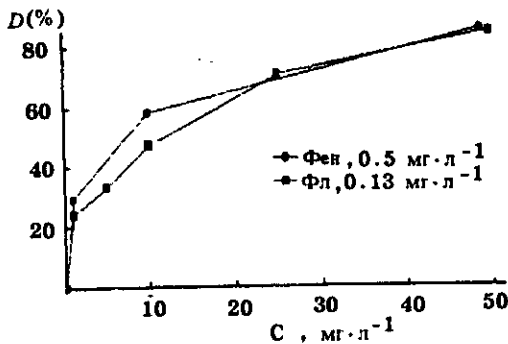


Рис. 3. Детоксикация ПАУ фульвокислотами при взаимодействии с *Daphnia magna*.

детоксикации ПАУ от концентрации ФК (рис. 3). Процент детоксикации рассчитывали по формуле:

$$D (\% \text{ детоксикации}) = 1 - \frac{A_0}{A_d} \cdot \frac{A_d - A_{d+i}}{A_0 - A_i}$$

где A — пищевая активность дафний; A_0 — в контрольном опыте; A_d — в присутствии ФК; A_i — в присутствии ПАУ; A_{d+i} — в присутствии ФК и ПАУ.

Полученные зависимости наглядно демонстрируют существенное влияние ГК на токсические свойства ПАУ. Как видно из рис. 3, 50%-ная детоксикация флуорантена и феноантрена наблюдается уже при достижении концентрации ФК 10 мг·л⁻¹, что является средней величиной их содержания в пресноводных водоемах [24]. Учитывая то обстоятельство, что в природных водных экосистемах содержание ПАУ на 2–3 порядка ниже, чем в исследованных модельных растворах, можно сделать вывод о некорректности оценок токсического воздействия ПАУ на водные организмы согласно существующей системе ПДК, без учета влияния ГК. Особую важность этот фактор имеет для высокоцветных вод, формы существования ПАУ в которых в значительной степени определяются взаимодействием гумусовыми кислотами и, следовательно, оказывают непосредственное влияние на токсический эффект ПАУ для водных организмов.

Литература

- McCarthy J.F. and Bartele S.M. (1988) Functional Testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals. ASTM STP 988, J. Cainns and J.R. Pratt, Eds., Amer. Soc. for Testing and Materials, Philadelphia, 3.
- McCarthy S.F. and Black M.C. (1988) *Aquatic Toxicol and Hazard Assessment: 10th Volum ASTM STD 971*. W.J. Adams. Amer. Soc. for Testing and Materials: Philadelphia, 233.
- McCarthy P. and Suffet I.H. (1989) *Aquatic Humic Substances: Influence on Fate and Treatment of Pollutants*. Washington: Amer. Chem. Soc., 377.
- McCarthy J.F., Jimenez B.D. and Barbee T. (1985) Effect of dissolved humic material on accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons: structure-activity relationships. *Aquatic Toxicol.* 7, 15–24.
- Black M.C., McCarthy J.F. (1988) Dissolved organic macromolecules reduce the uptake of hydrophobic organic contaminants by the gills of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Environ. Toxicol. Chem.* 7, 593–600.
- Broman D., Naf C., Lundbergh I. and Zebuhr Y. (1990) An in situ study on the distribution, biotransformation and flux of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) in an aquatic food chain (seston-*Mytilus edulis* L. – *Somateria mollissima* L.) from the Baltic: an ecotoxicological perspective. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 429–442.
- McCarthy J.F. (1983) Role of particulate organic matter in decreasing accumulation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Daphnia magna*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 12, 559–568.
- Southworth G.R., Beauchamp J.J. and Schmie-

- der P.K. (1987) Bioaccumulation potential of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Daphia pulex*. *Water Res.* 12, 973-977.
9. Kukkonen J., Oikari A., Johnson S. and Gjesing E. (1989) Effect of humus concentrations on benzo(a)pyren accumulation from water to *Daphnia magna*: comparison of natural waters and standard preparations. *Sci. Total Environ.* 79, 197-207.
11. Zika R.G. and Cooper W.J. (1987) *Photochemistry of Environmental Aquatic Systems*. Amer. Chem. Soc. 191-204.
12. Kukkonen J. and Oikari A. (1987) Effect of aquatic humus on accumulation and toxicity of some organic micropollutants. *Sci. Total Environ.* 62, 399-402.
13. Khan S.U. (1980) Kinetics of hydrolysis of atrazine in aqueous fulvic acid solution. *Pestic. Sci.* 9, № 1, 38-43.
14. Neff J.M. (1979) *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*, London: Applied Sci. Pub. LTD, 353.
15. Miles C.J., Tuschall J.R. and Brezonic P.L. (1983) Isolation of aquatic humus with diethylaminoethyl-cellulose. *Anal. Chem.* 55, 410-411.
16. Nomizu T., Sanji M., Hiraide M. and Mizuike A. (1989) Determination of humic and fulvic acids in river waters by concentration with anion exchanger followed by centrifugation. *Anal. Sci.* 5, 363-365.
17. Landrum P.E., Nihart S.R., Eadie B.J. and Herche L.R. (1987) Reduction in bioavailability of organic contaminants to the amphipod *Pontoporeia hoyi* by dissolved organic matter of sediment interstitial waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 6, 11-20.
18. Landrum P.F., Reinhold M.D., Nihart S.R. and Eadie B.J. (1987) Predicting the bioavailability of organic xenobiotics to *Pontoporeia hoyi* in the presence of humic and fulvic materials and natural dissolved organic matter. *Environ. Toxicol. Chem.* 4, 459-467.
19. Schnitzer M. and Khan S.U. (1972) *Humic Substances in the Environment*. New York: Marcel Dekker, 372.
20. Филенко О.Ф. (1988) *Водная токсикология*. Черногловка: МГУ, 155 с.
21. Филенко О.Ф. (1989) *Методы биотестирования качества водной среды*. М.: МГУ, 124 с.
22. Брызгалов В.А. и Хоружая Т.А. (1987) *Методы биоиндикации и биотестирования природных вод*. Л.: Гидрометеоиздат, Вып. 1, 152.
23. Маторин Д.Н., Вавилин Д.В. и Венедиктов П.С. (1990) О возможности использования флуоресцентных методов для изучения питания ракообразных. *Биолог. науки*. 1, 146-152.
24. Harvey G.R., Boran D.A. and Tokar J.M. (1983) The structure of marine fulvic and humic acids. *Mar. Chem.* 12, 119-132.