

**Экотоксикологическая оценка гуминовых препаратов
разного происхождения с применением микроводорослей
*Scenedesmus quadricauda***

© 2009. Е.В. Федосеева¹, аспирант, В.А. Терехова^{1,2}, д.б.н., зав. лаб.,
О.С. Якименко¹, к.б.н., с.н.с., М.М. Гладкова¹, студент,
¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
²Институт проблем экологии и эволюции РАН,
e-mail: feodoseeva@yandex.ru, vterekhova@gmail.com

Результаты биотестирования показали, что реакция микроводорослей на гуминовые препараты (ГП) зависит от насыщенности среды питательными элементами. В условиях, когда питательность среды снижена, проявляются различия в воздействии ГП разного происхождения. ГП из торфов и сапропелей (в концентрации 0.005–2 г/л), насыщенных веществами кислоторастворимой фракции, способны к большей стимуляции роста водорослей, чем гуматы «угольного» происхождения с большим содержанием в своём составе гуминовых кислот.

Acute bioassay on microalgae *Scenedesmus quadricauda* demonstrated the unequal reply on humates, which was depending on media enrichment. The remarkable differences in tests with humates (0.005–2 g L⁻¹) of different origin were shown under low nutrition. The stimulation of algal growth was stronger by humates from peat and sapropel – «plant-origin» with high contents of acid solution fraction, than it was by «coal-origin» humates with high content of humic acids.

Ключевые слова: гуматы, токсичность, биотестирование,
зелёные протококковые водоросли

Key words: humates, toxicity, biotesting, green protococcal algae

Введение

Гуминовые вещества – природные высокомолекулярные полимеры нерегулярного строения – оказывают влияние на химические, физические и микробиологические свойства почв и водных сред, стимулируют рост и развитие растений [1–3 и др.]. Многие промышленные компании стали производить промышленные гуминовые препараты (ГП) из различных видов органического сырья и предлагать их на рынке в качестве стимуляторов роста растений, почвенных мелиорантов и детоксикантов для загрязнённых почв. Разнообразие сырья для производства ГП и технологических схем их получения обуславливают довольно широкую вариабельность свойств и эффективности ГП [4–7]. Одним из критериев качества и экологической безопасности этих продуктов является степень их токсичности по отношению к разным видам организмов, оценить которую возможно с помощью биотестирования. Поэтому актуален поиск таких методик биотестирования, которые позволили бы получить дифференцированный отклик тест-систем на препараты различного происхождения.

Биотестирование на водорослях широко используется для оценки качества компонентов окружающей среды и, в частности, для оценки влияния гуминовых веществ [8–10]. В настоящее время в реестр МВИ индексов токсичности природоохранного назначения (ПНД Ф) РФ включены методики, основанные на измерении индекса токсичности по изменению прироста численности клеток водорослей и изменению флуоресценции хлорофилла [11]. Предварительные наблюдения показали, что условия экспозиции тест-культур, в частности цветность препаратов и степень обогащённости среды развития водорослей, оказывают существенное влияние на результаты оценки экотоксичности.

Цель работы – оценить влияние ГП разного происхождения на микроводоросли, используя в качестве тест-параметра изменение прироста численности популяции клеток зелёных протококковых водорослей *S. quadricauda*. Задачи исследования заключались в выявлении: а) особенностей в проявлении токсических свойств ГП, полученных из растительного и углефицированного сырья и б) оценке влияния степени обогащённости

питательными компонентами среды на проявление тест-отклика.

Объекты и методы

Тест-культура и ход биотестирования. В работе использовали альгологически чистую культуру зелёных ценобиальных протоккокковых водорослей – *S. quadricauda* (Turp.) Vreb., широко применяемую для целей биотестирования [12, 13]. Культивирование водорослей проводили в колбах Эрленмейера на жидких питательных средах в люминистате при интенсивности света до 5000 люкс со сменой освещённости (16:8 ч) и при температуре 20–24 °С. Во избежание оседания клеток водорослей и для обогащения культуры CO₂ содержимое колб перемешивали 1-2 раза в сутки. Биотестирование проводили на основании методики (ФР.1.39.2007.03223), допущенной для целей государственного экологического контроля [14].

Согласно стандартной методике для оценки токсичности проб по реакции *S. quadricauda* используется среда Успенского 1: KNO₃ – 0,025 г/дм³; MgSO₄·7H₂O – 0,025 г/дм³; Ca(NO₃)₂·4H₂O – 0,144 г/дм³; KH₂PO₄·3H₂O – 0,025 г/дм³; K₂CO₃ – 0,0345 г/дм³; раствор FeCl₃·6H₂O с трилоном Б – 1 мл; растворы микроэлементов А и Б – по 1 мл [15]. Эксперименты с гуматами проводили при различной насыщенности питательных сред: кроме стандартной 100%-ной использовали разведённую в 10 раз (10%-ную) среду. Контрольной средой являлась среда Успенского 1 с соответствующим процентом насыщенности.

В опытных вариантах к питательной среде добавляли необходимые аликвоты маточных растворов ГП, так что концентрация гуматов в среде составляла: 0,005; 0,05 и 0,1 г/дм³. Посев производили внесением в контрольные и опытные растворы одинакового объёма маточной культуры водорослей, находящейся в экспоненциальной стадии роста до плотности 25–35 тыс. ед/см³. Экспозицию осуществляли в течение 72 ч при t = 22–25 °С.

Поскольку ГП, производимые из разных материалов, имеют различную окраску и оптическую плотность растворов, что может служить причиной искажения результатов при измерении флуоресценции, прямой счёт изменения численности клеток представляется более надёжным для их оценки. Поэтому измерение численности водорослей производили прямым счётом в камере Горяева. Тест-параметром считали индекс токсичности (ИТ):

$$Ит = (X_{опыт} - X_{конт}) / X_{конт} \cdot 100\%$$

где X_{конт} – численность особей (ценобиов) в контроле, X_{опыт} – в опыте (ед/см³).

Токсическое действие ГП оценивали по изменению прироста численности популяции клеток водорослей. Токсичными признавались пробы, в которых происходило снижение прироста численности клеток водорослей относительно контроля на 20% и более либо возрастание на 30% и более. Эксперименты проводили в 3-кратной повторности.

Гуматы и их свойства. Исследования проводили на ГП различного генезиса: коммерчески доступных гуматах из углей различной степени углефикации (бурого угля, леонарди-

Таблица

Наименование, источник происхождения и некоторые химические характеристики гуминовых препаратов

Источник, страна-производитель	Состав, технология производства	Аббревиатура	С, %	СГК, % к Собщ	С _{КРФ} , % к Собщ	СГК/СФК
Обогащены ГК						
Бурый уголь, РФ	гумат Na, твердофазная экстракция	BC-EnNa	43,1	73	25	2,9
Леонардит, Германия	гумат K	Le-PhK	39,0	79	20	4,0
Лигнит, США	гумат Na/K, с добавкой Si	Li-Ion	38,0	65	17	3,8
Обогащены веществами КРФ						
Сапропель+торф, РФ	гумат Na/K	Sa-Plod	34,6	52	47	1,1
Лигносульфонат, РФ	гумат Na	OW-LhNa	34,6	9	87	0,1
Лигнит, Китай	фульват	Li-Fa70	32,9	27	35	0,8

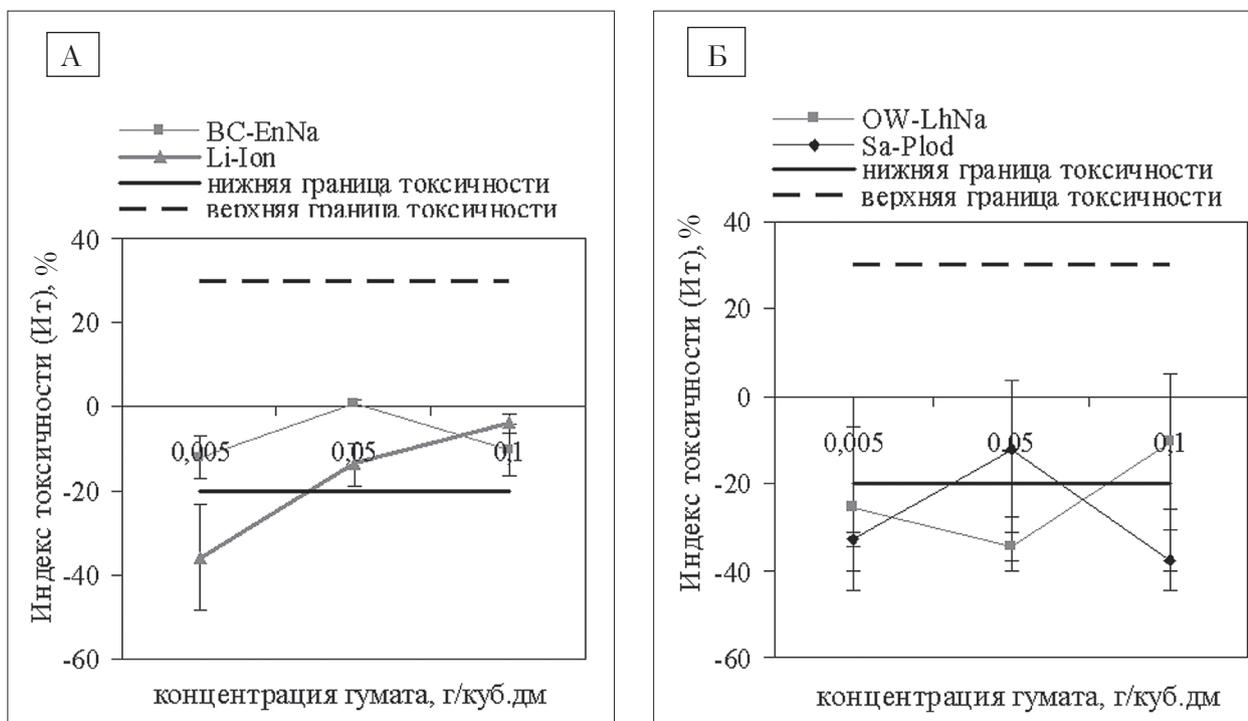


Рис. 1. Изменение прироста численности клеток (Ит) тест-культуры *S. quadricauda* под влиянием возрастающих концентраций гуматов, обогащённых ГК (А) и обогащённых веществами КРФ (Б) в среде Успенского 1 без разбавления (100%)

та и лигнита), из озёрных донных отложений (сапропеля и торфа), из органического отхода лигносульфоната, а также фульвате из лигнита.

Содержание общего углерода в ГП определяли мокрым озолением по методу Тюрина. В водной вытяжке определяли также содержание подвижных гуминовых веществ: углерода гуминовых кислот (ГК) после их осаждения серной кислотой при pH 2, центрифугирования и последующего растворения в щёлочи; и углерода веществ кислого фильтрата. Вещества кислоторастворимой фракции (КРФ) ГП представлены собственно фульвокислотами и неспецифическими органическими соединениями (низкомолекулярные органические кислоты, аминокислоты, углеводы). Поскольку преобладание фульвокислот (ФК), а также низкомолекулярных карбоновых кислот характерно для гуминовых веществ торфов и сапропелей, в спектре исследуемых гуматов представлены препараты не только с различными химическими характеристиками, но и происхождением. Некоторые характеристики ГП приведены в таблице.

Результаты

Проведено две серии токсикологических экспериментов, которые различались степе-

ню обогащённости питательной среды для водорослей. В экспериментах варианта I испытывали токсичность ГП в среде Успенского 1 без разведения (100%). В экспериментах варианта II испытывали токсичность ГП в среде Успенского 1 с десятикратным разведением (10%).

Результаты биотестирования показали следующее.

Вариант I. В условиях неразбавленной среды Успенского 1 гуматы (BC-EnNa, Li-Ion, OW-LhNa, Sa-Plod) в большинстве вариантов не оказывали значимое воздействие на рост водорослевой культуры *S. quadricauda*. Лишь при некоторых концентрациях наблюдали токсическое действие ГП на альгологическую культуру. Угнетали прирост численности клеток на 20% и более 0,005 г/дм³ Li-Ion, 0,05 г/дм³ OW-LhNa и 0,1 г/дм³ Sa-Plod. В этой серии экспериментов не выявлено различий в отклике культуры водорослей на гуматы различного происхождения (рис. 1).

Вариант II. При разбавлении среды наблюдали стимуляцию развития водорослей гуматами. Диапазон колебания индексов токсичности ГП, обогащённых ГК, находился в пределах от 67,4±6,8% для 0,005 г/дм³ раствора препарата Li-Ion до 44,0±11,9% для 0,05 г/ дм³ раствора препарата BC-EnNa

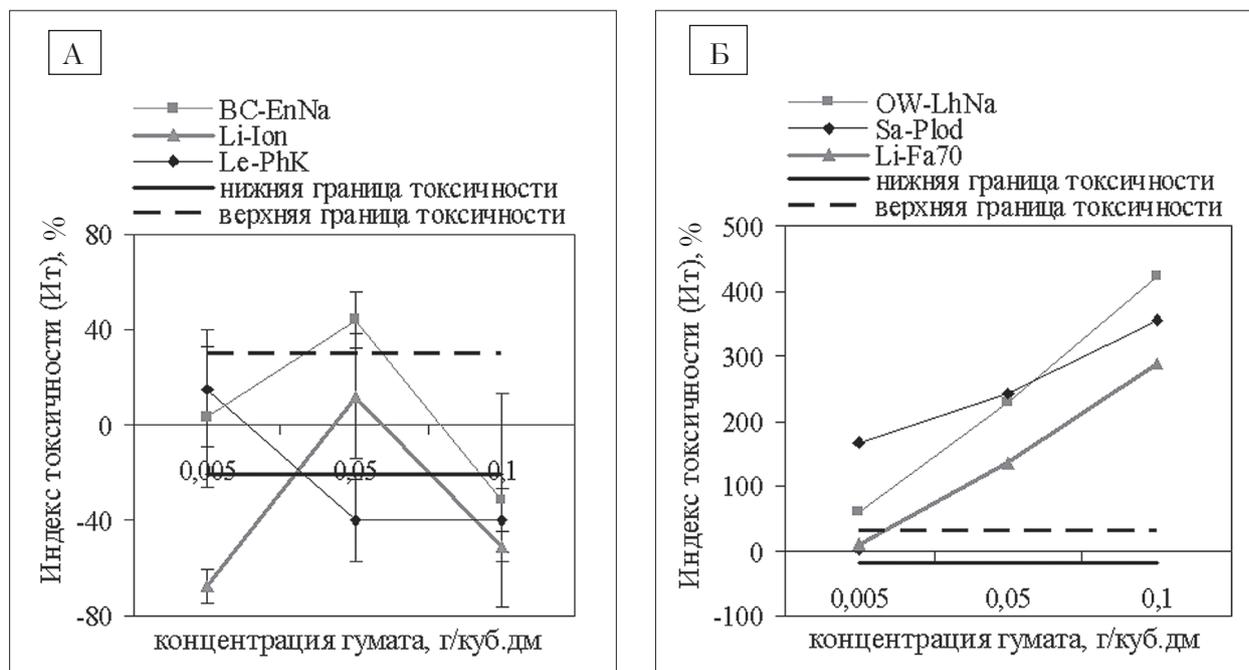


Рис. 2. Изменение прироста численности клеток (Ит) тест-культуры *S. quadricauda* под влиянием возрастающих концентраций гуматов обогащённых ГК (А) и обогащённых веществами КРФ (Б) в разбавленной среде Успенского 1 (10%)

(рис. 2А). В то же время индексы токсичности гуматов, обогащённых веществами КРФ, были только положительными. Характер кривых откликов водорослевой культуры на гуматы различного происхождения был схожим (рис. 2Б).

Результаты второй серии экспериментов демонстрируют корреляцию воздействия гуматов на культуру *S. quadricauda* с содержанием в них КРФ органических веществ и, следовательно, с их происхождением. Факт стимулирования развития водорослей ГП в условиях обеднённости среды элементами питания согласуется с описанными в литературе данными наибольшего стимулирующего влияния гуминовых веществ на организмы именно в условиях стресса [16–18].

Выводы

Результаты проведённых экспериментов показывают, что, во-первых, реакция водорослей на ГП зависит от насыщенности среды питательными элементами; во-вторых, в условиях, когда питательность среды снижена, проявляются различия в воздействии ГП разного происхождения: ГП из торфов и сапропелей, насыщенных веществами кислоторастворимой фракции, способны к большей стимуляции роста водорослей, чем гуматы «угольного» происхождения с большим содержанием ГК в своём составе.

Литература

1. Malcolm R.L., Vaughan D. Effects of humic acid fractions on invertase activities in plant tissues // *Soil Biology & Biochemistry*. 1978. № 11. P. 65–72.
2. Thomas J.D. The role of dissolved organic matter, particularly free amino acids and humic substances, in freshwater ecosystems // *Freshwater Biology*. 1997. № 38. P. 1–36.
3. Potential applications of humates in environmental engineering <<http://www.humate.com>>.
4. Наумова Г.В., Кособокова Р.В., Косоногова Л.В., Райцина Г.И., Овчинникова Т.Ф. Гуминовые препараты и технологические приёмы их получения // *Гуминовые вещества в биосфере*. М.: Наука, 1993. С. 178–188.
5. Калабин Г.А., Каницкая Л.В., Кушнарев Д.Ф. Количественная спектроскопия ЯМР природного органического сырья и продуктов его переработки. М.: Химия, 2000. 408 с.
6. Malcolm R.L. The uniqueness of humic substances in each of soil, stream and marine environments // *Analytica Chimica Acta*. 1990. № 232. P. 19–30.
7. Yakimenko O. Chemical and plant growth stimulatory properties in a variety of commercial humates // Ed. by Frimmel F.H., Abbt-Braun G. *Humic substances – linking structure to functions*. (Proceedings of the 13-th Meeting of the International Humic Substances Society). Karlsruhe, 2006. V. 45-II. P. 1017–1021.
8. Филенко О.Ф., Михеева И.В. Основы водной токсикологии. М.: Колос, 2007. 144 с.

9. Barrett P.R.F., Williams M., Vincent D., Robinson J. Algal growth control by a barley straw extract // *Bioresource Technol.* 1999. № 77. P. 177–181
10. Prokhotskaya V.Yu., Steinberg C.E.W. Differential sensitivity of a coccal green algal and cyanobacterial species to dissolved organic matter (NOM) // *Env. Sci. Pollut. Res.* 2007. № 8. P. 1–8.
11. Перечень методик, внесённых в государственный реестр методик. Часть IV. Токсикологические методы контроля <<http://www.fcao.ru/metodiks.html>>.
12. Марушкина Е.В. Исследование состояния популяции водоросли *Scenedesmus quadricauda* в норме и при интоксикации методом микрокультур. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М. 2005. 24 с.
13. Дмитриева А.Г., Бойчук Т.В., Филенко О.Ф. Жизнестойкость популяции *Scenedesmus quadricauda* при разных режимах интоксикации серебром // *Электронный журнал «Исследовано в России»*. 2006. № 245. С. 2326–2333.
14. Жмур Н.С., Орлова Т.Л. 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.
15. Методическое руководство по биотестированию воды (РД 118-02-90). М., 1991. 48 с.
16. Христева Л.А. Действие физиологически активных гуминовых кислот на растения при неблагоприятных внешних условиях // *Гуминовые удобрения: теория и практика их применения*. Днепропетровск. 1973. Т. 4. С. 15–23.
17. Куликова Н.А., Цветкова Е.А., Холодов В.А., Лебедева Г.Ф., Бадун Г.А., Коробков В.И., Тясто З.А., Чернышёва М.Г., Перминова И.В. Защитное РД 118-02-90 действие гуминовых веществ и их производных в условиях абиотических стрессов // *Леса Евразии-Северный Кавказ: Матер. VIII междунар. конф. молодых учёных, посвященной 270-летию А.Т. Болотова*. Сочи. 2008. Т. 2. С. 86–87.
18. Kulikova N.A., Veselovskaya M.M., Lebedeva G.F., Perminova I.V. Humic substances decrease water deficiency stress of wheat seedlings // Ed. by Frimmel FH, Abbt-Braun G. Humic substances – linking structure to functions. (Proceedings of the 13th Meeting of the International Humic Substances Society). Karlsruhe. 2006. P. 437–440

Работа частично финансировалась из грантов РФФИ 07-04-01510 и Программы Президиума РАН «Биологическое разнообразие».