

Глава 7. ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗЫВАЮЩИХ И ДЕТОКСИЦИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ГУМУСОВЫХ КИСЛОТ

Количественной оценке макролигандных свойств гумусовых кислот посвящены многочисленные публикации (их обзор приводится в разделах 1.5.1, 1.5.2, 1.6.1, 1.6.2), разработаны соответствующие методические подходы. Однако систематические исследования по установлению количественных зависимостей между строением и связывающими свойствами гумусовых кислот по отношению к различным классам экотоксикантов, а также тесным образом с ними связанными детоксицирующими свойствами до сих пор отсутствовали. Предыдущие главы диссертации были посвящены численному описанию строения гумусовых кислот, задача настоящего этапа исследования состояла в получении количественных характеристик их связывающих и детоксицирующих свойств по отношению к различным экотоксикантам. Исследования проводили для трех классов экотоксикантов – тяжелых металлов (на примере Hg(II)), полиядерных ароматических углеводородов (ПАУ) (на примере пирена, флуорантена и антрацена) и гербицидов (на примере атразина). Их выбор был обусловлен приоритетностью положения в списке загрязняющих веществ и различием механизмов взаимодействия с гумусовыми кислотами. В качестве параметров, характеризующих связывающие свойства гумусовых кислот использовали константы связывания (для органических экотоксикантов) и константы устойчивости комплексов (для тяжелых металлов). Для их определения использовали существующие методические подходы, которые адаптировали к задачам, поставленным в работе. Для количественной оценки детоксицирующих свойств применяли интерпретационный аппарат концепции связывания/комплексобразования, который позволил описать процесс детоксикации экотоксикантов гумусовыми кислотами с помощью соответствующих констант детоксикации – аналогов констант связывания и устойчивости комплексов. Все три упомянутых типа констант использовали в качестве прогнозируемых признаков при установлении количественных зависимостей между строением гумусовых кислот и их связывающими и детоксицирующими свойствами по отношению к выбранным экотоксикантам.

Для определения констант связывания и устойчивости комплексов с различными экотоксикантами использовали соответствующие физико-химические методы, константы детоксикации определяли методом биотестирования.

7.1 Исследование комплексообразующих свойств гумусовых кислот по отношению к Hg(II)

Из-за стохастического характера гумусовых кислот основной проблемой количественного описания реакций с их участием является неизвестная стехиометрия. В случае тяжелых металлов, с нашей точки зрения, наиболее простым и удобным подходом к ее решению служит использование металл-эквивалентной концентрации гумусовых кислот (раздел 1.5.5), что позволяет свести стехиометрию соответствующего взаимодействия к соотношению 1:1. Металл-эквивалентную концентрацию можно определить как количество металл-связывающих центров на единицу массы гумусовых кислот, При этом под металлсвязывающим центром понимается комбинация молекулярных фрагментов гумусовых кислот, связывающих один атом металла.

Согласно данному подходу гумусовые кислоты рассматриваются как набор металлсвязывающих центров, поэтому их взаимодействие с Hg(II) можно записать следующей реакцией



где PCЦ – ртуть-связывающий центр.

Тогда соответствующая константа равновесия будет выглядеть как:

$$K(\text{PCЦ}) = \frac{[\text{Hg} \cdot \text{PCЦ}]}{[\text{Hg}^{2+}] \cdot [\text{PCЦ}]} \quad (7.2)$$

где $K(\text{PCЦ})$ – кажущаяся константа устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II), л/моль PCЦ; $[\text{HgPCЦ}]$ – равновесная концентрация Hg(II), связанного с гумусовыми кислотами в комплексы, моль/л; $[\text{PCЦ}]$ – концентрация PCЦ, моль PCЦ/л.

В таком представлении размерность константы соответствует размерности констант устойчивости комплексов Hg(II) по первой ступени (л/моль) с низкомолекулярными лигандами. Это дает возможность сопоставлять получаемые величины с константами для низкомолекулярных лигандов.

Обоснование допустимости использования кажущейся константы (7.2) для термодинамической характеристики взаимодействия металл-ГФК (аббревиатуру ГФК использовали для обозначения гумусовых кислот при записи реакций, соотношений, концентраций и т.д.) в литературе отсутствует. Поэтому необходимо было показать взаимосвязь между кажущейся константой, выраженной через PCЦ (7.2), и микроконстантой, характеризующей присоединение Hg(II) к каждому PCЦ:

$$k_{i,j,h} = \frac{[I_{i,j}]}{[\text{Hg}^{2+}] \cdot [I_{i-1,h}]} \quad (7.3)$$

где $k_{i,j,h}$, – микроконстанта, характеризующая образование j -й комбинации $Hg_iГФК$ из h -й комбинации $Hg_{i-1}ГФК$; $l_{i,j}$ – j -ая комбинация свободных и занятых центров в комплексе $Hg_iГФК$.

Под РСЦ будем понимать комбинацию молекулярных фрагментов гумусовых кислот, участвующих в связывании одного атома ртути. Он может включать в себя от одной до четырех функциональных групп. Тогда “среднюю” молекулу гумусовых кислот, имеющую m центров связывания со ступенчатыми константами $K_1...K_m$, можно представить как набор m невзаимосвязанных РСЦ. При вышеприведенном определении РСЦ их количество в молекуле гумусовых кислот соответствует максимальному количеству $Hg(II)$, которое может быть связано данной молекулой. Кроме того, число РСЦ можно также рассчитывать на массу гумусовых кислот, тогда это будет максимальное количество ртути, которое может быть связано с данной массой гумусовых кислот.

Для установления взаимосвязи между кажущейся константой и микроконстантой рассмотрим два крайних варианта распределения РСЦ в гумусовых кислотах по силе связывания:

1. Все РСЦ одинаковы (однородное распределение).
1. Существует несколько типов РСЦ разной силы. При этом они различаются настолько, что заполнение центров связывания i -го типа начинается не раньше, чем заполнятся все более сильные центры.

Вариант 1 (РСЦ в гумусовых кислотах равноценны). В этом случае все $K(РСЦ^i)$ идентичны и равны $K(РСЦ)$. Чтобы связать любую из этих констант с микроконстантой (7.3), необходимо выразить $[HgРСЦ]$ и $[РСЦ]$ через концентрации гумусовых кислот (ГФК) и их комплексов с $Hg(II)$:

$$[Hg \cdot РСЦ] = \sum_{i=1}^m i \cdot [Hg_iГФК] \quad (7.4)$$

где $i = 1 \dots m$ – число РСЦ в молекуле гумусовых кислот.

$$[РСЦ] = \sum_{i=1}^m (m - i + 1) \cdot [Hg_{i-1}ГФК] \quad (7.5)$$

Подставляя (7.4) и (7.5) в (7.2) получаем:

$$K(РСЦ) = \frac{1}{[Hg^{2+}]} \cdot \frac{\sum_{i=1}^m i \cdot [Hg_iГФК]}{\sum_{i=1}^m (m - i + 1) \cdot [Hg_{i-1}ГФК]} \quad (7.6)$$

Выразим $[Hg_iГФК]$ через микроконстанту (7.2). Для этого воспользуемся выражением для общей константы устойчивости комплексов гумусовых кислот с $Hg(II)$:

$$\beta_i = \frac{[Hg_iГФК]}{[Hg^{2+}]^i \cdot [ГФК]} \quad (7.7)$$

Данная константа является произведением ступенчатых констант от K_1 до K_i . Исходя из этого факта, можно записать, что:

$$\beta_i = C_i^m \cdot k^i \quad (7.8)$$

где m – общее число РСЦ в молекуле, а

$$C_i^m = \frac{m!}{(m-i)! \cdot i!} \quad (7.9)$$

Из уравнений (7.7) и (7.8) следует, что:

$$[\text{Hg}_i\text{ГФК}] = C_i^m \cdot k^i \cdot [\text{Hg}^{2+}]^i \cdot [\text{ГФК}] \quad (7.10)$$

Подставляя (7.10) в (7.6) получаем:

$$K(\text{РСЦ}) = \frac{1}{[\text{Hg}^{2+}]} \cdot \frac{\sum_{i=1}^m i \cdot C_i^m \cdot k^i \cdot [\text{Hg}^{2+}]^i \cdot [\text{ГФК}]}{\sum_{i=1}^m (m-i+1) \cdot C_{i-1}^m \cdot k^{i-1} \cdot [\text{Hg}^{2+}]^{i-1} \cdot [\text{ГФК}]} \quad (7.11)$$

Чтобы упростить уравнение (7.11) нужно сократить $[\text{ГФК}]$ в числителе и знаменателе, вынести k и $[\text{Hg}^{2+}]$ из-под знака суммы в числителе и провести следующее преобразование:

$$(m-i+1) \cdot C_{i-1}^m = i \cdot C_i^m. \quad (7.12)$$

Тогда уравнение (7.11) приобретает очень простой вид:

$$K(\text{РСЦ}) = k \quad (7.13)$$

Таким образом, при условии равноценности всех РСЦ кажущаяся константа устойчивости комплексов гумусовых кислот с $\text{Hg}(\text{II})$, рассчитанная на РСЦ, оказывается идентичной микроконстанте, характеризующей связывание единичного центра с $\text{Hg}(\text{II})$. Более того, величина данной константы не зависит от молярной массы гумусовых кислот, а значит, отпадает необходимость в использовании “средней” молекулярной массы гумусовых кислот, о проблемах определения которой говорилось в Главе 5.

Вариант 2 (РСЦ в ГФК неравноценны). В этом случае распределение $\text{Hg}(\text{II})$, связанного с гумусовыми кислотами, определяется следующим процессом:



При этом микроконстанты (7.3) различаются для разных типов РСЦ. Поэтому в общем случае кажущаяся константа (7.2) не может быть выражена через микроконстанту (7.3). Тем не менее, существуют ситуации, когда это возможно.

Один из таких случаев – малая степень заполнения РСЦ, при которой частично заполнены лишь наиболее сильные центры связывания ($i=1$). Экспериментально этот случай проявляется в том, что кажущаяся константа практически не зависит от степени заполнения РСЦ. Тогда взаимодействия в системе ГФК- $\text{Hg}(\text{II})$ сводятся к реакции



Данной реакции соответствует константа:

$$K(\text{РСЦ}^1) = \frac{[\text{Hg} \cdot \text{РСЦ}^1]}{[\text{Hg}^{2+}] \cdot [\text{РСЦ}^1]} \quad (7.16)$$

В соответствии с выкладками для варианта одинаковых РСЦ (см. выше),

$$K(\text{РСЦ}^1) = k_1, \quad (7.17)$$

то есть величина $K(\text{РСЦ}^1)$ является термодинамической характеристикой наиболее сильных центров связывания. К сожалению, на практике определение $[\text{HgРСЦ}^1]$ и $[\text{РСЦ}^1]$ затруднено, поэтому экспериментально доступной величиной может оказаться только кажущаяся константа (7.2). Свяжем ее с $K(\text{РСЦ}^1)$.

Из определения $K(\text{РСЦ})$ (7.2), уравнения материального баланса и определения степени заполнения РСЦ:

$$\theta = i/m \quad (7.18)$$

где i – количество занятых РСЦ, m – общее количество РСЦ в молекуле гумусовых кислот, следует, что:

$$K(\text{РСЦ}) = \frac{1}{[\text{Hg}^{2+}]} \cdot \frac{\theta}{1 - \theta} \quad (7.19)$$

Аналогичное уравнение можно записать для $K(\text{РСЦ}^1)$. Выражая из обоих уравнений $[\text{Hg}^{2+}]$, и приравнявая их, получаем:

$$\frac{K(\text{РСЦ}^1)}{K(\text{РСЦ})} = \frac{\theta_1}{\theta} \cdot \frac{1 - \theta}{1 - \theta_1} \quad (7.20)$$

где θ_1 – степень заполнения РСЦ^1 .

Как правило, экспериментальное определение θ_1 затруднено. Однако из (7.20) следует, что при постоянной $K(\text{РСЦ}^1)$ в диапазоне $0 < \theta_1 < 0.9$ $K(\text{РСЦ})$ уменьшается всего на порядок, после чего, при $\theta_1 > 0.9$ начинает резко падать. Это означает, что в случае, если при малых θ кажущаяся константа устойчивости гуматов ртути уменьшается меньше, чем на порядок, то

$$\theta_1 < 0.9. \quad (7.21)$$

С другой стороны, при малых ($\theta < 0.1$) степенях заполнения РСЦ:

$$1 - \theta \approx 1. \quad (7.22)$$

Кроме того, если заполняется только РСЦ^1 , то θ_1 связана с θ соотношением

$$\theta_1 = \theta/\delta_1, \quad (7.23)$$

где δ_1 – доля РСЦ^1 в общем количестве РСЦ:

$$\delta_1 = C(\text{РСЦ}^1)/C(\text{РСЦ}), \quad (7.24)$$

В случае, если в данном диапазоне θ заполняется только РСЦ^1 , можно записать, что

$$\delta_1 > \theta, \quad (7.25)$$

Подставляя (7.21), (7.23) и (7.25) в (7.20) и учитывая (7.22), получаем

$$K(\text{РСЦ}^1) < (10/\theta) \cdot K(\text{РСЦ}) \quad (7.26)$$

При этом в качестве нижней границы значения $K(\text{РСЦ}^1)$ остается величина $K(\text{РСЦ})$.

Таким образом, кажущаяся константа (7.2) позволяет оценить границы значения константы связывания наиболее сильного РСЦ и тем самым охарактеризовать его. При этом необходимо соблюдение следующих условий.

1. $\theta < 0.1$

2. В исследуемом диапазоне степеней заполнения РСЦ кажущаяся константа (7.2) должна изменяться не более, чем на порядок.

Тогда границы для константы связывания самого сильного РСЦ определяются следующим неравенством:

$$K(\text{РСЦ}) < K(\text{РСЦ}^1) < (10/\theta) \cdot K(\text{РСЦ}) \quad (7.27)$$

Вышеизложенное обуславливает планирование эксперимента по определению кажущихся констант. Во-первых, необходимо контролировать характер зависимости кажущейся константы от степени заполнения РСЦ. Во-вторых, чтобы исключить участие более слабых металлсвязывающих центров, желательно использовать такой интервал θ , чтобы изменение кажущейся константы в этом интервале было как можно меньше. К сожалению, уменьшение интервала θ приводит, в соответствии с (7.27), к увеличению диапазона значений $K(\text{РСЦ}^1)$, что ухудшает качество характеристики связывания наиболее сильных центров с Hg(II). Изложенные положения можно распространить и на другие металлы.

В связи с тем, что протолитические свойства РСЦ^{2-} нами не исследовались, то в дальнейшем определяли рН-условную константу $K(\text{РСЦ})$, используя заряд РСЦ только при корректировке значений констант на ионную силу раствора по уравнению Дэвиса.

7.1.1 Определение содержания ртуть-связывающих центров в гумусовых кислотах

Для исследования комплексообразующих свойств гумусовых кислот по отношению к Hg(II) использовали выборку из 24 препаратов различного происхождения и фракционного состава, которая включала в себя: 2 РОВ вод, 5 ГФК вод, 3 ГФК донных отложений, 2 ГК угля, 6 ГФК торфа, 3 ГК почв и 3 ГФК почв. Для определения содержания РСЦ в гумусовых кислотах была использована способность ртути (II) образовывать нерастворимые гуматы [Онуфриенок и Солодовникова, 1961]. Предполагалось, что содержание ртути в насыщенных гуматах соответствует содержанию РСЦ. Поэтому для

установления содержания РСЦ в растворах гумусовых кислот нужно было сначала установить условия образования насыщенных гуматов ртути.

Условия образования насыщенных гуматов Hg(II). Изучение условий образования нерастворимых гуматов описано в соответствующих публикациях [Жилин и др., 1996; Жилин и др., 2000]. На первом этапе проводили качественный эксперимент, цель которого была установить соотношения Hg(II):металл, при которых заметно выпадение осадка нерастворимых гуматов. Для этого к концентрированным растворам ГФК торфа (0.5 и 1.2 г/л, соответственно) добавляли насыщенный раствор $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ до полного выпадения окрашенного вещества в осадок. При этом наблюдалось понижение pH до 2.4-2.5. В обоих случаях осадки имели темно-коричневый цвет и рыхлую структуру. Анализ осадков показал, что в них содержится 33%(масс) и 27% (масс) Hg. Это говорит о том, что осадки являлись гуматами ртути, а не ГК, выпавшими при закислении среды за счет гидролиза Hg^{2+} .

Высокое содержание ртути в полученных гуматах позволило предположить, что в указанных условиях образуются гуматы, в которых все РСЦ заполнены. Чтобы подтвердить это предположение, было проведено количественное изучение образования нерастворимых гуматов ртути.

Для этой цели готовили растворы с различными соотношениями Hg(II):ГФК при pH 2.3 и изучали распределение Hg(II) и ГФК между раствором и образующимся осадком. Эксперименты проводили на двух препаратах ГФК торфа. Концентрацию ртути определяли методом ААСХП (Приложение 7.1), концентрацию ГФК – спектрофотометрически.

Было установлено, что при соотношении Hg:ГФК меньше 0.3-0.6 ммоль/г (в зависимости от концентрации ГФК) Hg(II) и гумусовые кислоты оставались в растворе, тогда как при превышении указанного соотношения в системе образовывался осадок, при этом часть гумусовых кислот оставалась в растворе. При двукратном превышении этого соотношения все окрашенное вещество полностью выпадало в осадок (ход соответствующей зависимости показан на рис 7.1). Следует заметить, что несмотря на широкий диапазон исследованных концентраций гумусовых кислот (0.01-0.2 г/л) характерные соотношения Hg:ГФК начала выпадения осадка и полного выпадения окрашенного вещества изменялись не более, чем в два раза.

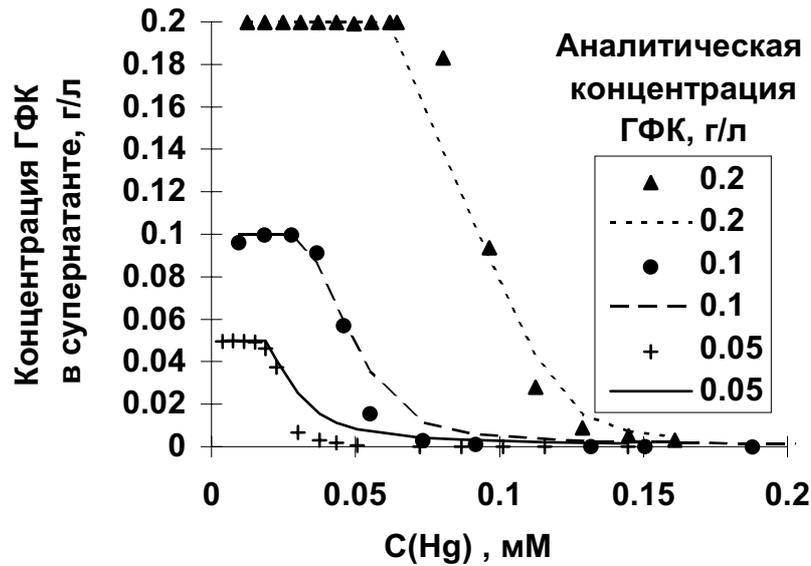


Рис. 7.1. Зависимость концентрации ГФК в супернатанте от аналитической концентрации Hg(II) при различных исходных аналитических концентрациях ГФК.

Участок, на котором окрашенное вещество выпадало полностью (т.е. участок максимальных соотношений Hg:ГФК, превышавших 0.6-1.2 ммоль/г) был исследован более подробно. Для каждой точки этого участка было рассчитано количество ртути, связанной с гумусовыми кислотами. Его определяли, исходя из разности между введенной концентрацией Hg(II) и концентрацией, обнаруженной над осадком гумата. Соответствующие изотермы сорбции строили в линеаризованных координатах изотермы Лэнгмюра:

$$\frac{C_L(\text{Hg})}{Q} = \frac{1}{K_{\text{sorb}} \cdot Q_{\text{max}}} + \frac{1}{Q_{\text{max}}} \cdot C_L(\text{Hg}) \quad (7.28)$$

где $C_L(\text{Hg})$ – концентрация всех форм Hg(II) над осадком, Q – количество ртути, приходящееся на единицу массы ГФК, K_{sorb} – константа сорбции, Q_{max} – максимальная сорбция, соответствующая содержанию РСЦ.

Для обоих исследованных препаратов ГФК торфа изотермы оказались линейны ($r = 0.9$), хотя тангенс угла наклона различался для разных аналитических концентраций препаратов. Однако непосредственной зависимости между тангенсом угла наклона и аналитической концентрацией препарата обнаружено не было. Возможно, это связано с различием свойств поверхностей образующихся гуматов ртути.

На основании полученных изотерм были рассчитаны параметры адсорбции Hg(II) на двух гуматах ртути: $K_{\text{sorb}} = (3.6 \pm 1.3) \times 10^4$ и $(3.1 \pm 2.0) \times 10^4 \text{ л/М}$, $Q_{\text{max}} = (2.1 \pm 0.6)$ и (1.4 ± 0.3) ммоль/г ГФК (приведены доверительные интервалы при $n = 5$, $P = 0.95$). Полученные значения Q_{max}

хорошо согласуются с содержанием ртути в гуматах (2.2 и 1.8 ммоль/г), полученных в ходе качественных экспериментов. Из этого следует, что использовавшиеся в предварительных экспериментах условия получения гуматов ртути (концентрация ГФК 0.5 г/л и более, соотношение Hg:ГФК не менее 0.01 моль/г) позволяют получать насыщенные гуматы Hg(II).

Получение и характеристика насыщенных гуматов ртути (II). Для определения содержания РСЦ в исследуемой выборке, состоящей из 24 препаратов гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава, в описанных выше условиях для каждого препарата получали насыщенный гумат Hg(II). С этой целью насыщенный раствор Hg(NO₃)₂ добавляли к концентрированным (1-2 г/л) растворам гумусовых кислот. При этом все окрашенное вещество выпадало в осадок.

Полученные гуматы представляли собой темно-коричневые аморфные порошки, нерастворимые в воде, органических растворителях (бензоле, хлороформе, ТГФ, ацетоне, ДМФА, ацетонитриле), ограниченно растворимые в 0.1 М KCl и 0.1 М NaOH. Препараты разлагались, не плавясь, при нагревании выше 200°C. Рентгено-фазовый анализ показал их рентгеноаморфность.

Таблица 7.1.

Содержание РСЦ в препаратах гумусовых кислот
(n = 3, P = 0.95)

Препарат	РСЦ, ммоль/г ОВ	Препарат	РСЦ, ммоль/г ОВ
РОВ природных вод		ГФК торфа	
ADOM-SMu4	3.7±0.7	RHF-T494	2.2±0.4
ADOM-SMu8	2.6±0.4	RHF-T594	2.1±0.4
ГФК природных вод		RHF-T694	2.5±0.2
AHF-MMu7	4.2±0.8	RHF-TH94	2.1±0.2
AHF-RND11	2.7±0.3	RHF-TMu4	2.4±0.5
AHF-RND14	5.9±0.6	RHF-TT94	2.8±0.5
AHF-SSH1	2.7±0.4	ГК почв	
AHF-SMu8	3.5±0.6	SHA-Gw94	1.0±0.5
ГФК донных отложений		SHA-Pw94	1.0±0.1
BHF-RLuh	3.2±0.4	SHA-PwN	2.0±0.1
BHF-RND13	2.9±0.4	ГФК почв	
BHF-SMu2	2.4±0.4	SHF-Co94	2.7±0.3
ГК углей		SHF-TMu12	1.8±0.2
CHA-AGK	4.3±0.9	SHF-PMu9	1.9±0.2
CHA-ALD	2.6±0.1		

Для определения содержания Hg(II) в гуматах, их разлагали в автоклаве в присутствии персульфата калия. Содержание гумусовых кислот в гуматах принимали равным их массе в исходном растворе. На основании этого рассчитывали количество ртути, приходящееся на единицу массы гумусовых кислот. Это количество соответствует содержанию РСЦ в ГФК. Результаты (в расчете на беззольную пробу) представлены в табл. 7.1.

Как видно из табл. 7.1, весь диапазон изменения содержания РСЦ в исследованных препаратах ГФК составлял от 1 до 6 ммоль/г ГФК. При этом максимальные содержания РСЦ наблюдались для ГФК вод, минимальные – для ГК почв. Количество РСЦ, приходящееся на “среднюю молекулу” ГФК, составляло от 10 до 70, что подтверждает тезис о том, что гумусовые кислоты способны образовывать полиядерные комплексы с тяжелыми металлами.

7.1.2 Определение кажущихся констант устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II)

Согласно выкладкам, приведенным в разделе 7.1.1, оптимальной характеристикой взаимодействия гумусовых кислот с Hg(II) является кажущаяся константа (7.2) при малых степенях заполнения РСЦ. Данная константа позволяет охарактеризовать наиболее сильные РСЦ, которые определяют комплексообразующие свойства гумусовых кислот в природных средах. В силу указанных обстоятельств, именно ее будем в дальнейшем подразумевать под термином “константа устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II)”.

Константы устойчивости комплексов с Hg(II) были определены для 24 препаратов. Концентрацию гумусовых кислот выражали через молярную концентрацию РСЦ и соответствующие константы обозначали $K(\text{РСЦ})$. Чтобы приблизить условия определения констант к природным водам, определение проводили при pH 7 в 0.0025 М гидрокарбонатном буфере. Определение ртути в присутствии гумусовых кислот приводили по методике, подробно изложенной в соответствующей публикации [Жилин и др., 2000] и приведенной в приложении. Методические аспекты определения констант и полученные результаты описаны ниже.

Ионообменный метод. На первом этапе исследований для определения констант устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II) был выбран ионообменный метод, который широко применяется в этих целях [Линник и Набиванец, 1986]. Метод основан на том, что гумусовые кислоты, связывая ионы металла в комплекс, препятствуют его связыванию с катионитом. При этом в случае, если емкость катионита значительно превышает количество металла, поглощение металла катионитом линейно зависит от концентрации свободной формы металла, то есть сорбция металла описывается изотермой Генри:

$$v_{\text{sorb}}(\text{Hg}) = K_{\text{H}} \cdot [\text{Hg}^{2+}] \quad (7.29)$$

где $v_{\text{sorb}}(\text{Hg})$ – количество сорбированного Hg(II), K_{H} – константа Генри.

При pH 7 практически весь Hg^{2+} гидролизован. Чтобы предотвратить гидролиз, в растворы, содержащие гумусовые кислоты и Hg(II), вводили хлорид калия в концентрации 0.01 М. Как показывает расчет, в этих условиях в отсутствие гумусовых кислот практически весь Hg(II) присутствует в растворе в виде HgCl_2 . Тогда в отсутствие гумусовых кислот изотерма сорбции Hg(II) на катионите будет выглядеть следующим образом:

$$v_{\text{sorb}}(\text{Hg}) = \lambda_0 \cdot [\text{Hg}(\text{II})] \quad (7.30)$$

где λ_0 – коэффициент распределения Hg(II) в отсутствие гумусовых кислот, а $[\text{Hg}(\text{II})]$ – суммарная концентрация всех растворенных форм Hg(II), определяемая экспериментально.

λ_0 можно связать с константой Генри, исходя из определения константы устойчивости HgCl_2 , и учитывая, что хлорид-ионы находятся в большом избытке по сравнению с Hg(II):

$$\lambda_0 = \frac{K_{\text{H}}}{\beta_2(\text{HgCl}_2) \cdot C^2(\text{Cl}^-)} \quad (7.31)$$

При введении гумусовых кислот в систему, содержащую Hg(II) и Cl^- , протекает реакция конкурентного комплексообразования:



Тогда коэффициент распределения Hg(II) между раствором и катионитом выражается через константу Генри следующим образом:

$$\lambda = \frac{K_{\text{H}}}{\beta_2(\text{HgCl}_2) \cdot C^2(\text{Cl}^-) + K(\text{РСЦ}) \cdot C(\text{РСЦ})} \quad (7.33)$$

Из уравнений (7.31) и (7.33) следует, что:

$$\frac{\lambda_0}{\lambda} - 1 = \frac{K(\text{РСЦ}) \cdot C(\text{РСЦ})}{\beta_2(\text{HgCl}_2) \cdot C^2(\text{Cl}^-)} \quad (7.34)$$

Из последнего уравнения следует, что при постоянной концентрации Cl^- по мере увеличения концентрации РСЦ величина $(\lambda_0/\lambda - 1)$ линейно растет, причем из тангенса угла наклона соответствующей зависимости можно вычислить $K(\text{РСЦ})$. Это означает, что для определения $K(\text{РСЦ})$ необходимо построить зависимость $(\lambda_0/\lambda - 1)$ от $C(\text{РСЦ})$.

Для определения λ_0 изучали распределение Hg(II) между катионитом и раствором. λ_0 находили как тангенс угла наклона полученной линейной изотермы адсорбции. Его значение составило 0.009.

Для изучения влияния гумусовых кислот на коэффициент распределения Hg(II) между катионитом и раствором в систему вводили различные концентрации гумусовых кислот и определяли Hg(II) в растворе. В экспериментах использовали препараты PHF-T4H94, ADOM-SMu4 и PHF-

SMu4. Полученные результаты представляли в виде зависимости $(\lambda_0/\lambda-1)$ от концентрации гумусовых кислот в логарифмических координатах, причем концентрацию гумусовых кислот выражали как молярную концентрацию РСЦ (рис. 7.2).

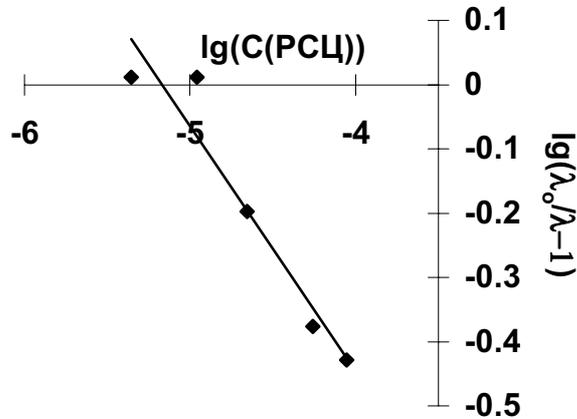


Рис. 7.2 Зависимость поглощения Hg(II) катионитом КУ-23 от концентрации ГФК РНФ-SMu4.

Для всех трех препаратов введение гумусовых кислот приводило к *увеличению* связывания Hg(II) с катионитом. Следовательно, гумусовые кислоты способствует связыванию Hg(II) с катионитом, то есть помимо сорбции ионов Hg^{2+} на катионите, на нем происходит и сорбция гуматов ртути. Это делает ионообменный метод неприменимым для определения констант устойчивости гуматов ртути.

Адсорбционный метод. Неприменимость ионообменного метода для определения констант устойчивости гуматов ртути побудила нас к модификации этого метода. А именно, возникла идея заменить катионит на какой-либо другой сорбент, способный сорбировать Hg(II) из раствора. При этом искомый сорбент должен был удовлетворять следующим условиям. Во-первых, обеспечивать линейность изотермы сорбции Hg(II) при концентрации 250 нМ и выше. Во-вторых, не должен сорбировать гуматы. Кроме того, в условиях эксперимента сорбент должен понижать концентрацию Hg(II) в 2-4 раза: при более сильной сорбции возникнут большие погрешности при определении λ_0 , а при более слабой – при определении $(\lambda_0/\lambda - 1)$.

В качестве возможных сорбентов были выбраны полиэтилен [Heiden and Aikens, 1983], кварц [Цуканова и Тихомолова, 1996] и стекло. Для оценки их сорбционной способности по отношению к Hg(II) была изучена адсорбция Hg(II) на стенках сосудов из соответствующего материала в присутствии 0.0025 М гидрокарбонатного буфера (рН 7). Эксперименты проводились в бесхлоридной среде, так как хлориды препятствовали сорбции Hg(II). Для оценки доли адсорбированного Hg(II) строили зависимость концентрация Hg(II) в равновесии с сорбентом от исходной концентрации Hg(II) (рис. 7.3).

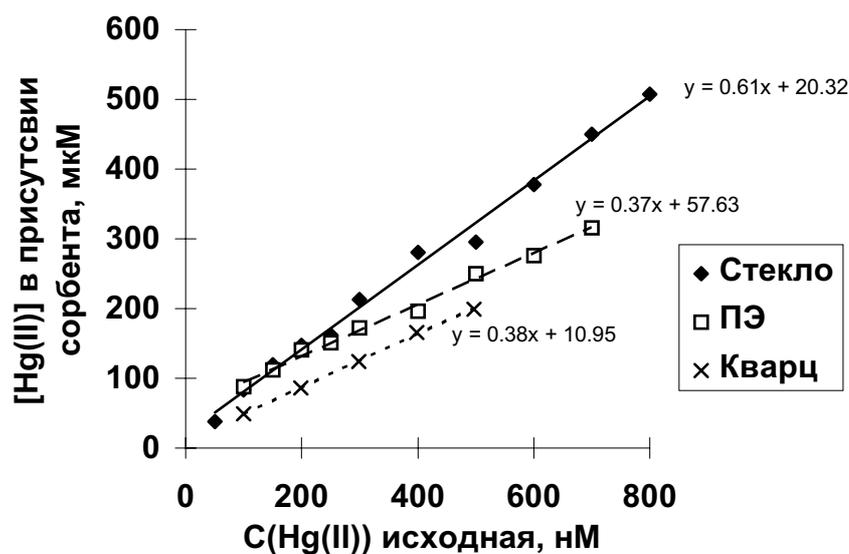


Рис. 7.3. Зависимость концентрации Hg(II) в растворе над различными сорбентами от исходной (аналитической) концентрации Hg(II) (pH7, 0.0025 М гидрокарбонатный буфер).

Из рис. 7.3 видно, что все три сорбента обеспечивают линейность изотерм адсорбции в требуемом диапазоне концентраций. При этом стекло обладает минимальной сорбционной способностью, а кварц – максимальной.

Изучение адсорбции Hg(II) на кварце в присутствии 20 и 80 мг/л ГФК показало, что по мере увеличения концентрации гумусовых кислот наблюдалось отклонение изотерм адсорбции от линейности. По-видимому, это связано с тем, что гумусовые кислоты также занимают адсорбционные центры на кварце и тем самым препятствуют сорбции Hg(II).

Аналогичные эксперименты были проведены с полиэтиленовыми поверхностями. Изотермы адсорбции Hg(II) на полиэтиленовых поверхностях при различных концентрациях гумусовых кислот приведены на рис. 7.4.

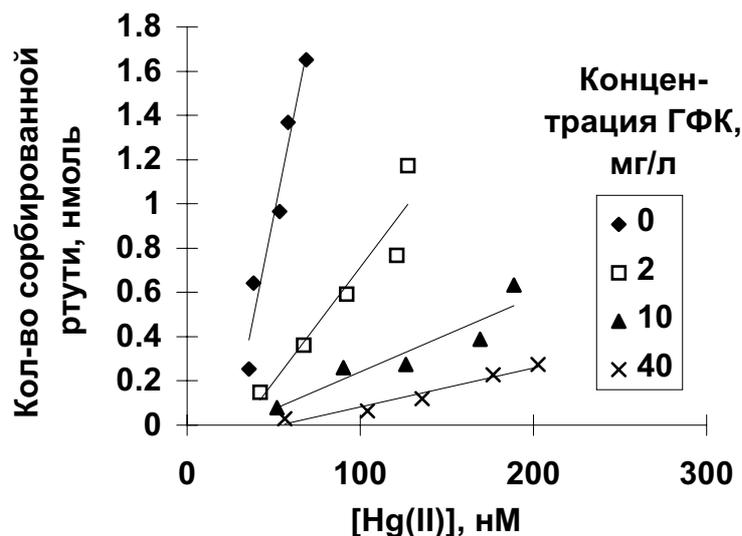


Рис. 7.4. Типичные изотермы адсорбции Hg(II) на полиэтиленовых поверхностях при различных концентрациях гумусовых кислот (рН 7, 0.0025 М гидрокарбонатный буфер).

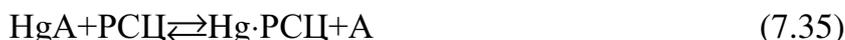
Из рис. 7.4 видно, что гумусовые кислоты снижают адсорбцию Hg(II) на полиэтиленовых поверхностях, причем во всем исследованном диапазоне концентраций гумусовых кислот изотермы остаются линейными. Кроме того, при повышении концентрации гумусовых кислот до 200 мг/л, Hg(II) практически не адсорбируется на полиэтиленовых поверхностях, что говорит об отсутствии адсорбции гуматов ртути на полиэтилене. На основании данного факта дальнейшие эксперименты по определению констант устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II) проводили с использованием полиэтилена в качестве адсорбента.

Как и ранее, константы устойчивости рассчитывали в соответствии с подходом, рассматривающим гумусовых кислот как набор РСЦ. Принимая во внимание, что определение констант устойчивости гуматов ртути (II) осложнялось гидролизом иона Hg^{2+} и комплексообразованием ртути(II) с компонентами буферной среды, вводили следующие допущения.

1. На полиэтилене сорбируется соединение HgA , представляющее собой либо гидроксид, либо гидрокарбонатный комплекс Hg(II). При этом А может быть как одним, так и несколькими лигандами.

2. Концентрация свободного А постоянна.

3. В растворах, содержащих гумусовые кислоты, протекает реакция конкурентного комплексообразования (заряды не учитываются):



Тогда из изотерм адсорбции (рис. 7.4) можно определить следующее соотношение:

$$\frac{[\text{Hg} \cdot \text{РСЦ}]}{[\text{HgA}]} = \left(\frac{\lambda_0}{\lambda} - 1 \right) \quad (7.36)$$

где λ_0 и λ – коэффициент распределения Hg(II) в отсутствие и присутствии гумусовых кислот, соответственно.

Для расчета $K(\text{РСЦ})$ на основании (7.36) запишем выражение для константы лигандного обмена:

$$K(\text{РСЦ} / \text{A}) = \frac{[\text{Hg} \cdot \text{РСЦ}] \cdot [\text{A}]}{[\text{HgA}] \cdot [\text{РСЦ}]} \quad (7.37)$$

При условии постоянства $[\text{A}]$, ее можно включить в константу. В этом случае равновесие (7.35) будет описываться следующей условной константой конкурентного комплексообразования:

$$K_{[\text{A}]}(\text{РСЦ} / \text{A}) = \frac{[\text{Hg} \cdot \text{РСЦ}]}{[\text{HgA}] \cdot [\text{РСЦ}]} \quad (7.38)$$

Поскольку во всех экспериментах использовался большой избыток РСЦ (как минимум, 10:1), то можно записать, что

$$[\text{РСЦ}] = C(\text{РСЦ}) \quad (7.39)$$

Подставляя (7.39) и (7.38) в (7.37) и преобразуя полученное уравнение, получаем

$$K_{[\text{A}]}(\text{РСЦ} / \text{A}) = \frac{1}{C(\text{РСЦ})} \cdot \left(\frac{\lambda_0}{\lambda} - 1 \right) \quad (7.40)$$

Выразим $K(\text{РСЦ})$ из $K_{[\text{A}]}(\text{РСЦ}/\text{A})$. Для этого домножим числитель и знаменатель в правой части уравнения (7.40) на $[\text{Hg}^{2+}]$, перенесем $K(\text{РСЦ})$ влево, а $K_{[\text{A}]}(\text{РСЦ}/\text{A})$ – вправо:

$$K(\text{РСЦ}) = \frac{[\text{HgA}]}{[\text{Hg}^{2+}]} \cdot K_{[\text{A}]}(\text{РСЦ} / \text{A}) \quad (7.41)$$

Дробь в правой части этого уравнения представляет собой константу равновесия реакции:



при условии, что $[\text{A}]$ включено в константу:

$$K_{[\text{A}]}(\text{HgA}) = \frac{[\text{HgA}]}{[\text{Hg}^{2+}]} \quad (7.43)$$

Следовательно, для расчета $K(\text{РСЦ})$ необходимо было определить $K_{[\text{A}]}(\text{HgA})$. Эту константу находили аналогичным способом, используя в качестве конкурентного лиганда бромид. Константы устойчивости бромидных комплексов Hg(II) находили в соответствующей базе данных [SCDB]. Их приводили к нулевой ионной силе по уравнению Дэвиса (уравнение 1.22, раздел 1.5.1) и усредняли. Согласно полученным данным $\lg\beta(\text{HgBr}_2) = 17.6$, хотя, разброс значений констант, приведенных в разных работах, весьма значителен (стандартное отклонение – 0.4).

Величину $K_{[A]}(Br/A)$ вычисляли для каждой изотермы. Логарифмы полученных констант усредняли. Полученное таким образом значение $K_{[A]}(Br/A)$ составило $(4.1 \pm 1) \times 10^8$. Рассчитанная на основании этого значения условная константа устойчивости HgA составляет 4.9×10^8 , что весьма близко значениям условных (рН 7) констант устойчивости $Hg(OH)_2$, рассчитанных из литературных данных [SCDB] (от 6.7×10^7 до 4.6×10^8). Это позволило идентифицировать HgA как гидроксид ртути(II).

На основании изотерм, полученных при трех различных концентрациях гумусовых кислот, находили $K(РСЦ)$. Полученные константы логарифмировали и усредняли. Особо следует отметить, что закономерного изменения $K(РСЦ)$ при увеличении концентрации гумусовых кислот не наблюдали. Из этого можно сделать вывод, что константа устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II) в исследованном диапазоне соотношений Hg:ГФК постоянна с точностью до погрешностей эксперимента.

К достоинствам вышеописанного метода можно отнести возможность определения констант устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II) с учетом гидролиза ионов Hg^{2+} . К недостаткам – довольно высокую чувствительность определяемых величин к экспериментальным погрешностям, неизбежным в опытах с адсорбцией из очень разбавленных растворов (особенно неустойчива к экспериментальным погрешностям величина λ_0). Также результаты зависят от правильности использованного значения константы устойчивости $HgBr_2$. Кроме того, этот метод не позволяет учесть протонирования РСЦ в гумусовых кислотах и их неравноценность.

Таким образом, найденная константа ($K(РСЦ)$) применима при соблюдении следующих условий: рН ≈ 7 , $I \approx 0.0025$ М, соотношение Hg(II):ГФК < 100 мкМ Hg(II) на 1 г ГФК). Состав многих природных вод отвечает данным условиям, поэтому полученные значения констант можно использовать для расчета распределения Hg(II) по формам в природных водах.

Определенные вышеописанным методом константы устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II) приведены в табл. 7.2.

Весь диапазон изменчивости $\lg K(РСЦ)$ для использованных препаратов составил от 13.5 до 14.7, то есть один порядок. Наиболее высокие значения констант были характерны для ГК почв, наименьшие значения – для ГФК вод. Вопросы взаимосвязи строения гумусовых кислот и полученных констант устойчивости в этой главе не рассматривали, так как им будет уделено особое внимание в Главе 8, посвященной прогностическому моделированию свойств гумусовых кислот.

Константы устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II)

(n = 3, P = 0.95)

Препарат	lgK(РСЦ)	Препарат	lgK(РСЦ)
РОВ природных вод		ГФК торфа	
ADOM-SMu4	13.7±0.3	PHF-T494	14.1±0.2
ADOM-SMu8	14.1±0.2	PHF-T594	14.3±0.1
ГФК природных вод		PHF-T694	14.0±0.2
AHF-MMu7	14.6±0.4	PHF-TH94	14.2±0.3
AHF-RND11	13.7±0.1	PHF-TMu4	14.2±0.3
AHF-RND14	13.5±0.1	PHF-TT94	14.2±0.3
AHF-SSH1	13.9±0.2	ГК почв	
AHF-SMu8	13.8±0.1	SHA-Gw94	14.7±0.2
ГФК донных отложений		SHA-Pw94	14.5±0.2
BHF-RLuh	14.4±0.2	SHA-PwN	14.6±0.2
BHF-RND13	14.0±0.3	ГФК почв	
BHF-SMu2	14.5±0.2	SHF-Co94	14.2±0.2
ГК углей		SHF-TMu12	14.9±0.4
CHA-AGK	14.4±0.2	SHF-PMu9	14.2±0.2
CHA-ALD	14.0±0.2		

Полученные значения констант были соотнесены с литературными данными (табл. 1.14). Для того, чтобы значения констант были сопоставимы, литературные данные пересчитывали на концентрацию РСЦ. Для констант, выраженных через молярную концентрацию гумусовых кислот, пересчет проводили по формуле:

$$\lg K(\text{РСЦ}) = \lg K(\text{ГФК}) - (\lg M(\text{ГФК}) + \lg \omega(\text{РСЦ})), \quad (7.44)$$

где $K(\text{ГФК})$ – константа, выраженная через молярную концентрацию ГФК, $M(\text{ГФК})$ – молярная масса гумусовых кислот, использованных в указанной работе, $\omega(\text{РСЦ})$ – количество РСЦ на единицу массы гумусовых кислот.

Поскольку значение последнего параметра авторами цитируемых работ не определялось, использовали средние значения для соответствующих типов гумусовых кислот, найденные в настоящей работе. Пересчитанные значения констант приведены в (табл. 7.3). При этом из рассмотрения были исключены работы [Strohal and Huljev, 1970; Yin et al, 1997] по причинам, описанным в обзоре литературы (разд. 1.5.1).

Литературные данные по константам устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II) в пересчете на Hg(II)-эквивалентную концентрацию гумусовых кислот

Препарат	pH	I	lgK(ГФК))	M(ГФК) г/моль	ω (РСЦ) ммоль/г	lgK(РСЦ)	Источник
Морские ГФК	8	?	18.1		3.7*	16.0-16.9	Mantoura et al., 1978
Речные ГФК			19.3-19.7	4600-	3.7*	17.1-18.5	
Озерные ГФК			18.4-20.1	32000	3.7*	16.3-18.9	
ФК торфа			18.3		2.3**	16.2-17.1	
ФК Москвы-реки	6.5	0.1	11	4100	3.7*	10.2***	Варшал и Буачидзе, 1983
ГК "Aldrich"	7	?	–	–	–	13.7-15.0	Heiden&Aikens, 1983

* – для водных гумусовых кислот в расчете на беззольный препарат;

** – для торфяных гумусовых кислот;

*** – дополнительно пересчитано на $I = 0$ по уравнению Дэвиса (1.22).

Как видно из данных, приведенных в табл. 7.3, полученные нами результаты хорошо согласуются с [Heiden and Aikens, 1983]. Так, для препарата ГК Aldrich, по нашим данным, $\lg K(\text{РСЦ}) = 14.0 \pm 0.2$ ($P = 0.95$), а из данных [Heiden and Aikens, 1983] – 13.7-15.0 в зависимости от соотношения Hg(II):ГФК. Нужно заметить, что указанные авторы также определяли константы устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II) из данных по адсорбции Hg(II) на полиэтилене в присутствии гумусовых кислот, что близко методу, использованному в настоящей работе.

Значения констант, найденные в [Mantoura et al., 1978], оказались на 2-4 порядка выше, чем в настоящей работе, а приводимые в [Варшал и Буачидзе, 1983] – на 3 порядка ниже. Расхождение с [Варшал и Буачидзе, 1983] может быть обусловлено принципиально иным методом выделения гумусовых кислот – сорбцией на активированном угле, что могло сказаться на их свойствах. В отношении работы [Mantoura et al., 1978] причины расхождения с нашими данными можно объяснить использованием более высоких pH, при котором работали авторы.

На основании проведенных систематических исследований получены количественные характеристики комплексообразующих свойств гумусовых кислот по отношению к Hg(II) (содержание ртути-связывающих центров и константы устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II)) для

представительной выборки препаратов различного происхождения и фракционного состава. В качестве константы устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II) предложено использовать кажущуюся константу в расчете на ртуть-эквивалентную концентрацию гумусовых кислот. Разработаны методики определения Hg(II)-эквивалентной концентрации гумусовых кислот и кажущихся констант устойчивости комплексов с Hg(II). Показано, что гумусовые кислоты различного происхождения и фракционного состава связывают Hg(II) в прочные комплексы, при этом диапазон изменения найденных кажущихся констант устойчивости по всей исследованной выборке препаратов составлял один порядок.

7.2 Исследование связывающих свойств гумусовых кислот по отношению ПАУ и атразину

Полиядерные ароматические углеводороды (ПАУ) образуют класс химических соединений, оказывающих выраженные токсические, мутагенные и канцерогенные эффекты на живые организмы [Neff, 1979; Lee et al., 1981]. Наряду с полихлорированными углеводородами, они относятся к одному из наиболее опасных классов загрязняющих веществ – высокогидрофобным органическим соединениям [Maruya et al., 1997]. Влияние гумусовых кислот на формы существования ПАУ в водных средах и их биологическую активность было подробно обсуждено в соответствующем разделе обзора литературы (1.6), что позволило наглядно продемонстрировать необходимость учета этого фактора при построении адекватных моделей биогеохимических циклов ПАУ и прогнозировании их опасности для биотической компоненты природных сред.

Еще одним важным классом органических экотоксикантов являются гербициды. При этом особо опасно загрязнение персистентными гербицидами, одним из наиболее распространенных представителей которых является атразин [Захаренко, 1990]. Время его жизни в почве составляет от нескольких недель до четырех лет и более. Атразин принадлежит к классу сим-триазиновых гербицидов – сильных специфических ингибиторов фотосинтеза. Согласно многочисленным исследованиям, основным фактором, определяющим закрепление атразина в почвенном профиле и уровень проявляемой им токсичности является связывание с гумусовыми кислотами [Лебедева и др., 1990; Овчинникова, 1987]. Этот вопрос подробно освещен в обзоре литературы (раздел 1.6.3).

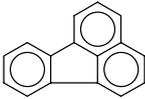
Указанные причины обусловили выбор ПАУ и атразина в качестве модельных органических токсикантов для оценки связывающих и детоксицирующих свойств гумусовых кислот.

7.2.1 Определение констант связывания гумусовых кислот с ПАУ

Изучение взаимодействия гумусовых кислот с ПАУ проводили на примере трех представителей этого класса соединений – пирена (Py), флуорантена (Flt) и антрацена (An). Выбор модельных ПАУ основывали на различии их физико-химических свойств, в первую очередь, гидрофобности, растворимости и потенциала ионизации, что важно для установления механизма соответствующего взаимодействия. Основные физико-химические характеристики используемых ПАУ приведены в табл. 7.4.

Таблица 7.4

Физико-химические характеристики модельных ПАУ по данным [Clar, 1964; Кирсо и др., 1988]

ПАУ	Стр-ра	T _{mp} , °C	T _{bp} , °C	Раствори- мость в воде, мкг/л (25°C)	Давлени е паров, (20°C)	lgK _{ow}	I, (эВ)
Пирен		149	360	135	6.85×10 ⁻⁷	5.18	7.55
Флуорантен		110	–	265	0.60×10 ⁻⁶	5.22	7.8
Антрацен		216	340	30	1.96×10 ⁻⁴	4.44	7.44

Выборка препаратов, использованная для исследования взаимодействия с ПАУ, включала 26 образцов: 7 ГФК и 1 РОВ торфа; 7 ГК, 5 ФК и 1 ГФК почв; 4 ГФК вод и 1 ГК угля. Константы связывания ПАУ гумусовыми кислотами определяли методом тушения флуоресценции. Как указывалось в литобзоре (раздел 1.6.2), данный метод позволяет определять константы связывания ПАУ гумусовыми кислотами путем измерения концентрации свободной и связанной форм ПАУ без их предварительного разделения. Кроме того, использование этого метода не требует определения точной концентрации ПАУ в растворе [Shlautman and Morgan, 1993]. Расчет констант связывания ПАУ гумусовыми кислотами (K_{OC}) проводили с помощью уравнения Штерна-Фольмера (1.27). Подробное обсуждение полученных результатов приведено в [Perminova et al., 1999].

Для определения K_{OC} измеряли интенсивности флуоресценции растворов ПАУ в отсутствие (F₀) и в присутствии (F) различных концентраций гумусовых кислот. С этой целью готовили концентрационные серии гумусовых кислот при постоянной концентрации ПАУ, которая составляла: 5×10⁻⁷, 6.4×10⁻⁷ и 1.7×10⁻⁷ М для Py, Flt и An, соответственно. Концентрации

гумусовых кислот устанавливали в диапазоне $0.5-7 \times 10^{-6}$ кг С/л. На рис. 7.5 приведены типичные спектры флуоресценции Ру в присутствии различных концентраций гумусовых кислот. Типичные концентрационные зависимости тушения флуоресценции ПАУ гумусовыми кислотами, использованные для расчета K_{OC} , приведены на рис. 7.6.

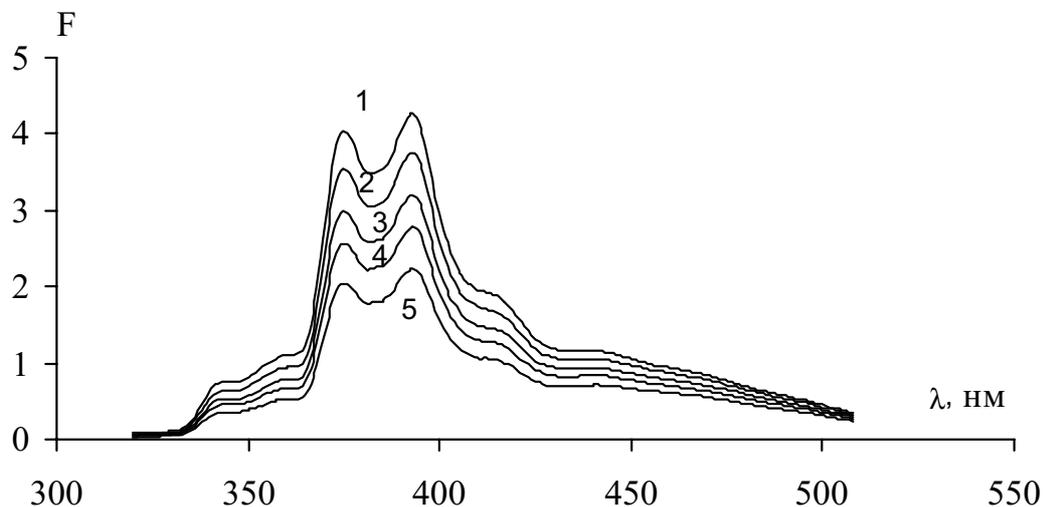


Рис. 7.5. Спектры флуоресценции Ру в присутствии различных концентраций гумусовых кислот при $\lambda_{ex}=224$ нм. (1, 2, 3, 4 и 5 соответствуют 0, 1, 3, 5 и 7 мг С/л ГФК).

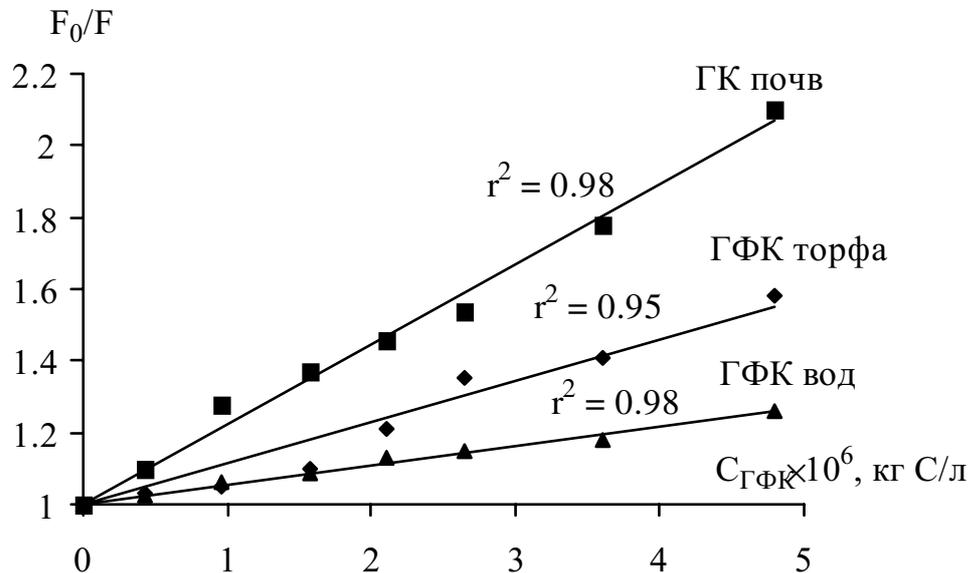


Рис. 7.6. Зависимости Штерна-Фольмера для Ру и гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава

Как видно из рис. 7.6, в исследуемом диапазоне концентраций гумусовых кислот полученные зависимости линейны. Рассчитанные по уравнению Штерна-Фольмера значения констант и их доверительные интервалы приведены в табл. 7.5.

Таблица 7.5

Константы связывания ($K_{OC} \times 10^{-5}$, л/кг С) модельных ПАУ
гумусовыми кислотами ($n = 7$, $P = 0.95$)

Препарат	Py	Flt	An	Препарат	Py	Flt	An
ГК и ФК почв				ГФК торфа			
SHA-Pw94	1.0±0.1	0.8±0.1	<0.1	RHF-T1H94	1.2±0.2	0.9±0.2	0.12±0.05
SHA-PwN	1.3±0.1	0.8±0.1	0.5±0.1	RHF-T4H94	1.4±0.1	0.9±0.1	0.22±0.05
SHA-Pp94	1.2±0.2	0.8±0.1	0.5±0.1	RHF-T5H94	0.8±0.2	0.6±0.2	0.16±0.03
SHA-Pg94	0.7±0.1	0.5±0.1	<0.1	RHF-T6H94	0.7±0.1	0.7±0.1	0.25±0.07
SHA-Gw94	1.4±0.5	0.9±0.2	0.5±0.2	RHF-T7H94	1.7±0.1	1.1±0.2	0.6±0.2
SHA-Gp94	1.8±0.2	1.2±0.1	0.7±0.1	RHF-TH94	1.4±0.2	0.9±0.2	0.5±0.1
SHA-Cm94	2.2±0.2	1.3±0.2	1.0±0.1	RHF-TTL94	1.0±0.2	0.8±0.1	<0.1
SHA-CtV94	2.4±0.3	1.6±0.3	1.0±0.4	ГФК природных вод			
SFA-Pw94	0.13±0.08	<0.1	<0.1	AHF-RMC	<0.1	<0.1	<0.1
SFA-Pp94	<0.1	<0.1	<0.1	AHF-RMX	0.7±0.1	0.5±0.1	<0.1
SFA-Pg94	<0.1	<0.1	<0.1	AHF-RND3	0.4±0.1	0.2±0.1	<0.1
SFA-Gw94	0.5±0.1	0.3±0.1	<0.1	AHF-SSh1	1.2±0.2	0.9±0.2	<0.1
SFA-CtV94	1.1±0.2	0.7±0.1	<0.1	РОВ торфа и ГК угля			
ГФК почв				PDOM-TH	<0.1	<0.1	<0.1
SHF-Co94	1.0±0.1	0.6±0.1	0.5±0.1	CHA-ALD	2.3±0.3	1.8±0.2	1.0±0.2

Как видно из табл. 7.5, рассчитанные с помощью метода тушения флуоресценции K_{OC} лежат в диапазоне $(0.1-2.5) \times 10^5$, $(0.2-1.7) \times 10^5$ и $(0.1-1.0) \times 10^5$ л/кг С для Py, Flt и An, соответственно. Полученные значения хорошо согласуются с K_{OC} , приводимыми в литературе. Так, согласно [Gauthier et al., 1986; Danielsen et al., 1995; Shlautman and Morgan, 1993; Herbert et al., 1993; Gauthier et al., 1987], диапазон K_{OC} Py составляет $(0.2-5.5) \times 10^5$ л/кг С и $(0.2-0.6) \times 10^5$ л/кг С для An. Диапазон полученных нами значений K_{OC} Flt для ГК почв $(0.7-1.6) \times 10^5$ л/кг С соответствует величине 0.9×10^5 л/кг С, приводимой авторами [Chen et al., 1994].

Для оценки минимально определяемых величин K_{OC} использовали 3 σ критерий [Doerffel, 1990]. Для этой цели по результатам трех параллельных измерений рассчитывали стандартное отклонение минимального из всех определенных значений константы. Умножая полученную величину на три, получали минимально определяемое значение K_{OC} . Наименьшим значением

характеризовалось связывание An препаратом PNF-T1H94. Величины соответствующей K_{OC} и стандартного отклонения составили 0.12×10^5 и 0.034×10^5 л/кг С. Поэтому минимально определяемое значение K_{OC} составило 0.1×10^5 л/кг С.

Как видно из представленных данных, значения K_{OC} Py и Flt превышают таковые для An. По-видимому, такая разница обусловлена более высокой гидрофобностью Py и Flt ($\lg K_{ow} \sim 5.2$) по сравнению с An ($\lg K_{ow} \sim 4.4$). Схожие закономерности получены в [Gauthier et al., 1986; Kopinke et al., 1995; Chin and Weber, 1994]. В целом, по величине K_{OC} препараты ГФК различного происхождения можно расположить в следующий ряд:

ГК угля \cong ГК чернозема > ГК Л и П^Д почв > ГФК торфов >
> ГФК природных вод > ФК чернозема > ФК Л и П^Д почв

Наибольшее сродство к ПАУ было зафиксировано для СНА-ALD (2.3×10^5 ; 1.7×10^5 и 1×10^5 л/кг С для Py, Flt и An, соответственно), а также ГК черноземов. ГК П^Д и Л почв также характеризовались высокими K_{OC} , но в среднем их значения были ниже на 20% по сравнению с ГК черноземов. Для торфяных ГФК значения K_{OC} были ниже в среднем на 30-40% по сравнению с ГК почв. Относительно низкими константами связывания характеризовалось взаимодействие водных ГФК с модельными ПАУ. Так, в случае An не было зафиксировано тушения флуоресценции ни с одним из водных препаратов. Это означает, что соответствующие константы были ниже минимально определяемой величины (0.1×10^5 л/кг С). Для Py и Flt связывание наблюдалось только для препаратов ANF-RND3, ANF-RMX2 и ANF-SSh1. Водная вытяжка торфа не вызывала тушения флуоресценции ни одного из ПАУ. Аналогичный эффект наблюдался и в случае ФК почв. Исключение составили ФК, выделенные из чернозема типичного (SFA-CtV94), а также препарат SFA-Gw94. Значения данных констант были в среднем в 2-3 раза ниже по сравнению с соответствующими ГК почв. Полученные результаты согласуются с данными авторов [Gauthier et al., 1986; Paolis and Kukkonen, 1997; Gauthier et al., 1987].

Таким образом, как видно из представленных данных, сродство гумусовых кислот к ПАУ определяется как свойствами ПАУ, так и источником происхождения и фракционным составом гумусовых кислот. Наблюдаемые различия в величинах K_{OC} для препаратов гумусовых кислот различного происхождения, по-видимому, связаны с особенностями их строения.

В силу специфики свойств ПАУ, а именно, их высокой гидрофобности, и характера полученных закономерностей – максимальные константы связывания наблюдались для более гидрофобных ПАУ (Py и Flt), наиболее вероятным представлялся механизм гидрофобного взаимодействия гумусовых

кислот с ПАУ. Дополнительным указанием на это являлось обнаруженное максимальное сродство к ПАУ препаратов ГК угля и чернозема, которые характеризуются самым высоким вкладом ароматических – гидрофобных – фрагментов в их структуру. Гипотезы о гидрофобном механизме связывания ПАУ гумусовыми кислотами неоднократно высказывались в литературе [Gauthier et al., 1983, Paolis and Kukkonen, 1997; Black and McCarthy, 1988] на основании корреляционных взаимосвязей между показателями ароматичности гумусовых кислот – H/C , C_{Ar} и ϵ^* – и величиной константы связывания. Обсуждению подобных зависимостей, полученных по результатам нашей работы, будет посвящен специальный раздел следующей главы (8.2). Однако экспериментальные подтверждения превалирующей роли ароматического каркаса в связывании ПАУ отсутствовали. Поэтому следующий раздел работ был посвящен изучению связывающей способности негидролизуемой (каркасной) части гумусовых кислот на примере Ру.

7.2.2 Определение констант связывания пирена гидролизрованными препаратами гумусовых кислот

Для изучения связывающей способности каркасной и периферической частей гумусовых кислот по отношению к Ру исходные препараты подвергали кислотному гидролизу (0.2 М HCl, $t = 110^\circ\text{C}$, 15 часов) согласно процедуре, описанной в п. 4.3.1 В данных условиях происходит расщепление макромолекул гумусовых кислот на ароматический каркас и углеводную периферию. При этом каркасные фрагменты образуют нерастворимые продукты гидролиза, а периферические переходят в раствор. Гидролиз проводили для 4 ГК торфа (РНА-Т3L98, РНА-Т4Н98, РНА-Т5Н98, РНА-Т6Н98), ФК торфа (РФА-Т4Н98) и ГК почв (SНА-СtV98).

Константы связывания Ру негидролизуемой (ННР) и гидролизуемой частью ((ННД) гумусовых кислот определяли методом тушения флуоресценции аналогично процедуре, использованной для исходных препаратов. Полученные K_{OC} и их доверительные интервалы приведены в табл. 7.6.

Как видно из табл. 7.6, для всех нерастворимых продуктов гидролиза гуминовых кислот наблюдалось возрастание K_{OC} по сравнению с исходными. По-видимому, увеличение K_{OC} обусловлено тем, что, во-первых, в результате отщепления периферической части облегчается доступ Ру к ароматическому каркасу молекул ГК, а во-вторых, возрастает гидрофобность образовавшегося продукта гидролиза. Наибольшее увеличение K_{OC} (30%) наблюдалось для ГК чернозема. В случае торфяных ГК значения констант изменялись не столь существенно. Константы связывания Ру гидролизуемой частью ГК для всех исследованных препаратов были ниже минимально определяемой величины

0.1×10^{-5} л/кг С. Это позволяет сделать вывод о том, что периферическая часть молекул ГК практически не участвует в связывании Ру.

Таблица 7.6

Константы связывания Ру исходными препаратами ГК и продуктами их гидролиза (n = 7, P = 0.95)

Препарат	$K_{OC} \times 10^{-5}$ л/кг С	Препарат	$K_{OC} \times 10^{-5}$ л/кг С	Препарат	$K_{OC} \times 10^{-5}$ л/кг С
исходные ГК		негидролизуемая часть		гидролизуемая часть	
РНА-Т3Л98	1.2±0.3	РННР-Т3Л98	1.3±0.2	РННД-Т3Л98	<0.1*
РНА-Т4Н98	1.2±0.3	РННР-Т4Н98	1.7±0.3	РННД-Т4Н98	<0.1
РНА-Т5Н98	1.2±0.2	РННР-Т5Н98	1.4±0.2	РННД-Т5Н98	<0.1
РНА-Т6Н98	1.4±0.2	РННР-Т6Н98	1.8±0.4	РННД-Т6Н98	<0.1
SНА-СТ98	2.8±0.3	SHНР-СТ98	3.4±0.4	SHНД-СТ98	<0.1

* минимально определяемое значение K_{OC} .

Полученные данные можно рассматривать как экспериментальное подтверждение ведущей роли ароматического каркаса в связывании ПАУ гумусовыми кислотами. Чем больше вклад ароматических фрагментов в структуру гумусовых кислот, чем меньше она экранирована углеводно-обогатненными периферическими фрагментами, тем выше их связывающая способность по отношению к ПАУ.

7.2.3 Зависимость констант связывания ПАУ гумусовыми кислотами от pH и ионной силы среды

В связи с тем, что константы связывания, определяемые по уравнению (1.27), являются условными, то была изучена их зависимость от pH и ионной силы среды. Результаты исследования опубликованы в [Яценко и др., 1999]. Выявление характера такой зависимости особенно важно для расчета распределения ПАУ по формам существования в природных водах с учетом их связывания гумусовыми кислотами.

Для исследования влияния pH среды на константы Ру, Flt и An были выбраны препараты гумусовых кислот, существенно различающиеся по величине K_{OC} : ГК угля; ГК почв; ГФК торфа и ГФК природных вод. Требуемый pH в растворах гумусовых кислот в присутствии ПАУ создавали с помощью 0.1 М NaOH и концентрированной HCl. Диапазон изменений pH составил 2.1-8.4.

Полученные зависимости K_{OC} от pH среды приведены на рис. 7.7. Как видно из представленных данных, величина K_{OC} увеличивалась с уменьшением pH. При этом снижение pH от 8.5 до 3.8 сопровождалось лишь

незначительным увеличением K_{OC} (на 10-20%). В то же время дальнейшее уменьшение pH от 3.8 до 2 вызывало двукратное возрастание K_{OC} . В наибольшей степени данный эффект был выражен для Ру и Flt, в меньшей – для An. Максимальное изменение K_{OC} наблюдалось в присутствии препаратов ГК угля и чернозема для Ру и Flt. Так, в случае Ру, значения соответствующих констант уменьшались от 3.0×10^5 до 0.6×10^5 и от 3.0×10^5 до 1.0×10^5 л/кг С при увеличении pH от 2.1 до 8.4. Для Flt соответствующие изменения составили $2.5 \times 10^5 - 0.4 \times 10^5$ и $2.7 \times 10^5 - 0.8 \times 10^5$ л/кг С. В меньшей степени этот эффект был выражен для ГК дерново-подзолистых и серых лесных почв: K_{OC} пирена уменьшалась в диапазоне $2.4 \times 10^5 - 1.1 \times 10^5$ л/кг С при изменении pH от 2.1 до 8.4. В случае Flt – от 1.8×10^5 до 0.7×10^5 л/кг С. Константы связывания ПАУ препаратами ГФК природных вод, для которых были характерны минимальные значения, практически не зависели от pH среды. В случае An наиболее существенное уменьшение K_{OC} наблюдалось при изменении pH от 6.4 до 8.4. Исключение составили ГК угля, для которых K_{OC} уменьшались во всем диапазоне увеличения pH.

Увеличение степени связывания ПАУ гумусовыми кислотами при снижении pH, по-видимому, связано с возрастанием гидрофобности гумусовых кислот в результате протонирования ионогенных групп их макромолекул.

Для установления аналитического выражения, которое описывало бы зависимость K_{OC} от pH среды, полученные зависимости были аппроксимированы следующей двухпараметрической функцией:

$$K_{OC}^{pH} = K_{OC}^0 ((1 - b) \times (pH^0/pH)^c + b) \quad (7.45),$$

где K_{OC}^0 – константа связывания ПАУ гумусовыми кислотами при pH 2;

K_{OC}^{pH} – константа связывания при заданном pH.

b, c – эмпирические коэффициенты:

для Ру: $b = -0.30$; $c = 0.50$;

для Flt: $b = 0.20$; $c = 1.30$;

для An: $b = -450$; $c = 0.001$.

Значения коэффициентов b, c рассчитывали путем минимизации суммы квадратов отклонений расчетной и экспериментальной кривых pH-зависимостей K_{OC} . Примеры аппроксимации экспериментальных зависимостей с помощью функции (7.45) приведены на рис. 7.8 для Ру. Аналогичные зависимости были получены для Flt и An.

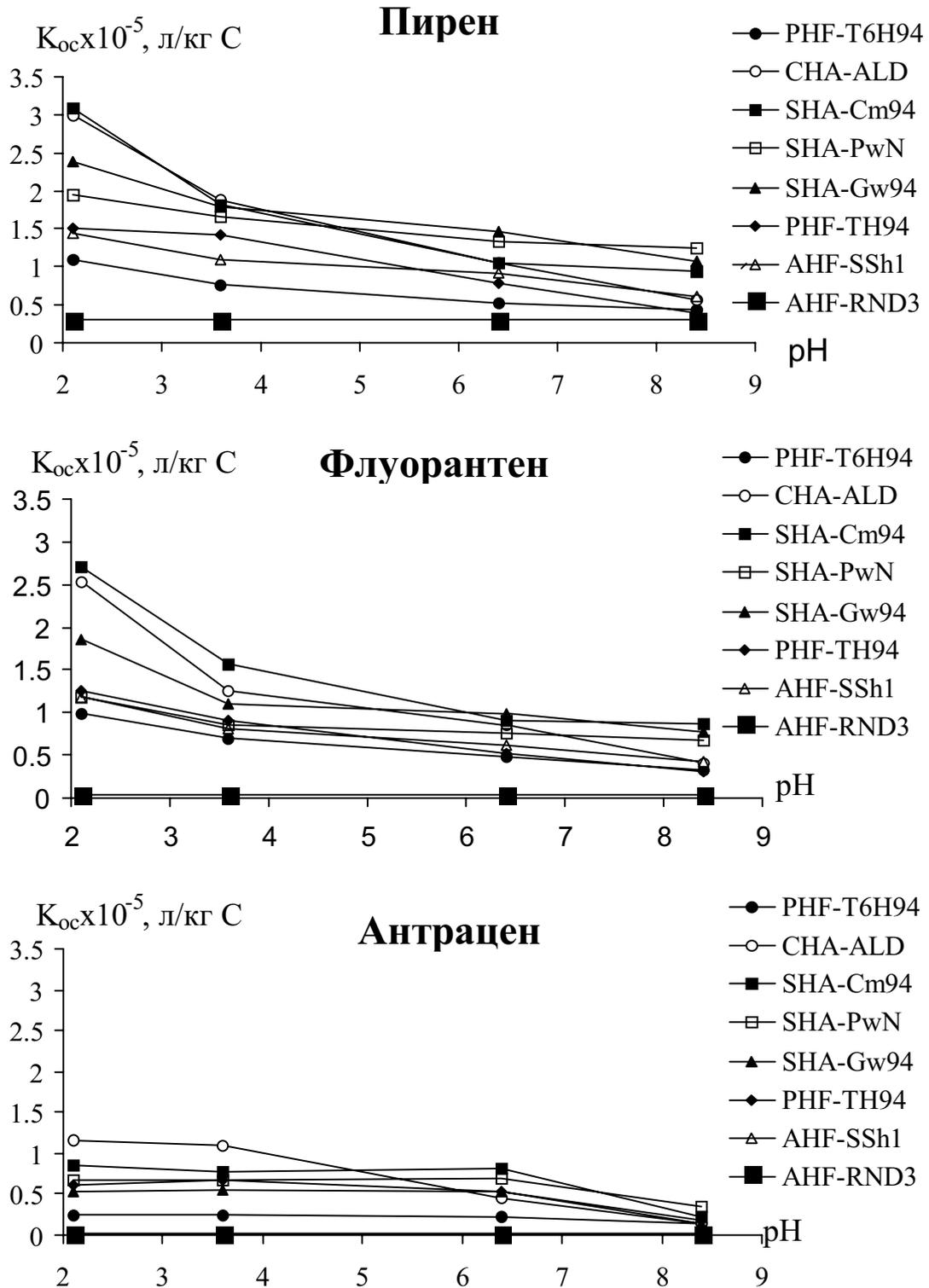


Рис. 7.7. Зависимость K_{oc} модельных ПАУ от рН среды.

Как видно из рис. 7.8, используемое уравнение (7.45) позволяет аппроксимировать экспериментальные кривые с достаточно высоким уровнем статистической достоверности. Соответствующие r^2 составили, в среднем, 0.92 в случае Ру и 0.95 и 0.80 для Flt и An.

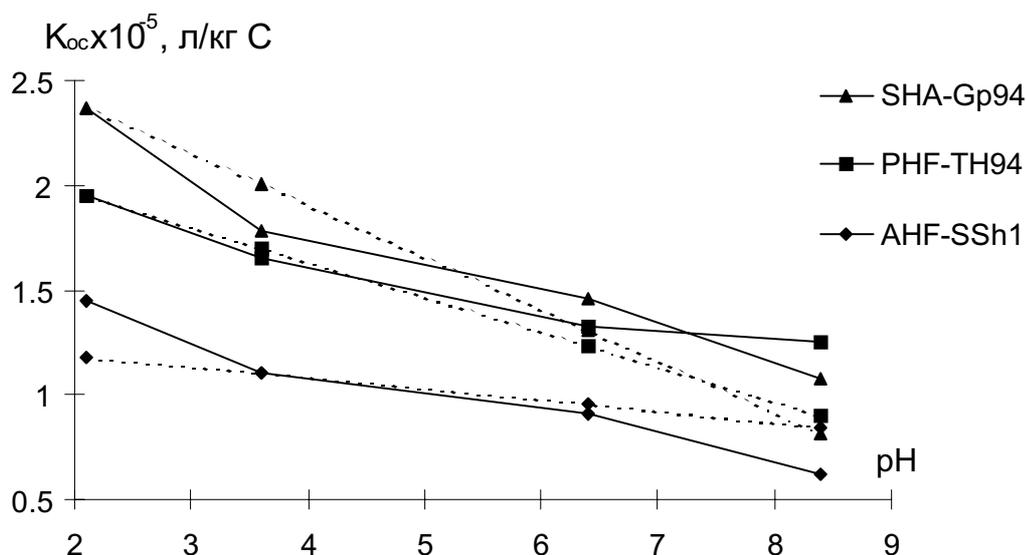


Рис. 7.8. Зависимость K_{OC} пирена от pH для гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава (сплошными линиями обозначены экспериментальные данные; пунктирными – рассчитанные).

Исследование влияния ионной силы на связывающую способность гумусовых кислот по отношению к Ру, Flt и An проводились на той же выборке препаратов, существенно различающихся по величине K_{OC} . В случае An вместо водных ГФК были использованы торфяные, т.к. какого-либо связывания An с водными ГФК зарегистрировано не было. Требуемую ионную силу (I) в растворах ГФК-ПАУ создавали с помощью NaCl. Диапазон изменения I составил 1×10^{-4} – 2.5×10^{-1} М. Полученные зависимости K_{OC} от логарифма ионной силы среды приведены на рис. 7.9.

Как видно из рис. 7.9, для всех исследованных препаратов ГФК наблюдалось уменьшение K_{OC} по мере возрастания ионной силы. При этом наиболее существенное изменение K_{OC} (20–30%) было характерно для препаратов с высоким сродством к ПАУ – ГК угля и чернозема в интервале концентраций электролита 1×10^{-3} – 1×10^{-2} М. Дальнейшее увеличение концентрации NaCl до 0.25 М практически не влияло на степень связывания ГФК ни с Ру, ни с Flt. В то же время для An наблюдалось снижение K_{OC} во всем диапазоне изменения ионной силы.

Уменьшение степени связывания ПАУ с возрастанием ионной силы, по-видимому, обусловлено конформационными изменениями макромолекул гумусовых кислот в растворе электролита. Так, увеличение ионной силы вызывает экранирование заряда полианиона и, следовательно, способствует принятию им более компактной конформации. Как следствие, уменьшается эффективная площадь контакта гидрофобной поверхности макромолекул гумусовых кислот с ПАУ, что приводит к уменьшению их констант связывания.

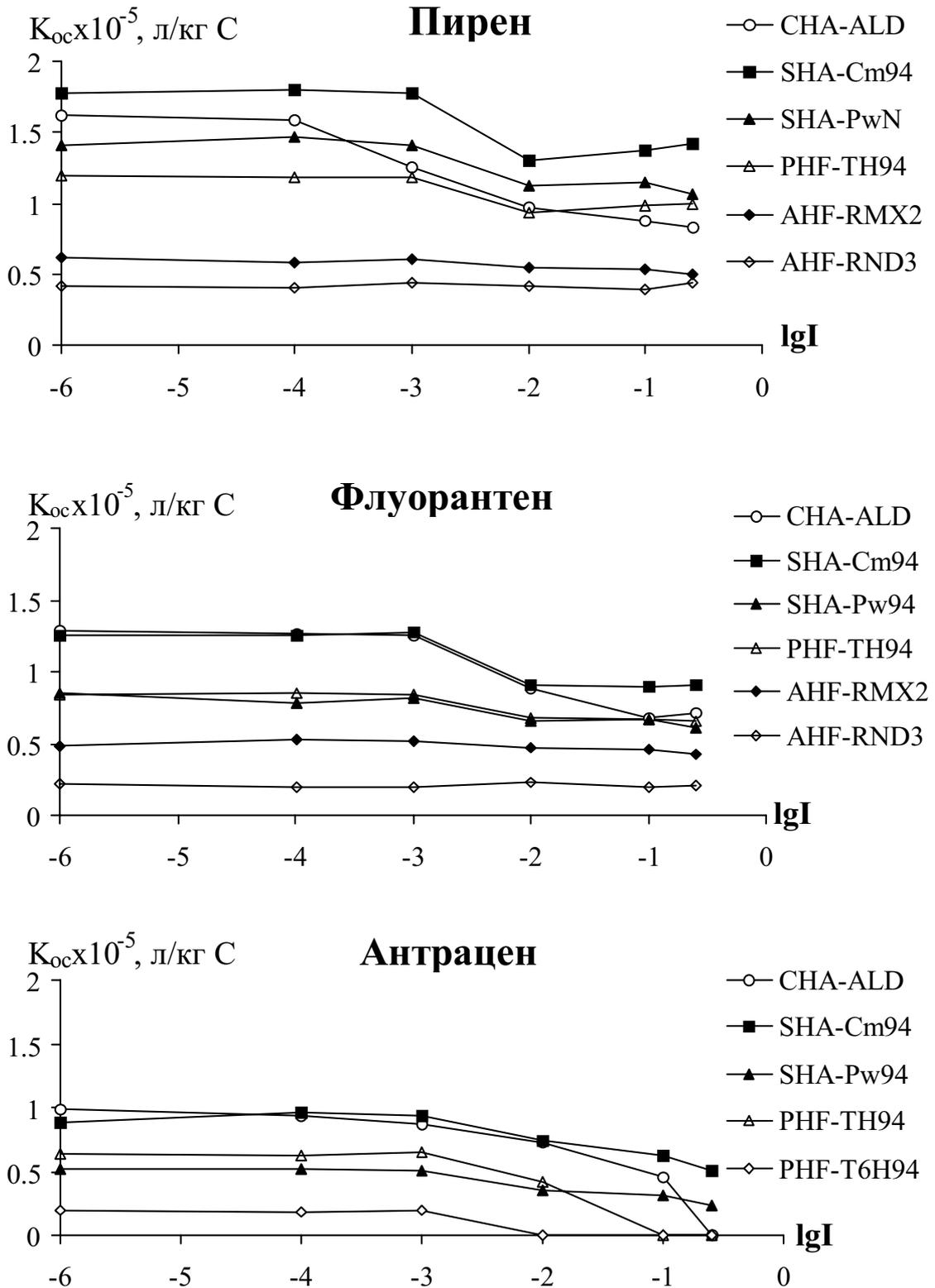


Рис. 7.9. Зависимость K_{OC} модельных ПАУ от ионной силы среды.

Для установления аналитического выражения, которое описывало бы зависимость K_{OC} от I , полученные зависимости были аппроксимированы следующей двухпараметрической функцией:

$$K_{OC}^I = (1 - b) \times K_{OC}^{I=0} \times \text{EXP}(-c \times I + b) \quad (7.46)$$

где $K_{OC}^{I=0}$ – константа связывания ПАУ гумусовыми кислотами при ионной силе раствора равной нулю;

K_{OC}^I – константа связывания при ионной силе I ;

b, c – эмпирические коэффициенты:

для Ру: $b = 0.75$; $c = 184$;

для Flt: $b = 0.70$; $c = 102$;

для An: $b = 0.32$; $c = 38$;

Коэффициенты b, c из уравнения (7.46) определяли путем минимизации суммы квадратов отклонений экспериментальных и теоретических зависимостей. Примеры аппроксимационных кривых приведены на рис. 7.10 для Ру. Аналогичные зависимости были получены для Flt и An.

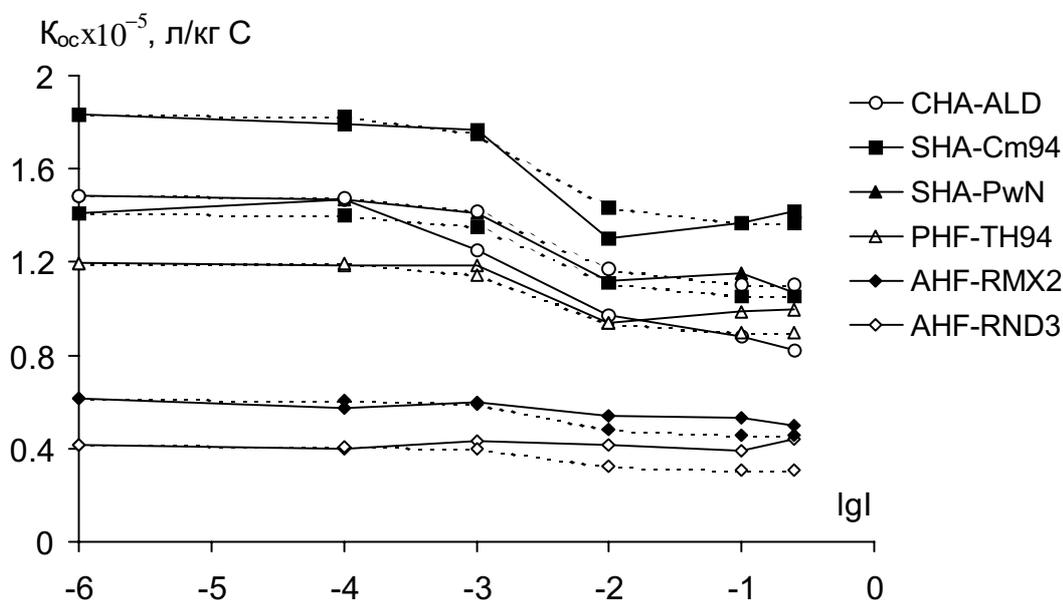


Рис. 7.10. Зависимость K_{OC} пирена от ионной силы для гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава (сплошные линии – экспериментальные данные; пунктирные – рассчитанные).

Как видно из представленных зависимостей, предложенное уравнение (7.46) позволяет аппроксимировать экспериментальные кривые с достаточно высоким уровнем статистической достоверности. Соответствующие r^2 составили, в среднем, 0.83 в случае Ру и 0.88 и 0.92 для Flt и An.

В связи с тем, что галогенид-ионы в высоких концентрациях также могут вызывать тушение флуоресценции ПАУ [Паркер, 1972; Engebretson and Wandruszka, 1994], которое в этом случае не будет связано с образованием нефлуоресцирующих комплексов ПАУ-ГФК, то нами была исследована зависимость интенсивности флуоресценции модельных ПАУ от концентрации

фонового электролита (NaCl). Результаты измерений показали, что интенсивность флуоресценции ПАУ не изменялась во всем диапазоне изменения ионной силы от 1×10^{-4} до 2.5×10^{-1} М. Данный факт может свидетельствовать об отсутствии эффекта тушения флуоресценции ПАУ хлорид-ионами в условиях эксперимента.

Проведенные исследования показывают, что сродство гумусовых кислот к ПАУ зависит не только от их строения, но и от параметров водной среды, в которой происходит это взаимодействие. Описанный характер зависимости K_{OC} от рН и ионной силы хорошо согласуется с предположением о преобладающем вкладе гидрофобных взаимодействий в связывание ПАУ гумусовыми кислотами. Полученные двухпараметрические зависимости K_{OC} от рН и ионной силы могут быть использованы для корректировки значений констант связывания ПАУ гумусовыми кислотами при изменении параметров водной среды.

7.2.4 Определение констант связывания гумусовых кислот с атразином

Атразин является представителем класса симм-триазинов (рис. 7.11.) – персистентных гербицидов системного действия. Для него характерны малая растворимость в воде (30 мг/л при 25°C), способность протонироваться при низких значениях рН ($pK_a \approx 1.7$) и слабовыраженные гидрофобные свойства ($\lg K_{OW} = 2.7$) [Devitt and Weisner, 1998].

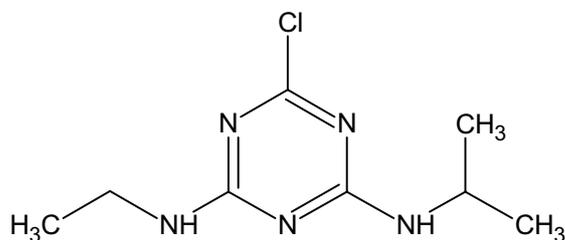


Рис. 7.11. Структурная формула атразина.

Для определения констант связывания атразина гумусовыми кислотами использовали тот же подход, что и для ПАУ, рассчитывая ее как константу сорбции по уравнению (1.26). Данная часть работы подробно изложена в соответствующей публикации [Kulikova et al., 2000]. Для экспериментального нахождения данной константы необходимо определять долю свободнорастворенного атразина (α) в присутствии гумусовых кислот. Тогда из уравнения (1.26) имеем:

$$\frac{1}{\alpha} + 1 = K_{OC} \times C_{ГФК} \quad (7.47)$$

Атразин, в отличие от ПАУ, не флуоресцирует, что делает неприменимым использование метода тушения флуоресценции. Поэтому

прибегали к другому способу, основанному на разделении свободнорастворенного и связанного гумусовыми кислотами атразина методом ультрафильтрации. Для разделения использовали мембраны с пределом пропускания 1000 Да. Определение свободнорастворенного атразина в фильтрате осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с УФ-детектированием при 220 нм.

Связывающие свойства гумусовых кислот по отношению к атразину проводили с использованием выборки, состоящей преимущественно из препаратов почв, так как проблема загрязнения гербицидами наиболее актуальна для почвенных сред. Для расширения диапазона изучаемых свойств в выборку были включены и другие препараты. Всего в нее вошло 16 препаратов: 8 ГК, 3 ФК и 1 ГФК почв; 1 ГФК, 1 ГК и 1 РОВ торфа, 1 ГК угля.

Эксперименты по связыванию атразина гумусовыми кислотами проводили при следующих условиях: концентрация атразина C_A 10^{-5} М; концентрация гумусовых кислот $C_{ГФК} = (1.5-6.5) \times 10^{-4}$ кг С/л; рН 5.5; время взаимодействия – 24 ч. Константу связывания атразина гумусовыми кислотами находили как тангенс угла наклона зависимости $(1/\alpha+1)$ от концентрации гумусовых кислот. Типичные графики указанной зависимости для препаратов гумусовых кислот различных классов приведены на рис. 7.12.

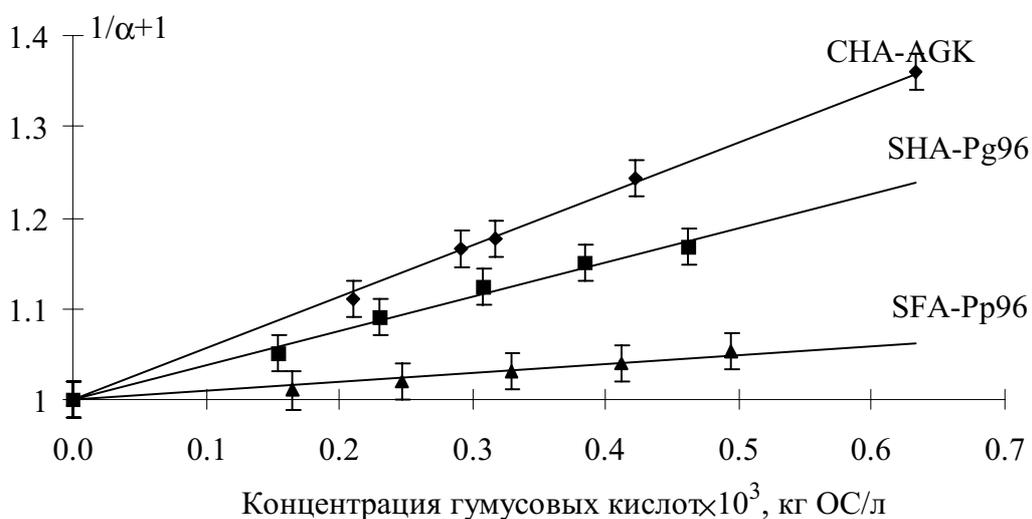


Рис. 7.12. Типичные графики зависимости $1/\alpha+1$ от концентрации гумусовых кислот. α – доля свободнорастворенного атразина ($n = 5$, $P = 0.95$).

Как видно из рис. 7.12, исследованные препараты гумусовых кислот обладали различной связывающей способностью по отношению к атразину. Об этом же свидетельствуют и полученные значения K_{OC} (табл. 7.7).

Константы связывания (K_{OC}) атразина гумусовыми кислотами
($n = 5$; $P = 0.95$)

Препарат	K_{OC} , л/кг ОС	Препарат	K_{OC} , л/кг ОС
ГФК торфа		ГК почв	
PHF-T494	370±20	SHA-Pw94	380±20
ГК торфа		SHA-Pw96	281±20
PHA-THTO	300±20	SHA-Pp96	180±10
РОВ торфа		SHA-Pg94	400±30
PDOM-TH	87±5	SHA-Pg96	380±30
ГФК почв		SHA-Gw94	580±40
SHF-Co94	44±30	SHA-Cm94	50±30
ФК почв		SHA-CtV94	40±20
SFA-Pw96	190±10	ГК углей	
SFA-Pp96	110±7	CHA-AGK	580±30
SFA-Pg96	280±20		

Рассчитанные константы связывания атразина гумусовыми кислотами находятся в пределах 90-580 л/кг С, что хорошо согласуется с существующими литературными данными [Grover and Hance, 1970; Brown and Flagg, 1981; Gamble and Khan, 1988; Wang et al., 1990]. Значения констант свидетельствуют о слабом сродстве гумусовых кислот к атразину: соответствующие константы связывания ПАУ (табл. 7.5) на три порядка выше, чем атразина.

Как видно из табл. 7.7, наибольшей связывающей способностью по отношению к атразину обладал препарат ГК угля, а наименьшей – ОВ водного экстракта торфа. Среди ряда почвенных препаратов наименьшие значения K_{OC} были получены для ФК, наибольшие – для ГК черноземов и промежуточные – для ГК П^Д. Полученные значения K_{OC} для трех пар ГК и ФК, выделенных из одной почвы, показывают, что ГК в целом обладают большим сродством к атразину, чем ФК. В тоже время большее сходство в связывающей способности наблюдали для ГК и ФК из одной почвы, чем для ГК или ФК из разных почв. Так ГК и ФК из огородной дерново-подзолистой почвы (SHA-Pg96 и SFA-Pg96) показали более высокую связывающую способность по сравнению с ГК и ФК, выделенными из дерново-подзолистой почвы под лесом (SHA-Pw96 и SFA-Pw96). ГК и ФК дерново-подзолистой полевой почвы (SHA-Pp96 и SFA-Pp96) обладали наименьшим сродством к атразину в ряду изученных дерново-подзолистых почв.

Полученные данные свидетельствуют о возрастании сродства гумусовых кислот к атразину по мере увеличения их ароматичности (максимальные значения K_{OC} найдены для ГК угля и чернозема), что подтверждается и результатами корреляционного анализа с дескрипторами структурно-группового состава, которые будут подробно обсуждены в Главе 8. Указанная тенденция хорошо согласуется с закономерностями, установленными для ПАУ. Следовательно, наиболее вероятным механизмом взаимодействия гумусовых кислот с атразином, как и в случае ПАУ, является гидрофобное связывание. Об этом свидетельствует и существенное большие значения констант связывания, найденные для высокогидрофобных ПАУ по сравнению с атразином.

Таким образом, выполнены систематические исследования по количественной оценке связывающих свойств гумусовых кислот по отношению к ПАУ и атразину. Определены константы связывания ПАУ и атразина для представительных выборок препаратов различного происхождения и фракционного состава, которые могут быть использованы в качестве прогнозируемых признаков при разработке моделей “строение – свойство”, а также для расчета форм существования ПАУ и атразина в природных средах. На основании характера зависимости констант связывания от гидрофобности органических экотоксикантов и ароматичности исследованных препаратов гумусовых кислот сделан вывод о гидрофобном механизме связывания гумусовых кислот с ПАУ и атразином.

7.3 Концепция константы детоксикации как количественной характеристики детоксицирующих свойств гумусовых кислот

Важнейшим экологическим последствием процессов связывания экотоксикантов гумусовыми кислотами является снижение концентрации свободнорастворенной, наиболее биологически активной формы экотоксиканта. Эффекты детоксикации, вызываемые присутствием гумусовых кислот, многократно описаны в литературе и подробно обсуждены в обзоре литературы (разделы 1.5.3 и 1.6.3). Однако количественная оценка детоксицирующих свойств гумусовых кислот оставалась нерешенной проблемой на момент постановки настоящих исследований. Получение таких оценок необходимо для разработки системы скрининга препаратов гумусовых кислот и для прогностического моделирования их детоксицирующих свойств.

Для количественной оценки детоксицирующих свойств гумусовых кислот был использован подход, являющийся оригинальной разработкой нашей рабочей группы. Его рассмотрение заслуживает особого внимания, так

как он во многом predetermined логику постановки соответствующих токсикологических экспериментов. Поэтому мы сочли необходимым предварить изложение результатов исследования детоксицирующих свойств гумусовых кислот подробным рассмотрением введенных для этой цели количественных параметров: коэффициента детоксикации D и константы детоксикации K_{OC}^D , определяемых из данных токсикологических экспериментов.

Основной трудностью при оценке детоксицирующих свойств гумусовых кислот является то, что помимо химического взаимодействия с ЭТ, приводящего к уменьшению концентрации его свободной формы, гумусовые кислоты оказывают собственное воздействие на биологический объект, используемый в качестве тест-организма. Так, наблюдаемое снижение токсичности ЭТ в присутствии гумусовых кислот может быть обусловлено как его связыванием в нетоксичные комплексы, так и стимулирующим действием гумусовых кислот. Поэтому для расчета детоксицирующей способности препаратов гумусовых кислот был введен особый показатель – коэффициент детоксикации D . Его подробное описание приведено в наших соответствующих публикациях [Perminova et al., 1996; Steinberg et al., 1999]. Достоинством данного показателя является то, что он отражает изменение уровня токсичности ЭТ в присутствии гумусовых кислот ($T_{ЭТ+ГФК}$) по сравнению с токсичностью ЭТ в их отсутствие ($T_{ЭТ}$), учитывая при этом возможное изменение тест-отклика под влиянием собственного воздействия гумусовых кислот. Принимая, что:

$$T_{ЭТ} = \frac{R_0 - R_{ЭТ}}{R_0} \quad (7.48)$$

и

$$T_{ЭТ+ГФК} = \frac{R_{ГФК} - R_{ЭТ+ГФК}}{R_{ГФК}} \quad (7.49),$$

где R_0 – тест-отклик в контроле (без ЭТ и ГФК);

$R_{ЭТ}$ – тест-отклик в присутствии ЭТ;

$R_{ГФК}$ – тест-отклик в присутствии ГФК;

$R_{ЭТ+ГФК}$ – тест-отклик в присутствии ЭТ и ГФК, получаем:

$$D = \frac{T_{ЭТ} - T_{ЭТ+ГФК}}{T_{ЭТ}} = 1 - \frac{T_{ЭТ+ГФК}}{T_{ЭТ}} \quad (7.50)$$

При условии, что чувствительность тест-организмов к собственному действию гумусовых кислот не изменяется в присутствии ЭТ, использование коэффициента D позволяет охарактеризовать детоксицирующий эффект гумусовых кислот, обусловленный только связыванием ЭТ в нетоксичные

комплексы, на фоне их стимулирующего воздействия на тест-объект. Поэтому зная зависимость коэффициента D от концентрации гумусовых кислот (т.н. кривую детоксикации), можно рассчитать константу детоксикации K_{OC}^D . Преимущество данного параметра при оценке детоксикации по сравнению с коэффициентом D состоит в том, что если последний позволяет получить точечную оценку детоксикации, то K_{OC}^D является характеристикой детоксицирующей способности гумусовых кислот во всем диапазоне концентраций. При этом его физический смысл аналогичен K_{OC} .

Для вывода уравнения данной константы запишем уравнение связывания ЭТ гумусовыми кислотами:



Тогда долю ЭТ, находящегося в свободном состоянии (α), можно выразить через соответствующую константу связывания:

$$\alpha = \frac{[\text{ЭТ}]}{[\text{ЭТ}] + [\text{ЭТ-ГФК}]} = \frac{1}{1 + C_{\text{ГФК}} \times K_{OC}} \quad (7.52)$$

Сделаем допущение, что токсичность раствора прямо пропорциональна концентрации ЭТ. Тогда токсичность в присутствии ЭТ запишется как:

$$T_{\text{ЭТ}} = k \times C_{\text{ЭТ}} \quad (7.53)$$

где k – коэффициент пропорциональности.

Токсичность ЭТ в присутствии гумусовых кислот аналогично можно записать как:

$$T_{\text{ЭТ+ГФК}} = k \times [\text{ЭТ}] \quad (7.54)$$

Подставляя (7.53) и (7.54) в уравнение (7.50), получаем:

$$D = 1 - \frac{[\text{ЭТ}]}{C_{\text{ЭТ}}} = 1 - \alpha \quad (7.55)$$

Выражая долю несвязанного ЭТ (α) через концентрацию гумусовых кислот на основании зависимости K_{OC} от α (1.26), получаем:

$$D = \frac{K_{OC}^D \times C_{\text{ГФК}}}{1 + K_{OC}^D \times C_{\text{ГФК}}} \quad (7.56)$$

Фигурирующую в данном уравнении константу, определяемую видом зависимости эффекта детоксикации от концентрации гумусовых кислот, мы назвали константой детоксикации – K_{OC}^D . Она будет эквивалентна константе химического связывания ЭТ-ГФК только в том случае, если величина эффекта детоксикации D зависит от единственного фактора – концентрации свободной формы ЭТ. На практике K_{OC}^D можно рассчитать путем аппроксимации экспериментальных зависимостей D от концентрации гумусовых кислот уравнением (7.56). Поэтому результаты всех токсикологических экспериментов представляли в виде соответствующих кривых детоксикации.

Использование данного интерпретационного аппарата предъявляло вполне конкретные требования к постановке экспериментов по детоксикации. Так, для расчета каждой точки на кривой детоксикации необходимо было измерить тест-отклик в четырех тест-системах: (1) контроль, (2) ЭТ при рабочей концентрации в отсутствие гумусовых кислот, (3) гумусовые кислоты при тестируемой концентрации в отсутствие ЭТ, (4) ЭТ (рабочая концентрация) в присутствии тестируемой концентрации гумусовых кислот.

В связи с изложенным, все дальнейшие эксперименты по детоксикации проводились в соответствии с описанными требованиями.

7.4 Исследование детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к Hg(II)

7.4.1 Выбор условий биотестирования для изучения детоксикации Hg(II) гумусовыми кислотами

В отличие от большинства других тяжелых металлов, ртуть практически не встречается в природных средах в форме свободного иона Hg^{2+} . Основные формы существования ртути (II) в отсутствие гумусовых кислот – $\text{Hg}(\text{OH})_2$ и HgCl_2 . При этом соотношение $\text{Hg}(\text{OH})_2:\text{HgCl}_2$ зависит от pH и концентрации хлорид-ионов (рис. 7.13).

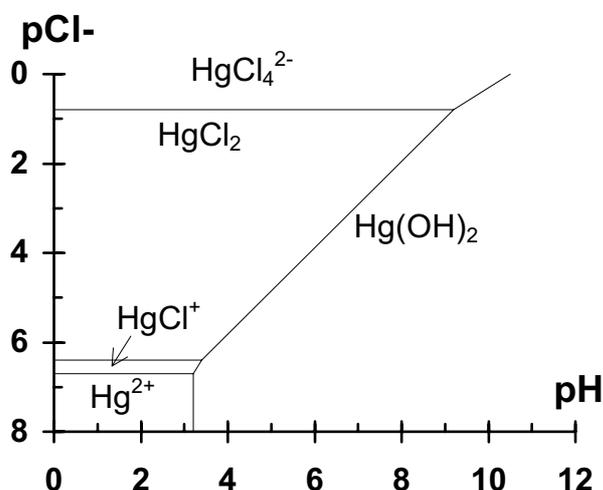


Рис. 7.13. Формы существования Hg(II) в зависимости от pH и концентрации хлорид-ионов.

Таким образом, токсическое действие могут оказывать свободный ион Hg^{2+} (что маловероятно, поскольку его доля в природных средах крайне незначительна), $\text{Hg}(\text{OH})_2$ или HgCl_2 , причем их токсическое действие может различаться [Mason et al., 1996]. Поэтому в первую очередь необходимо было установить, какая из вышеуказанных форм оказывает наибольшее токсическое действие, с тем, чтобы исследовать детоксицирующие свойства гумусовых кислот по отношению к этой форме.

Определение диапазонов токсичности $\text{Hg}(\text{OH})_2$ и HgCl_2 . Для исследования детоксицирующего действия гумусовых кислот по отношению к $\text{Hg}(\text{II})$ применялся метод альгологического тестирования. Тест-объектом служила одноклеточная водоросль *Chlorella pyrenoidosa*, выбор которой был обусловлен отработанностью соответствующей методики биотестирования [Полынов, 1992]. В качестве тест-функции использовали относительный выход переменной флуоресценции $R = F_v/F_m$, характеризующий долю поглощенной световой энергии, направляемую на фотосинтез. Время экспозиции составило 4 часа.

Тест-среды для изучения токсичности HgCl_2 и $\text{Hg}(\text{OH})_2$ готовили на основе среды Тамия (5 мМ KNO_3 и 1 мМ MgSO_4), варьируя pH и содержание KCl . Распределение $\text{Hg}(\text{II})$ по формам существования в тест-средах рассчитывали на основании литературных данных по соответствующим константам устойчивости [SCDB], усредненным и приведенным к ионной силе среды для биотестирования по уравнению Дэвиса (1.22) (табл. 7.8). В ходе токсикологического эксперимента pH несколько изменялся в результате жизнедеятельности водорослей. Поэтому распределение $\text{Hg}(\text{II})$ рассчитывали с учетом pH раствора в конце биотестирования.

Таблица 7.8

Среды для тестирования токсичности ртути (II)

№	Конц. KCl	pH в начале/конце тестирования	$\text{HgCl}_2:\text{Hg}(\text{OH})_2$ в конце тестирования	$[\text{Hg}^{2+}]/C(\text{Hg}^{2+})$
1	0	7.3 / 6.9-7.5	0 / 0	$1.6 \times 10^{-8} - 1.6 \times 10^{-9}$
2	0.01 М	6.4 / 5.9-6.8	7200-114	2.5×10^{-10}

Как видно из таблицы, в среде №1 основная форма ртути $\text{Hg}(\text{OH})_2$, в среде №2 – HgCl_2 . Доля свободного иона в обеих средах незначительна. Результаты альгологического тестирования обеих сред приведены на рис. 7.14.

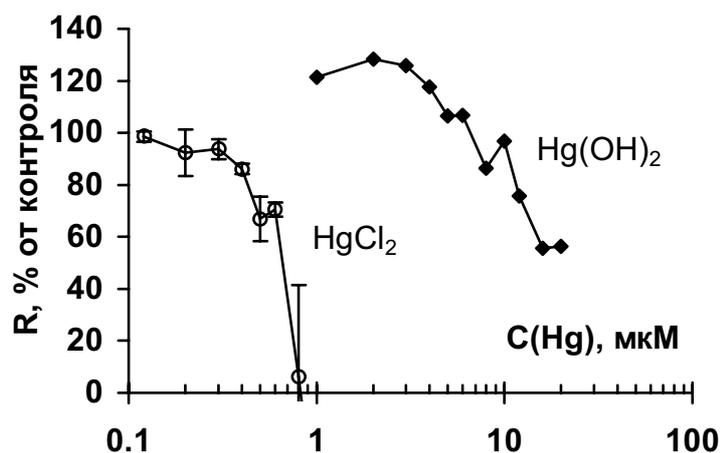


Рис. 7.14. Токсическое действие HgCl_2 и Hg(OH)_2 на водоросль *Chlorella pyrenoidosa*; для HgCl_2 приведены средние значения по двум измерениям.

Как видно из рис. 7.14, токсичность Hg(II) в обеих средах заметно различается. Соответствующие диапазоны токсичности приведены в табл. 7.9.

Таблица 7.9

Диапазоны токсичности Hg(OH)_2 и HgCl_2

Форма	Hg(OH)_2	HgCl_2
ЭК ₀ , мкМ Hg(II)	4	0.3
ЭК ₅₀ , мкМ Hg(II)	16	0.6
ЭК ₁₀₀ , мкМ Hg(II)	не достигнута	0.8

Как видно из табл. 7.9, для исследуемого тест-объекта HgCl_2 более, чем на порядок токсичнее, чем Hg(OH)_2 . Это говорит о том, что уровень токсичности среды преимущественно будет обусловлен содержанием HgCl_2 .

Указанное различие в токсическом действии HgCl_2 и Hg(OH)_2 может быть обусловлено либо сорбцией Hg(OH)_2 на стенках культиватора, сопровождающейся снижением его концентрации в тест-системе, либо различием токсического действия HgCl_2 и Hg(OH)_2 .

Для проверки данных предположений было изучено распределение Hg(II) между биомассой водоросли, средой для биотестирования и стенками культиватора. Для этого во всех трех указанных компонентах тест-системы определяли содержание Hg(II) по окончании токсикологического эксперимента. Полученные данные по распределению Hg(II) в тест-системах приведены на рис. 7.15 и рис. 7.16.

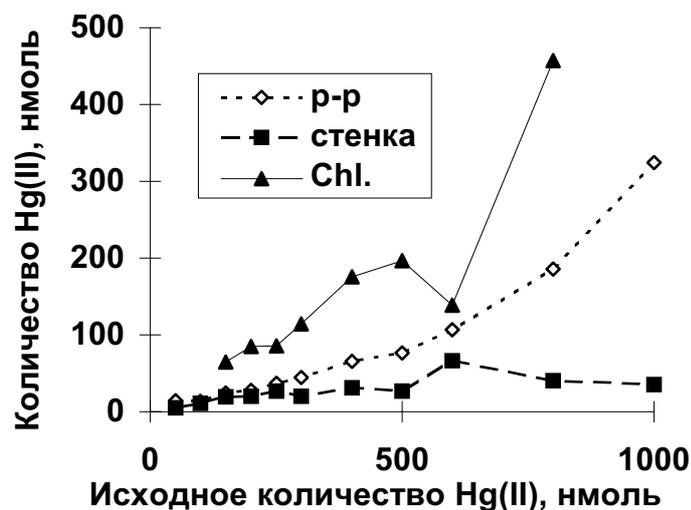


Рис. 7.15. Распределение ртути между компонентами тест-системы в среде с $\text{Hg}(\text{OH})_2$.

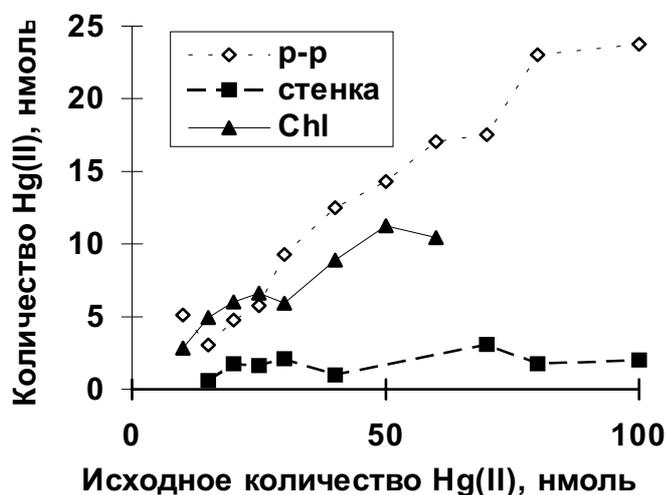


Рис. 7.16. Распределение ртути между компонентами тест-системы в среде с HgCl_2 .

Из приведенных данных видно, что в обеих тест-средах на стенках сорбируется не более 10% от введенного $\text{Hg}(\text{II})$, поэтому различие в токсичности $\text{Hg}(\text{OH})_2$ и HgCl_2 не может быть обусловлено различной сорбцией на стенках культиватора. Кроме того, накопление $\text{Hg}(\text{II})$ в биомассе водоросли существенно зависело от наличия хлорид-ионов в среде. Так, в отсутствие хлоридов две трети всей обнаруженной $\text{Hg}(\text{II})$ находилось в биомассе хлореллы, в то время как в присутствии хлоридов эта величина составляла менее половины. Следует заметить, что для HgCl_2 при ЭК_0 (0.3 мкМ) хлорелла накапливала 0.1% ртути от сухой массы. В то же время для $\text{Hg}(\text{OH})_2$, при ЭК_0 (3 мкМ) водоросль накапливает 2% ртути от сухой массы. Это говорит о том, что различие в токсическом действии HgCl_2 и

$\text{Hg}(\text{OH})_2$ обусловлено различным уровнем токсичности этих соединений для исследуемого тест-объекта.

При сопоставлении количества введенной и найденной $\text{Hg}(\text{II})$, было обнаружено, что как в среде с $\text{Hg}(\text{OH})_2$, так и с HgCl_2 в ходе токсикологического эксперимента происходят потери ртути. В первом случае они составляют $35 \pm 10\%$, во втором $40 \pm 10\%$, то есть недоопределенное количество $\text{Hg}(\text{II})$ в обеих средах совпадает с точностью до ошибки эксперимента. Специальных исследований о причинах этих потерь не проводили, однако можно предполагать, что в условиях эксперимента часть $\text{Hg}(\text{II})$ восстанавливается водорослью до элементарной и выдувается при барботировании воздуха через тест-систему.

Таким образом показано, что токсичность HgCl_2 для водоросли *Chlorella pyrenoidosa* на порядок выше, чем $\text{Hg}(\text{OH})_2$. Этот факт важен для предсказания токсичности $\text{Hg}(\text{II})$ в водных средах, поскольку показывает, что токсичность одних и тех же концентраций $\text{Hg}(\text{II})$ может различаться в зависимости от состава природных вод.

Для получения достоверной зависимости токсического эффекта HgCl_2 от концентрации HgCl_2 необходимо было учесть колебания чувствительности водоросли в разных экспериментах. С этой целью измеренный токсический эффект нормировали таким образом, чтобы при определенной концентрации токсиканта (в дальнейшем будем называть ее рабочей) значение относительной токсичности составляло 1, а в отсутствие токсиканта 0. Для этого относительную токсичность выражали следующим образом:

$$T = \frac{R_0 - R_t}{R_0 - R_b}, \quad (7.57)$$

где R_t – тест-отклик в присутствии токсиканта, R_b – тест-отклик в присутствии рабочей концентрации токсиканта, R_0 – тест-отклик в контроле.

Для HgCl_2 в качестве рабочей была выбрана концентрация 0.8 мкМ (ЭК_{100}). Полученная зависимость T от концентрации HgCl_2 показана на рис. 7.17.

Полученную зависимость аппроксимировали с помощью линейной функции ($r = 0.94$). При построении аппроксимирующей функции для всего диапазона концентраций HgCl_2 от 0 до рабочей учитывали, что токсикант ниже некой пороговой концентрации не проявлял токсического действия, т.е. $T = 0$. В результате аппроксимирующая функция для описания токсического действия HgCl_2 в диапазоне концентраций от 0 до 0.8 мкМ имеет следующий вид:

$$T = \max(0, 2 \times C(\text{HgCl}_2) - 0.6) \quad (7.58)$$

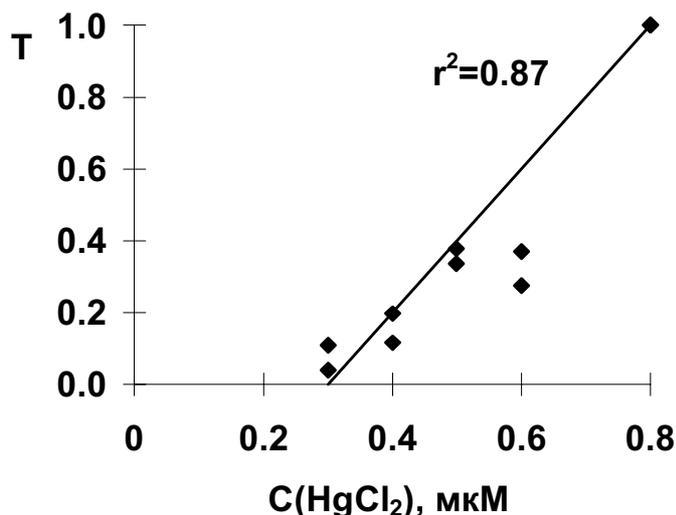


Рис. 7.17. Зависимость относительной токсичности HgCl_2 от концентрации.

7.4.2 Определение констант детоксикации Hg(II) гумусовыми кислотами

Оценку детоксицирующих свойств гумусовых кислот проводили по отношению к наиболее токсичному HgCl_2 . Эксперименты по детоксикации проводили в среде, содержащей 0.01 М KCl и рабочую концентрацию HgCl_2 0.8 мкМ (ЭК_{100} (рис. 7.17)). Диапазон концентраций гумусовых кислот составлял 5-25 мг/л, что характерно для поверхностных вод [Лапин и Красюков, 1991]. В ходе экспериментов измеряли интенсивность фотосинтеза водоросли в условиях постоянной (0.8 мкМ) концентрации HgCl_2 и различных концентраций гумусовых кислот. Чтобы количественно охарактеризовать эффект детоксикации, рассчитывали коэффициент D в соответствии с (7.50). Для этого схема проведения токсикологических экспериментов включала в себя наряду с контрольным вариантом (без HgCl_2 и гумусовых кислот) варианты с внесением HgCl_2 и HgCl_2 +гумусовые кислоты. Вариант внесения гумусовых кислот без HgCl_2 опускали в связи с указанным выше отсутствием собственного действия гумусовых кислот на хлореллу в выбранных условиях эксперимента.

В экспериментах по детоксикации использовали ту же выборку препаратов, что и при изучении комплексообразующих свойств, которая состояла из 24 препаратов различного происхождения и фракционного состава: 2 РОВ вод, 5 ГФК вод, 3 ГФК донных отложений, 2 ГК угля, 6 ГФК торфа, 3 ГК почв и 3 ГФК почв.

Проведенные эксперименты показали, что подавляющее большинство препаратов гумусовых кислот обладало детоксицирующим действием по

равновесную концентрацию Cl^- и РСЦ приравнивали к общей (поскольку хлорид-ионы находятся в большом избытке). Равновесную концентрацию HgРСЦ определяли из уравнения материального баланса (в предположении, что вся ртуть распределяется между комплексами с гумусовыми кислотами и хлоридом):

$$[\text{HgРСЦ}] = C(\text{Hg}) - [\text{HgCl}_2] \quad (7.62)$$

Подставляя (7.62) и (7.61) в (7.60), получаем формулу для расчета константы лигандного обмена из экспериментальных данных:

$$K(\text{РСЦ} / \text{Cl}^-) = \frac{(C(\text{Hg}) - [\text{HgCl}_2]) \cdot C^2(\text{Cl})}{[\text{HgCl}_2] \cdot C(\text{РСЦ})} \quad (7.63)$$

Согласно приведенной схеме для каждой экспериментальной точки рассчитывали константы устойчивости комплексов гумусовых кислот с $\text{Hg}(\text{II})$ из данных по детоксикации $K^D(\text{РСЦ})$, их логарифмировали, усредняли и корректировали по уравнению Дэвиса на ионную силу среды для биотестирования (0.019 моль, корректирующий фактор – 0.49). Полученные значения $K^D(\text{РСЦ})$ приведены в (табл. 7.10). Сопоставление $K^D(\text{РСЦ})$ с $K(\text{РСЦ})$, найденными адсорбционным методом (табл. 7.2), показывает, что они совпадают по порядку величины, при этом значимая корреляция между ними отсутствует.

Полученные данные можно рассматривать как свидетельство того, что связывание $\text{Hg}(\text{II})$ в нетоксичные гуматы является основным механизмом детоксикации $\text{Hg}(\text{II})$ гумусовыми кислотами. Важным следствием данного заключения является то, что в этом случае значения $K(\text{РСЦ})$ можно использовать для оценки токсичности $\text{Hg}(\text{II})$ в разных водоемах. Подробно эта тема обсуждается в соответствующей публикации [Жилин и Перминова, 2000].

Для получения дополнительной количественной оценки процесса детоксикации $\text{Hg}(\text{II})$ гумусовыми кислотами было изучено их влияние на накопление $\text{Hg}(\text{II})$ в биомассе водорослей в присутствии хлоридов. При этом ожидалось, что накопление $\text{Hg}(\text{II})$ в биомассе водорослей будет, как и в случае токсического эффекта, определяться равновесной концентрацией HgCl_2 .

Для этой цели изучали влияние гумусовых кислот на распределение $\text{Hg}(\text{II})$ в системе хлоридсодержащий раствор – биомасса водорослей. При измерении содержания $\text{Hg}(\text{II})$ в тест-растворе и биомассе водоросли по окончании токсикологического эксперимента было обнаружено, что во всех случаях гумусовые кислоты препятствовали накоплению ртути.

Логарифмы констант детоксикации и бионакопления Hg(II)
гумусовыми кислотами различных классов (n = 3, P = 0.95)

Препарат	lgK ^D (РСЦ)	lgK ^B (РСЦ)	Препарат	lgK ^D (РСЦ)	lgK ^B (РСЦ)
РОВ природных вод			ГФК торфа		
ADOM-SMu4	13.8±0.1	14.1±0.2	PHF-T494	14.3±0.1	14.3±0.5
ADOM-SMu8	14.2±0.1	14.0±0.3	PHF-T594	14±1	14.5±0.1
ГФК природных вод			PHF-T694	13.5±0.2	14.3±0.2
AHF-MMu7	–	14.2±0.1	PHF-TН94	13.8±0.5	14.3±0.1
AHF-RND11	–	13.5±0.6	PHF-TMu4	14.0±0.1	14.4±0.1
AHF-RND14	13.7±0.2	13.9±0.3	PHF-TT94	13±3	13±2
AHF-SSH1	–	14.04±0.05	ГК почв		
AHF-SMu8	13.80±0.04	13.6±0.7	SHA-Gw94	14.4±0.2	14.64±0.08
ГФК донных отложений			SHA-Pw94	14.3±0.3	14.9±0.3
BHF-RLuh	13±6	14.3±0.5	SHA-PwN	–	14.1±0.5
BHF-RND13	13.9±0.5	14.4±0.4	ГФК почв		
BHF-SMu2	14.4±0.3	14.6±0.4	SHF-Co94	13.8±0.1	14.3±0.2
ГК углей			SHF-TMu12	14.0±0.1	15.3±0.1
CHA-AGK	13.9±0.1	14.0±0.4	SHF-PMu9	14±2	14.8±0.4
CHA-ALD	13.4±0.2	14.1±0.4			

Данный факт позволил рассчитать константы устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II) из данных по ее бионакоплению. Считая, что накопление Hg(II) в биомассе водорослей, как и в случае токсического эффекта, определяется равновесной концентрацией HgCl₂ (т.е. гуматы не поглощаются хлореллой), причем соответствующая зависимость линейна (т.е. Hg(II) занимает незначительную долю центров связывания на водоросли) можно записать, что:

$$BCF/BCF_0 = 1 - \alpha, \quad (7.64)$$

где BCF – фактор биоконцентрирования Hg(II) в присутствии гумусовых кислот;

BCF₀ – то же в отсутствие гумусовых кислот;

α – доля Hg(II), связанного в комплекс HgРСЦ.

Тогда константы устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II) можно найти из “кривых бионакопления” – зависимости отношения BCF/BCF₀ (аналог отношению токсичностей – эффекту детоксикации D) от концентрации гумусовых кислот, аппроксимируя их функцией (7.56).

С помощью указанной процедуры находится величина $K(\text{PCl}/\text{Cl})/[\text{Cl}^-]^2$. Учитывая, что хлорид-ионы находятся в большом избытке по отношению к ртути, равновесную концентрацию хлоридов можно приравнять к общей, откуда найти константу лигандного обмена и пересчитать ее на константу устойчивости комплексов гумусовых кислот с Hg(II) аналогично тому, как это делалось для токсикологических констант.

Полученные значения констант обозначали $\lg K^B(\text{PCl})$ (табл. 7.10). Они также хорошо согласуются с константами, найденными адсорбционным методом, причем между $\lg K(\text{PCl})$ и $\lg K^B(\text{PCl})$ наблюдается значимая корреляция ($r = 0.67$ при $n = 22$). Это еще раз подтверждает гипотезу о том, что основным механизмом детоксикации ртути(II) гумусовыми кислотами является ее связывание в нетоксичные комплексы, которые не поглощаются водорослью. Отсутствие тесной корреляции между константами детоксикации и $\lg K(\text{PCl})$ может быть связано с проявлением собственного воздействия гумусовых кислот на тест-объект, которое, однако, несопоставимо по величине с детоксицирующим эффектом, вызываемым снижением концентрации свободной формы токсиканта.

7.5 Исследование детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к ПАУ

Для исследования детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к ПАУ был использован метод биотестирования. В качестве тест-объекта была выбрана водная блоха *Daphnia magna*, тест-откликом служила активность питания дафний. Предварительные эксперименты с другим тест-объектом – одноклеточной водорослью *Chl. pyrenoidosa* – показали его непригодность для подобных исследований ввиду низкой чувствительности к токсическому действию ПАУ. Применение методики биотестирования с использованием в качестве тест-объекта *D. magna* [Полынов, 1992] позволило зарегистрировать токсический эффект ПАУ уже на первые сутки экспозиции.

При проведении тестирования дафнии (5-7 особей) помещали в раствор ПАУ, приготовленной на предварительно отстоянной и пропущенной через фильтр “Родничок” водопроводной воде. После суточной экспозиции в стаканчик добавляли хлореллу и измеряли изменение флуоресценции хлорофилла водоросли в процессе ее выедания дафниями. На основании полученных данных рассчитывали скорость питания дафний согласно [Полынов, 1992].

В соответствии с предложенной концепцией получения количественных характеристик детоксицирующих свойств гумусовых кислот (глава 7.3), все схемы проведения токсикологических экспериментов включали в себя наряду с контрольным вариантом (без ПАУ и гумусовых кислот) варианты с

внесением ПАУ и препаратов гумусовых кислот, а также варианты с внесением гумусовых кислот.

Основные результаты данной части работ подробно изложены в соответствующих публикациях [Перминова и др., 1994; Перминова и др., 1995; Perminova et al., 1996; Steinberg et al., 2000; Perminova et al., 2000a; Perminova et al., 2000b].

7.5.1 Выбор условий биотестирования для изучения детоксикации ПАУ гумусовыми кислотами

Для определения диапазонов токсичности Py, Flt и An готовили серии растворов каждого ПАУ с концентрациями в диапазоне: $(1-5) \times 10^{-7}$, $(0.5-7) \times 10^{-7}$ и $(0.2-1.7) \times 10^{-7}$ М, соответственно. Токсичность в присутствии ПАУ ($T_{\text{ПАУ}}$) оценивали в соответствии с уравнением (7.48). Концентрационные зависимости токсичности в присутствии Py, Flt и An приведены на рис. 7.19.

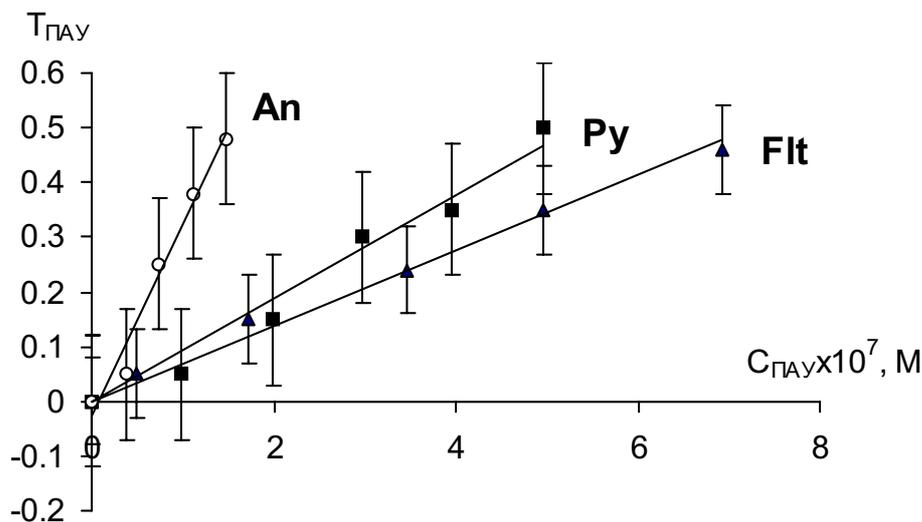


Рис. 7.19. Концентрационные зависимости токсичности Py, Flt и An (тест-объект *D. magna*).

Как видно из рис. 7.19, экспериментальные концентрационные зависимости для всех исследованных ПАУ в выбранном диапазоне концентраций могут быть удовлетворительно аппроксимированы линейной зависимостью, при этом значения r во всех случаях превышали 0.97. Это свидетельствует о том, что получаемые данные токсикологических экспериментов могут быть использованы для расчета констант детоксикации в соответствии с уравнением (7.56).

Максимальная токсичность модельных ПАУ по отношению к *D. magna* наблюдалась при самых высоких концентрациях ПАУ, а именно, 0.5, 0.7 и 0.17 μM для Py, Flt и An, соответственно. Данные концентрации вызывали уменьшение активности питания дафний на $54 \pm 8\%$, $52 \pm 7\%$ и $50 \pm 9\%$ ($P = 0.95$,

$n = 3$), для Py, Flt и An. В дальнейшем именно они были выбраны для проведения экспериментов по определению констант детоксикации ПАУ гумусовыми кислотами.

7.5.2 Определение констант детоксикации ПАУ гумусовыми кислотами

Эксперименты по детоксикации проводили в отстоянной водопроводной воде, пропущенной через угольный фильтр ($pH = 7.1$). Рабочие концентрации ПАУ составляли 0.5, 0.7 и 0.17 μM для Py, Flt и An, соответственно. Концентрацию гумусовых кислот устанавливали в диапазоне 1-25 мг С/л.

Для проведения экспериментов по детоксикации ПАУ использовали ту же выборку препаратов, что и в экспериментах по связыванию. Она включала в себя 26 препаратов гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава (8 ГК почв, 5 ФК почв, 1 ГК почв, 7 ГК торфа, 4 ГК вод, 2 ГК угля).

На основании четырех серий измерений – тест-отклик (1) в контроле, (2) в присутствии рабочей концентрации ПАУ, (3) в присутствии исследуемой концентрации гумусовых кислот и (4) в присутствии ПАУ и гумусовых кислот рассчитывали коэффициент D для каждой тестируемой концентрации. Типичные кривые детоксикации для трех модельных ПАУ на примере препарата почв приведены на рис. 7.20.

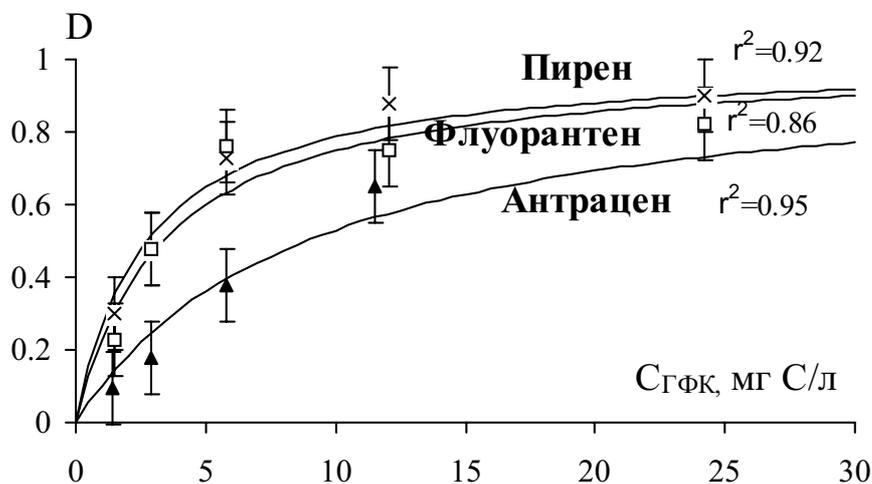


Рис. 7.20. Кривые детоксикации модельных ПАУ гумусовыми кислотами на примере ГК почв (SHA-Pw94). Точками обозначены экспериментальные данные, сплошными линиями – расчетные кривые.

Как видно из рис. 7.20, для всех трех ПАУ присутствие гумусовых кислот вызывает эффект детоксикации, который возрастает по мере увеличения концентрации гумусовых кислот. Для расчета констант детоксикации экспериментальные кривые аппроксимировали уравнением (7.56), примеры соответствующих расчетных кривых приведены на рис. 7.20. Следует отметить, что использование уравнения (7.56) позволяет аппроксимировать экспериментальные кривые с довольно высоким уровнем статистической значимости. Рассчитанные значения K_{OC}^D для Py, Flt и An и соответствующие стандартные отклонения приведены в табл. 7.11.

Таблица 7.11

Константы детоксикации ПАУ гумусовыми кислотами различного происхождения и фракционного состава ($n = 5$, $P = 0.95$)

Препарат	$K_{OC}^D \times 10^{-5}$, л/кг С			Препарат	$K_{OC}^D \times 10^{-5}$, л/кг С		
	Py	Flt	An		Py	Flt	An
ГК и ФК почв				ГФК торфа			
SHA-Pw94	4±1.4	5±1.3	6±2.4	PHF-T1H94	4±1.1	3±1.2	–
SHA-PwN	4±1.2	7±3.4	6±1.9	PHF-T4H94	3.7±0.6	5±1	1±0.5
SHA-Pp94	3.0±0.8	4±1.5	4±1.3	PHF-T5H94	2±0.8	4.4±2.5	1.2±0.2
SHA-Pg94	2.1±0.5	2.1±0.2	2±0.6	PHF-T6H94	3.6±0.6	3±0.8	2±0.6
SHA-Gw94	4±1.3	4±2.2	4±1.1	PHF-T7H94	4±2.6	6.0±0.3	–
SHA-Gp94	4.0±0.8	5±0.8	4±1.2	PHF-TH94	4±1.7	4±0.8	1.8±0.5
SHA-Cm94	6±3.1	8±4.8	6±2.4	PHF-TTL94	4±2.7	4±1	0.3±0.1
SHA-CtV94	5±1.6	6±3.5	6±2.5	ГФК природных вод			
SFA-Pw94	<0.3	<0.3	<0.3	AHF-RMC	3±1.1	2±0.5	<0.3
SFA-Pp94	<0.3	<0.3	<0.3	AHF-RMX	1.1±0.3	0.4±0.1	<0.3
SFA-Pg94	<0.3	<0.3	<0.3	AHF-RND3	1.9±0.5	2.5±0.5	<0.3
SFA-Gw94	<0.3	<0.3	<0.3	AHF-SSh1	1.9±0.7	2±0.6	<0.3
SFA-CtV94	3.0±0.8	2.2±0.6	<0.3	ГК угля			
ГФК почв				CHA-ALD	6±3.4	6±2.8	5±1.3
SHF-Co94	3.6±0.6	3.4±0.4	2±0.5	CHA-AGK	6±0.6	5±0.8	–

Как видно из приведенных данных, максимальное детоксицирующее действие гумусовых кислот наблюдается для Py и Flt. В случае An детоксицирующий эффект гумусовых кислот минимален. Различие величин K_{OC}^D модельных ПАУ, по видимому, обусловлено их различной гидрофобностью: $\lg K_{OW} = 4.45$ для An и $\lg K_{OW} \cong 5.0$ для Py и Flt. Полученные закономерности по детоксицирующей способности гумусовых кислот по отношению к различным ПАУ согласуются с данными других авторов по биоаккумуляции различных ПАУ дафниями в присутствии гумусовых кислот [Landrum et al., 1987; Kukkonen and Oikari, 1991; McCarthy and Jimenez, 1985; Haitzer et al., 1999].

Сопоставление препаратов различных классов показало, что ГК черноземов и ГК угля обладают наибольшей детоксицирующей способностью по отношению к Ру, Flt и An. Близкими к ним значениями K_{OC}^D характеризовались ГК дерново-подзолистых и серых лесных почв. Для торфяных ГФК значения K_{OC}^D ниже, в среднем, на 30-40% по сравнению с ГК почв. Относительно низкие константы наблюдаются в случае взаимодействия водных ГФК с Ру и Flt. Для An значения констант оказались ниже минимально определяемой величины K_{OC}^D (0.3×10^5 л/кг С), рассчитанной с использованием 3s критерия [Doerffel, 1990]. Константы связывания Ру, Flt и An в случае ФК почв также были ниже минимально определяемой величины. Исключение составили ФК чернозема для Ру и Flt ($(3.0 \pm 0.8) \times 10^5$ и $(2.2 \pm 0.6) \times 10^5$ л/кг С, соответственно). Полученные результаты позволяют расположить препараты гумусовых кислот по величине их детоксицирующей способности по отношению к ПАУ в следующий ряд:

ГК угля, ГК чернозема >> ГК П^Д и Л почв > ГФК торфа > ГФК вод \cong
ФК чернозема >> ФК П^Д и Л почв

Следует отметить, что аналогичный ряд был получен для связывающей способности гумусовых кислот по отношению к ПАУ.

Для сопоставления двух введенных количественных параметров детоксицирующей способности гумусовых кислот – K_{OC}^D и D – был проведен корреляционный анализ соответствующих блоков данных для исследованной выборки препаратов гумусовых кислот. Коэффициенты корреляции между D, определенным при концентрации гумусовых кислот 6 мг С/л, и K_{OC}^D составили 0.90, 0.81 и 0.84 для Ру, Flt и An, соответственно, что свидетельствует об их тесной взаимосвязи и позволяет использовать как тот, так и другой параметр для оценки детоксицирующей способности гумусовых кислот.

7.5.3 Сравнение связывающих и детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к ПАУ

Для выяснения механизма детоксикации ПАУ гумусовыми кислотами полученные величины K_{OC}^D были сопоставлены с K_{OC} , найденными из экспериментов по тушению флуоресценции. Между параметрами была установлена довольно тесная корреляция: $r = 0.77, 0.86$ и 0.85 для Ру, Flt и An, соответственно. Однако по абсолютной величине K_{OC}^D превосходили соответствующие K_{OC} в несколько раз: (2.6 ± 0.3) , (4.6 ± 0.6) и (6 ± 1.4) для Ру, Flt и An, соответственно ($P = 0.95$, $n = 26$), а сравнение полученных значений с использованием t-критерия показало значимое различие K_{OC} и K_{OC}^D ($P = 0.95$).

Установленные различия в абсолютных значениях констант K_{OC} и K_{OC}^D могут быть обусловлены (1) разными условиями проведения экспериментов по связыванию и детоксикации, что могло повлиять на величину констант, так

как обе константы являются условными; (2) невыполнением предположения о том, что токсичностью обладает только свободная форма ПАУ, либо о том, что чувствительность *D. magna* к токсическому действию свободной формы ПАУ не изменяется в присутствии гумусовых кислот.

Согласно гипотезе (2) детоксикация ПАУ обусловлена непосредственным воздействием гумусовых кислот на тест-объект, но тогда детоксицирующий эффект должен зависеть не от способности гумусовых кислот связывать ПАУ, а от их физиологической активности. Однако наличие тесной корреляционной взаимосвязи между K_{OC} и K_{OC}^D свидетельствует о том, снижение токсичности ПАУ вызвано уменьшением концентрации свободной формы ПАУ. Иными словами, детоксикация ПАУ обусловлена главным образом образованием нетоксичных аддуктов ПАУ-ГФК.

Для проверки гипотезы (1) принимали во внимание, что в случае определения K_{OC} с помощью метода тушения флуоресценции для приготовления растворов ПАУ и гумусовых кислот использовали бидистиллированную воду; тогда как токсикологические эксперименты проводили в отстоянной водопроводной воде, предварительно пропущенной через фильтр “Родничок”. Поэтому было проведено сравнение констант связывания Ап ГФК торфа, которые определяли с использованием растворов, приготовленных на бидистиллированной, дистиллированной и водопроводной воде, пропущенной через фильтр “Родничок”. Полученные результаты приведены на рис. 7.21.

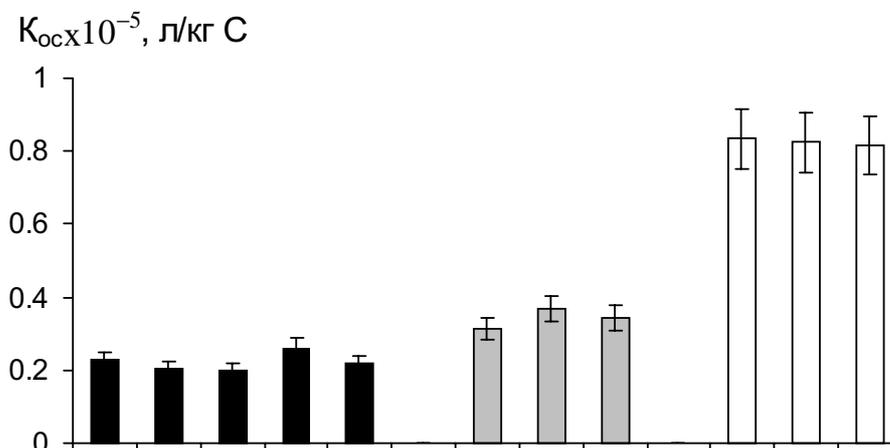


Рис. 7.21. Константы связывания Ап ГФК торфа (PHF-T6H94), определенные в различных условиях.

■ – бидистиллированная вода, ▨ – дистиллированная вода, □ – водопроводная вода, пропущенная через “Родничок”.

Как видно из рис. 7.21, значения $K_{OC} A_n$ существенно зависят от качества использованной воды. Наибольшее связывание A_n наблюдается в водопроводной воде, пропущенной через фильтр (0.8×10^5 л/кг С), наименьшее – в бидистиллированной воде (0.25×10^5 л/кг С). При этом значение $K_{OC} A_n$, найденное при использовании водопроводной воды, близко по значению к K_{OC}^D (1.3×10^5 л/кг С), полученной в условиях проведения токсикологических экспериментов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что основным процессом, определяющим детоксикацию ПАУ гумусовыми кислотами, является связывание ПАУ в нетоксичные аддукты.

7.6 Исследование детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к атразину

Для исследования детоксицирующей способности гумусовых кислот по отношению к атразину в качестве тест-объекта была выбрана одноклеточная водоросль *Chlorella vulgaris*. В связи с тем, что атразин является специфическим ингибитором фотосинтеза, в качестве тест-отклика использовали параметры кривой индукции флуоресценции, характеризующие интенсивность фотосинтеза хлорофилла в культуре водоросли. В соответствии с предложенной концепцией получения количественных характеристик детоксицирующих свойств гумусовых кислот (глава 7.3), все схемы проведения токсикологических экспериментов включали в себя наряду с контрольным вариантом (без атразина и гумусовых кислот) варианты с внесением атразина и препаратов гумусовых кислот, а также варианты с внесением гумусовых кислот.

Результаты данной части работ подробно изложены в соответствующих публикациях [Перминова и др., 1994; Perminova et al., 1996; Куликова и др., 1997; Kulikova et al., 2000; Perminova et al., 2000].

7.6.1 Выбор условий биотестирования для изучения детоксикации атразина гумусовыми кислотами

Детоксицирующие свойства гумусовых кислот оценивали на основании изменения интенсивности фотосинтеза хлорофилла в культуре водоросли в присутствии постоянной концентрации атразина и переменной – гумусовых кислот. Тест-откликами служили два параметра кривой индукции флуоресценции: F_i/F_m и F_v/F_m . Показатель F_i/F_m характеризует содержание переносчиков электронов (в долях единицы), не способных принимать электрон вследствие каких-либо нарушений. Значение показателя F_v/F_m характеризует общее количество акцепторов электронов в электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), которые могут принимать электрон, и является

характеристикой эффективности реакции фотосинтеза [Krause and Weis, 1991].

При внесении атразина – специфического ингибитора фотосинтеза – величина F_i/F_m мгновенно возрастает, так как происходит блокирование части переносчиков электрона. В тоже время изменение показателя F_v/F_m которое может быть вызвано и влиянием токсиканта общего действия, наступает только через некоторый интервал времени. Поэтому при измерении F_i/F_m применяли нулевую экспозицию, а F_v/F_m измеряли после 3 часовой экспозиции.

Учет мешающего действия гумусовых кислот. Так как гумусовые кислоты обладают собственной флуоресценцией, то необходимо было учесть ее влияние на величины показателей F_i/F_m и F_v/F_m . Для этой цели проводили серию экспериментов, в которых кривые индукции флуоресценции хлорофилла водоросли регистрировали непосредственно после добавления гумусовых кислот (нулевая экспозиция). При этом параллельно регистрировали также фоновую флуоресценцию гумусовых кислот. Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что показатель F_v/F_m хлорофилла в клетках водоросли при внесении гумусовых кислот в концентрациях 1-50 мг С/л существенно снижается, если его расчет производить непосредственно из регистрируемых кривых индукции флуоресценции, что равноценно кажущейся “токсичности” раствора гумусовых кислот.

Однако причиной наблюдаемой “токсичности” гумусовых кислот является влияние их собственной флуоресценции на регистрируемый показатель F_v/F_m . Действительно, если гумусовые кислоты обладают собственной флуоресценцией F , то отношение F_v/F_m будет рассчитываться как:

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_v}{F_m + F} \quad (7.65)$$

При наличии собственной флуоресценции гумусовых кислот (F_m+F) всегда больше F_m и значения рассчитываемого таким способом показателя F_v/F_m получаются заниженными. Поэтому для корректного расчета F_v/F_m из кривых индукции флуоресценции хлорофилла предварительно вычитали кривую фоновой флуоресценции гумусовых кислот. Для этого было создано оригинальное программное обеспечение (автор – Д.В. Ковалевский).

Во избежание эффекта внутреннего фильтра, проявляющегося при высоких концентрациях гумусовых кислот [Паркер, 1972], их рабочие концентрации не превышали 50.0 и 5.0 мг С/л для экспериментов с нулевой и 3-часовой экспозицией, соответственно.

Выбор рабочей концентрации атразина. Токсичность атразина по отношению к водоросли изучали при времени экспозиции 0 и 3 часа. В первом случае в качестве тест-функции использовали F_i/F_m , во втором – F_v/F_m . Как уже указывалось, значения показателя F_i/F_m увеличиваются при возрастании концентрации атразина. Поэтому мы сочли нецелесообразным приводить диапазон токсичности в координатах “концентрация атразина – F_i/F_m , проценты от контроля” и использовали абсолютные значения показателя F_i/F_m (рис. 7.22). Значение показателя F_i/F_m , соответствующее 50% угнетению фотосинтеза, рассчитывали как половину разности между его максимальным и минимальным значениями. ЭК₅₀ атразина составила 1.1×10^{-6} М. При этом при минимальной концентрации гумусовых кислот соотношение атразин : гумусовые кислоты (С) в расчете на массу составляло 1 : 4

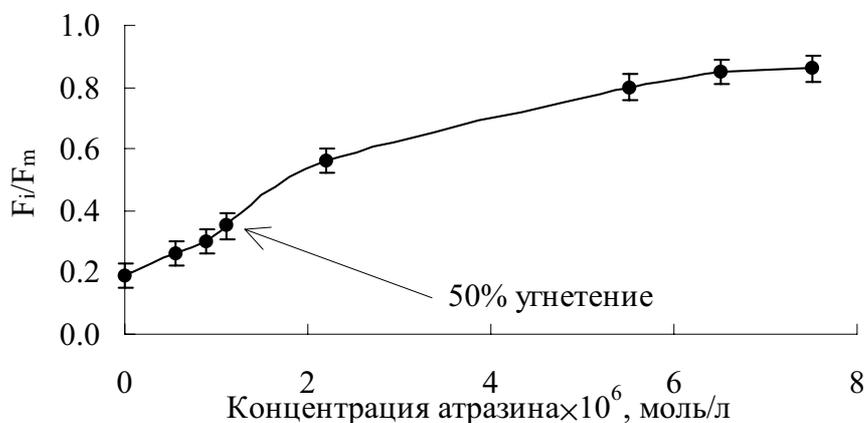


Рис. 7.22. Диапазон токсичности атразина для водоросли *Chlorella vulgaris*. Нулевая экспозиция.

В экспериментах с 3-часовой экспозицией в качестве тест-отклика использовали показатель F_v/F_m . Диапазон токсичности атразина при 3-часовой экспозиции водоросли приведен на рис. 7.23.

В предварительных экспериментах было установлено, что при использовании концентрации атразина, вызывающей 50% снижение показателя F_v/F_m (1.5×10^{-6} М), внесение гумусовых кислот вплоть до концентрации 50 мг С/л детоксицирующего действия не оказывало. При этом максимальное соотношение (масс. С) атразин : гумусовые кислоты составляло 1 : 1.8, т.е. превышало таковое для экспериментов с нулевым временем экспозиции. Увеличить концентрацию гумусовых кислот было нельзя из-за мешающего влияния на регистрацию флуоресценции хлорофилла, поэтому для установления соотношения атразин : гумусовые кислоты, равного 1 : 4, уменьшили концентрацию атразина. В качестве рабочей нами была выбрана концентрация атразина 6.7×10^{-7} М, приводящая к 25% угнетению фотосинтеза *Chlorella vulgaris*.

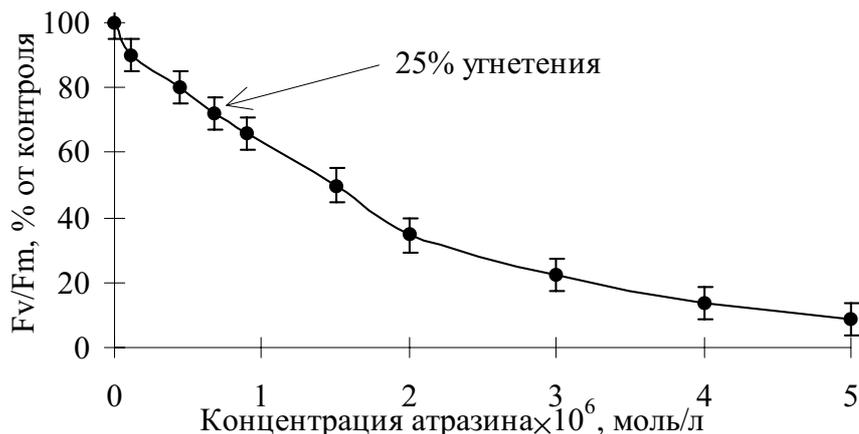


Рис. 7.23. Диапазон токсичности атразина для водоросли *Chlorella vulgaris*. Время экспозиции 3 часа.

7.6.2 Определение констант детоксикации атразина гумусовыми кислотами

Для исследования детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к атразину проводили серию экспериментов с 3-х часовым временем экспозиции с внесением возрастающих количеств гумусовых кислот (0,6–5,0 мг С/л) при постоянной концентрации атразина ($1,5 \times 10^{-6}$ М), выбранной на основании установленного диапазона токсичности.

Для проведения экспериментов по детоксикации атразина использовали выборку тех же препаратов гумусовых кислот, что и для связывания (8 ГК, 3 ФК и 1 ГФК почв; 1 ГФК, 1 ГК и 1 РОВ торфа, 1 ГК угля), вводя в нее еще три препарата – ГФК почвенного раствора. Их выделению уделялось особое внимание в работе (Глава 2). Предполагалось, что эти препараты, представляющие собой самую низкомолекулярную фракцию почвенных гумусовых кислот, могут обладать высокой физиологической активностью.

Проведенные эксперименты показали, что гумусовые кислоты снижали токсичность атразина во всем исследованном диапазоне концентраций. На основании полученных данных (зависимости показателя F_v/F_m от концентрации гумусовых кислот) согласно (7.56) для каждой использованной концентрации гумусовых кислот были рассчитаны значения коэффициента D . Типичные кривые детоксикации приведены на рис. 7.24.

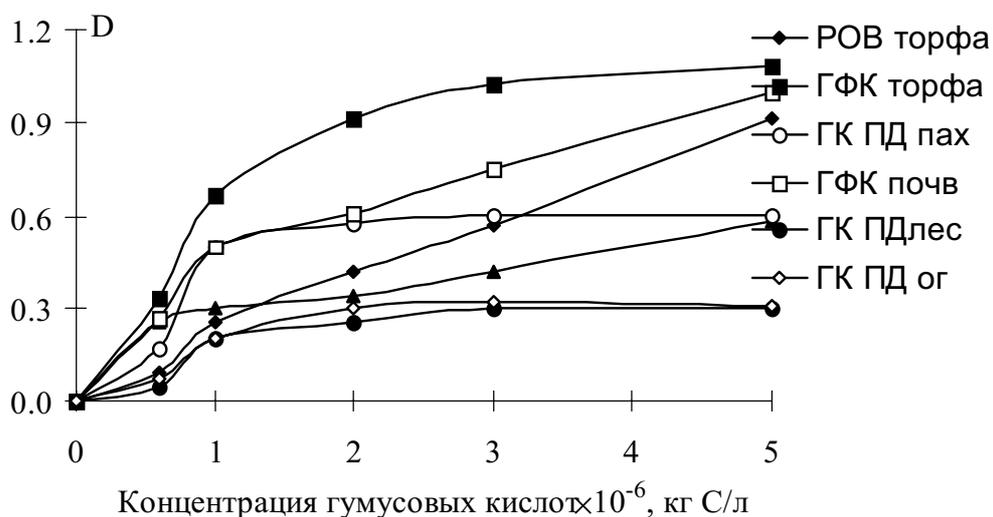


Рис. 7.24. Кривые детоксикации атразина различными гумусовыми кислотами.

На основании полученных зависимостей коэффициента D от концентрации гумусовых кислот были рассчитаны константы детоксикации K_{OC}^D атразина гумусовыми кислотами (табл. 7.12).

Таблица 7.12

Константы детоксикации атразина гумусовыми кислотами различного происхождения и фракционного состава ($n = 9$, $P = 0.95$)

Препарат	K_{OC}^D , л/кг С	Препарат	K_{OC}^D , л/кг С
ГФК торфа		ГК почв	
PHF-T494	$(8.9 \pm 1.4) \times 10^5$	SHA-Pw94	$(1.2 \pm 0.3) \times 10^5$
PHF-TH94	$(5.7 \pm 0.9) \times 10^5$	SHA-Pw96	$(5.6 \pm 0.7) \times 10^5$
PHF-TT94	$(1.3 \pm 0.2) \times 10^6$	SHA-Pp94	$(1.4 \pm 0.4) \times 10^5$
РОВ торфа		SHA-Pp96	$(5.5 \pm 0.7) \times 10^5$
PDOM-TH	$(5.8 \pm 0.8) \times 10^5$	SHA-Pg94	$(1.0 \pm 0.2) \times 10^4$
PDOM-TT	$(4.5 \pm 0.7) \times 10^5$	SHA-Gw94	$(2.0 \pm 0.3) \times 10^5$
ФК почв		SHA-Gw96	$(1.4 \pm 0.2) \times 10^5$
SFA-Pw96	$(5.0 \pm 0.7) \times 10^4$	SHA-Cm94	$(2.9 \pm 0.4) \times 10^5$
SFA-Pp96	$(5.0 \pm 0.8) \times 10^4$	SHA-CtV94	$(3.7 \pm 0.6) \times 10^5$
SFA-Pg94	$(1.4 \pm 0.2) \times 10^5$	ГФК почвенного раствора	
SFA-Pg96	$(6.0 \pm 0.8) \times 10^4$	SDHF-Pw96	$(2.1 \pm 0.3) \times 10^6$
SFA-Gw94	$(5.3 \pm 0.8) \times 10^5$	SDHF-Pp96	$(1.8 \pm 0.2) \times 10^6$
ГФК почв		SDHF-Pg96	$(1.9 \pm 0.2) \times 10^6$
SHF-Co94	$(7.1 \pm 1.1) \times 10^5$	ГФК природных вод	
ГК углей		АНF-RMX2	$(2.9 \pm 0.5) \times 10^5$
CHA-AGK	$(7.4 \pm 1.1) \times 10^5$		

Как видно из табл. 7.12, ГФК водных вытяжек почв обладали наибольшей детоксицирующей способностью по отношению к атразину. Близкими к ним значениями K_{OC}^D характеризовались ГК угля, чернозема и некоторых П^D почв. ОВ водного экстракта торфов и препараты ФК почв практически не снижали токсичность атразина.

7.6.3 Сравнение связывающих и детоксицирующих свойств гумусовых кислот по отношению к атразину

Сравнение полученных K_{OC}^D атразина с K_{OC} , определенными с использованием физико-химических методов (табл. 7.12 и 7.7, соответственно), показало, что K_{OC}^D в среднем на два-три порядка превышали K_{OC} , при этом коэффициент корреляции между ними составлял 0.12. При этом анализ блоков данных по свойствам гумусовых кислот и константами связывания и детоксикации атразина выявил наличие тесной взаимосвязи K_{OC}^D с содержанием низкомолекулярной фракции (<5 КДа – предел проницаемости клеточных мембран [Del Agnola et al., 1986]; коэффициент корреляции составил 0.93. В то время для K_{OC} наиболее тесная корреляция наблюдалась с содержанием ароматических фрагментов (C_{Ar}) в гумусовых кислотах.

Следовательно, сравнение величин K_{OC} и K_{OC}^D указывает на то, что связывание атразина гумусовыми кислотами не может служить основным фактором, определяющим величину детоксикации. По-видимому, в условиях внесения атразина преобладающим фактором является стимулирующее действие гумусовых кислот, проявляющееся только при неблагоприятных условиях среды, которое обсуждалось выше (раздел 1.6.3). Данная гипотеза подтверждается и результатами экспериментов по влиянию гумусовых кислот на состояние фотосинтетического аппарата водорослей в условиях воздействия других негативных факторов среды – пониженной температуры.

Так, в ходе проведения токсикологических экспериментов было установлено, что при оптимальной температуре культивирования водоросли (35°C) гумусовые кислоты не обладали физиологической активностью по отношению к хлорелле. В то же время выраженное стимулирующее действие гумусовых кислот отмечалось при проведении экспериментов с 3-часовой экспозицией в неблагоприятных условиях культивирования хлореллы. Так, заметное увеличение показателя F_v/F_m наблюдалось при внесении гумусовых кислот у хлореллы, выращиваемой при пониженной температуре (25°C вместо 35°C). Результаты для двух препаратов приведены на рис. 7.25. Аналогичные данные были получены и для ряда других исследованных препаратов (SHA-Pw96, SHA-Pp96, SHA-Pg96, SHA-CtV94, SHA-Gw94).

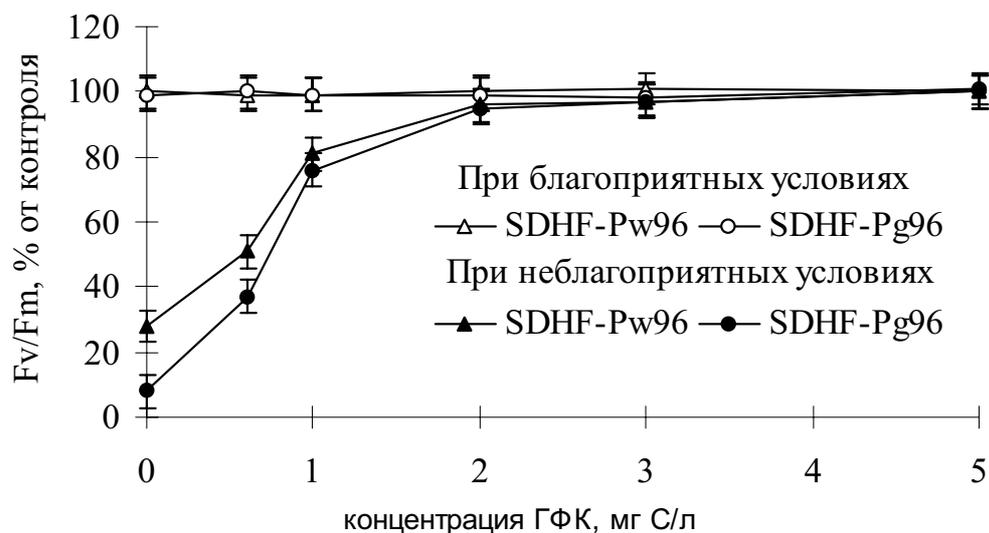


Рис. 7.25. Воздействие гумусовых кислот на фотосинтетическую активность *Chlorella vulgaris* при пониженной (25°C) и нормальной (35°C) температурах культивирования. Время экспозиции – 3 часа.

Подобные эффекты могут служить подтверждением известного тезиса о способности гумусовых кислот повышать общую неспецифическую сопротивляемость организмов, сформулированного Христовой с сотрудниками на основе многочисленных опытов с растениями [Христева и др., 1968]. Возможным механизмом, объясняющим стимулирующее воздействие гумусовых кислот при неблагоприятных условиях среды, является увеличение проницаемости клеточных мембран как реакция на действие стрессора – в наших экспериментах, при внесении атразина или снижении температуры. Наличие тесной корреляции между K_{oc}^D и содержанием в гумусовых кислотах низкомолекулярной фракции (<5 КДа) свидетельствует в пользу данного предположения.

Для установления конкретного механизма детоксикации атразина гумусовыми кислотами (например, определение специфических сайтов действия гумусовых кислот) необходимо проведение дополнительных экспериментов, включающих детальное исследование физиологической активности гумусовых кислот, а также возможность их поступления в тест-организмы.

Таким образом, в результате выполненного комплекса экспериментов систематически исследованы связывающие и детоксицирующие свойства гумусовых кислот по отношению к Hg(II), ПАУ и атразину для представительных выборок гумусовых кислот различного происхождения и фракционного состава. На основании применения концепции

комплексообразования/связывания для описания процессов детоксикации тяжелых металлов и органических экотоксикантов гумусовыми кислотами предложен способ количественной оценки детоксицирующих свойств гумусовых кислот с помощью констант детоксикации. Единый методологический подход для оценки связывающих и детоксицирующих свойств гумусовых кислот использован впервые. На основании сравнения констант связывания и детоксикации сделан вывод о комплексообразовании (связывании) как основном механизме детоксикации Hg(II) и ПАУ гумусовыми кислотами и о принципиально иной природе их детоксицирующего действия по отношению к атразину. Сформирован обширный массив признаков свойств – констант связывания, устойчивости комплексов и детоксикации, что позволило перейти к завершающему этапу работы – получению прогностических моделей “строение-свойство”.