

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ В СИСТЕМЕ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ПРИРОДНЫХ ВОД

Д. Ю. Верниченко-Цветков

Украинский научно-исследовательский институт экологических проблем
г. Харьков, ул. Бакулина, 6

E-mail: Ukrniiep@Kharkov.com

В докладе рассматривается проблема совершенствования программы режимного мониторинга природных вод Украины. Обосновывается необходимость и целесообразность включения в состав контролируемых параметров ряда биохимических показателей. Приводятся результаты эколого-биохимических исследований на ряде водных объектов Украины.

В последнее время в мире все больше внимания уделяется применению биохимических методов анализа в экологических исследованиях. Необходимость внедрения в системы эколого-аналитического контроля на водных объектах биохимических показателей обуславливается тем, что традиционный контроль содержания отдельных индивидуальных веществ становится все более сложной и дорогостоящей задачей. По данным международных регистров, в мире зафиксировано около 16 миллионов химических веществ. Общее число соединений, способных загрязнять окружающую природную среду, составляет около 40-60 тысяч [1]. Анализ такого количества ингредиентов на современном этапе развития аналитических технологий малореален. Как правило, качество воды оценивается по 30-50 показателям (а иногда и меньше), без учета компонентного состава загрязняющих примесей, что не позволяет получить достаточно адекватную оценку экологического состояния водных объектов. В связи с этим, возникла необходимость в показателях, способных интегрально характеризовать общую экологическую ситуацию на водном объекте или общую степень загрязненности природных вод. Надо заметить, что эти характеристики не вполне тождественны. К примеру, одинаковая степень загрязненности токсическими веществами при разной температуре воды приводит к совершенно разному воздействию на экосистемы. Для характеристики общей загрязненности водной среды приемлемы не только биологические, но и чисто химические методы; например метод "отпечатков пальцев", заключающийся в снятии масс-хроматографических спектров природных вод и опознании по этим спектрам источников загрязнения; или методы, основанные на определении комплексообразующей способности вод, антиокислительной активности и некоторых других подобных параметров (хотя отделить

биотическую компоненту от биотической в таких методах не всегда легко). Характеристика же экологического состояния водного объекта, как экосистемы (которое относительно степени загрязненности является функцией отклика), возможна только на основе гидробиологических или биохимических методов, как непосредственно связанных с биотической составляющей экосистем. Такие методы позволяют оценивать совокупное влияние на водные экосистемы всех антропогенных воздействий.

Традиционно, гидробиологические наблюдения на водных объектах проводятся с использованием в основном структурных биологических показателей. Между тем, функциональные показатели, прежде всего биохимические, имеют, по сравнению со структурными, ряд существенных преимуществ. Во-первых, изменения в экосистемах под воздействием антропогенных факторов на функциональном уровне наступают значительно раньше и при меньших интенсивностях воздействия, чем на структурном. Поэтому использование функциональных показателей позволяет обнаружить антропогенные нарушения в экосистемах на более ранних стадиях. Во-вторых, с точки зрения изучения проходящих в экосистемах процессов, показатели функциональной активности, скажем, таких компонентов биоты, как фитопланктон или бактерии донных отложений значительно информативнее показателей состава их популяций. Получаемые с помощью биохимических методов сведения во многих случаях оказываются уникальными, поскольку не могут быть продублированы с помощью данных каких либо других анализов. Кроме того, используемые в биохимических методиках аналитические технологии, как правило, точнее чисто биологических.

Следует отметить и еще один аспект. Традиционно, химико-аналитический, а позже, в значительной мере и гидробиологический контроль на водных объектах ограничивался только параметрами, связанными с состоянием водной среды. Для так называемого "мониторинга загрязнений" это было приемлемо, однако развивающаяся в настоящее время концепция экологического мониторинга требует контроля всех компонентов водных экосистем. Однако, если для водной среды нормы на содержание загрязняющих веществ установлены, для донных отложений они только начинают разрабатываться. Поэтому биохимические методы в этой области имеют особенно значительные перспективы.

Кроме того, и для определения индивидуальных загрязняющих веществ биохимические методы также могут использоваться. Так, в последнее время интенсивно развиваются методы контроля микроколичеств некоторых веществ с помощью биодатчиков и биосенсоров. Раньше для таких определений часто использовались

методы кинетического анализа (основанного на определении параметров протекания катализитических реакций с участием определяемого вещества, чаще всего в качестве катализатора или ингибитора). Биологические катализаторы (ферменты) также применялись в этих методиках. Развитием этого направления кинетического анализа стала разработка (к примеру, на основе иммобилизованных на электродах ферментов) специальных датчиков, позволивших значительно упростить и автоматизировать определения. Кроме ферментов в таких датчиках могут использоваться отдельные клетки, культуры тканей и т.д. Однако, поскольку конечной целью определения является установление концентрации определенного вещества, такие показатели нельзя в полной мере считать биохимическими.

Первым и до недавнего времени единственным широко применявшимся биохимическим показателем в системе эколого-аналитического контроля природных вод был показатель БПК, предложенный еще в 1912 году в Англии. В настоящее время метод БПК широко используется, однако его данные трактуются только с точки зрения оценки степени загрязненности природных вод легкоокисляемыми органическими веществами, что далеко не исчерпывает его возможностей. Среди наиболее важных и сравнительно сложноконтролируемых химическими методами процессов, проходящих в водных объектах, подверженных антропогенному воздействию, можно назвать процессы биотрансформации загрязняющих веществ. Мерой интенсивности этих процессов может быть соотношение БПК/ХПК. Более специфичным является метод определения потенциальной самоочищающей способности природных вод по трансформации тестового вещества в пробах воды, инкубирующихся при стандартных условиях. В качестве тестового вещества чаще всего применяют глюкозу, пептон или фенол. Определение потенциальной самоочищающей способности воды может осуществляться тремя способами: по перераспределению ^{14}C меченых тестовых веществ (пример такой методики – определение относительного гетеротрофного потенциала); по убыли в пробе тестового вещества, определяемой при помощи специальной химической методики; или по изменению биохимического потребления кислорода при внесении тестового вещества. Последние два варианта объединяются под общим названием "метод специфических добавок". Каждый из этих методов имеет свои, отличные от остальных, преимущества, недостатки и границы применимости. Так, использование метода меченых атомов дает очень высокую точность и достоверность результатов, этот метод наиболее

универсален и легко перенастраивается для разных тестовых веществ, но он предъявляет очень высокие требования по оснащению и безопасности проведения анализа и потому его внедрение на широкой сети лабораторий проблематично. Метод специфических добавок в версии определения убыли в ходе инкубации тестового вещества удобнее применять для изучения биотрансформации конкретных групп веществ-ксенобиотиков, так как он меньше подвержен различным мешающим влияниям, чем метод БПК. Метод специфических добавок в версии определения БПК (метод Кнеппа) несколько корректируется с точки зрения изучения процессов биотрансформации в целом, поскольку отслеживает все стадии проходящих реакций биохимического окисления, а не только первую стадию, в которой еще участвует тестовое вещество. Поэтому метод Кнеппа наиболее приемлем для определения самоочищающей способности природных вод, особенно на широких сетях наблюдения, поскольку показатель БПК стандартизован и широко применяется. Оценка по методу Кнеппа была включена в перечень показателей разработанного и утвержденного на Украине нормативного документа "методика экологической оценки качества поверхностных вод..." [2].

С возникновением необходимости изучения явлений антропогенного эвтрофирования водных объектов начали развиваться и внедряться методы контроля фотосинтетических пигментов фитопланктона. В настоящее время в ряде стран существуют утвержденные методики определения и нормы содержания этих веществ, разработаны автоматические датчики и способы дистанционного (аэрокосмического) наблюдения. Однако в большинстве случаев пигментные измерения ограничиваются лишь косвенным определением биомассы водорослей по содержанию хлорофилла, в то время, как возможности этого метода, также, как и метода БПК, гораздо шире. По составу растительных пигментов можно определять соотношение основных групп водорослей в популяциях фитопланктона (что может быть важно для прогнозирования токсичности вод), или физиологическое состояние планктонных водорослей (что существенно, к примеру, для прогнозирования их массового развития). В почвоведении существуют методики измерения содержания фотосинтетических пигментов почвенных водорослей, вполне применимые и для анализа содержания пигментов водорослей в донных отложениях. С помощью этого показателя можно было бы контролировать на сравнительно неглубоких водных объектах процессы оседания планктонных водорослей в период окончания цветения или, наоборот, начальные стадии роста их популяций, по некоторым данным проходящие в придонных слоях воды.

В настоящее время во многих странах в практику аналитического контроля

внедряются биохимические методы обнаружения токсинов синезеленых водорослей. Надо сказать, что ВООЗ, после ряда случаев массовых заболеваний населения, вызванных альготоксинами, рекомендовала проводить контроль содержания этих веществ в рамках национальных программ наблюдений за качеством природных вод. Химическое определение этих токсинов очень сложно из-за их малых концентраций и не вполне надежно из-за того, что далеко не все токсины в настоящее время идентифицированы. Среди биохимических методов определения токсинов водорослей следует отметить иммуноферментный анализ, основанный на определении реакции на исследуемую пробу специфической сыворотки, получаемой от подвергавшихся воздействию альготоксинов животных; метод определения ингибирования токсинами водорослей таких ферментов, как ацетилхолинэстеразы, щелочной фосфатазы или трипсина; а также метод, основанный на определении активности тиаминазы и содержания тиамина у рыб из исследуемых водных объектов. В настоящее время эта область эколого-аналитического контроля интенсивно развивается, идет поиск наиболее надежных и достоверных методов анализа.

В экологических исследованиях широко используются биохимические методы, заимствованные из смежных с экологией областей знания. Так, одним из направлений совершенствования способов биотестирования стало определение физиологического состояния тестовых организмов с помощью широко применяемых в медицине биохимических методов.

Распространенные в почвоведении методы анализа ферментативной активности почв применяются для исследования процессов биотрансформации органического вещества донных отложений.

Долгое время считалось, что все попадающие во внешнюю среду ферменты быстро разрушаются, однако, позже было установлено, что многие из них и в этих условиях достаточно долго сохраняют свою активность. В почвах и в донных грунтах они могут связываться с глинистыми минералами, гумусовыми веществами, целлюлозой и другими полисахаридами, что еще больше повышает их стабильность и активность. Обнаружены ферменты, специально приспособленные к функционированию в таких условиях. Наиболее существенными из продуцентов таких внеклеточных ферментов для донных отложений можно считать, в первую очередь, микроорганизмы и высшие водные растения. Активность ферментов, присутствующих в донных отложениях, является одним из основных факторов, определяющих интенсивность и направленность проходящих в этой среде

биохимических процессов, а значит и процессов самоочищения в водном объекте в целом, поскольку донные отложения вносят в эти процессы весьма существенный вклад. Поэтому определение данного показателя является важным для оценки экологической ситуации на водных объектах и для прогнозирования ее изменений.

При энзимологических исследованиях существенным вопросом является определение набора ферментов, активность которых будет наиболее показательной для описания изучаемых биохимических процессов.

По типу катализируемых реакций ферменты можно разделить на шесть основных классов:

1. оксидоредуктазы, катализирующие окислительно-восстановительные реакции;
2. гидролазы, катализирующие реакции гидролитического расщепления внутримолекулярных связей;
3. трансферазы, катализирующие реакции переноса химических групп;
4. лигазы (синтетазы), катализирующие реакции соединения молекул;
5. лиазы, катализирующие реакции негидролитического отщепления или присоединения разных химических групп по двойным связям;
6. изомеразы, катализирующие изомерные превращения органических соединений.

Экологическая роль различных групп ферментов различна. И, хотя на настоящий момент доказано присутствие во внеклеточной среде ферментов всех основных групп, для целей эколого-аналитического контроля целесообразно определение активности ферментов, которые, во-первых, были бы достаточно распространеными, а во-вторых отличались бы достаточно широким спектром катализируемых реакций и играли бы существенную роль в процессах биотрансформации основных классов органических веществ, как естественного происхождения, так и ксенобиотиков.

С этой точки зрения наибольший интерес представляют ферменты таких групп, как оксидоредуктазы и гидролазы. Однако, как и в случае двух вариантов метода специфических добавок (метода БПК и метода определения отдельных тестовых веществ), описание процессов биотрансформации через активность гидролаз удобнее для рассмотрения превращений отдельных групп веществ, а через активность оксидоредуктаз – для анализа общего хода процессов окислительной биотрансформации.

В настоящее время разработан ряд методических рекомендаций по определению активности некоторых ферментов в водной среде, сестоне, донных отложениях и тканях гидробионтов, как показателя благополучия водных экосистем. Однако, пока что такие методики существуют лишь для очень небольшого количества ферментов или рассчитаны на определенные условия отбора

и обработки проб, возможные только при морских исследованиях и потому адаптированные почвенно-энзимологические методики в большинстве случаев оказываются наиболее приемлемыми для анализа донных отложений пресных водоемов и водотоков.

Среди всего разнообразия биохимических показателей трудно выделить наиболее универсальный или наиболее пригодный для широкого использования. Каждый метод характеризует какую-то свою группу имеющих место в водных экосистемах явлений - эвтрофирования, биотрансформации органического вещества, накопления токсинов и т.д., локализующихся в отдельных компонентах этих экосистем: воде, сестоне, донных отложениях и др.

В качестве примера применения биохимических показателей для оценки экологического благополучия водных экосистем можно привести исследования, выполнявшиеся в течение 1998-2000 годов на реке Северский Донец в границах Харьковской области. Оценивалась интенсивность процессов биотрансформации органического вещества в водной среде и донных отложениях. Отбор проб проводился на пунктах государственного контроля Госкомгидромета. Для определения были выбраны следующие показатели: потенциальная самоочищающая способность природных вод, а также пероксидазная активность и потенциальная дегидрогеназная активность донных отложений.

Принципы анализа, положенные в основу методик определения этих показателей достаточно близки: измеряется степень биохимической трансформации в стандартных условиях специального тестового вещества (глюкозы в методе Кнеппа или субстрата ферментативной реакции в энзимологических определениях). Также, достаточно сходен и характер изменений величин показателей в зависимости от величины антропогенной нагрузки на водный объект. Загрязнение вод и донных отложений легкоокисляющимся органическим веществом в умеренных концентрациях приводит к повышению интенсивности процессов биотрансформации относительно естественного уровня, однако дальнейшее увеличение концентрации вызывает обратный эффект. Загрязнение же токсическими веществами в любой концентрации снижает интенсивность процессов биотрансформации.

Однако, несмотря на сходный характер

изменения показателей, чувствительность различных биохимических процессов к одним и тем же уровням загрязнения различна, динамика процессов самоочищения в воде и донных отложениях может также существенно отличаться и поэтому данные показатели следует считать скорее взаимно дополняющими друг друга, нежели дублирующими.

Потенциальная самоочищающая способность воды определялась по методу Кнеппа [3, 4]. В склянки для определения БПК помещались пробы воды с добавлением 1,5 мл 4% раствора глюкозы, после чего определялся показатель БПК₁ по стандартной методике (БПК_{1_{гл}}). Параллельно определялся показатель БПК₁ в пробах без добавки глюкозы.

Значения потенциальной самоочищающей способности воды в абсолютных величинах (мг О₂/дм³) вычислялись, как

$$Z = \text{БПК}_{1\text{гл}} - \text{БПК}_1.$$

Относительные величины определялись по формуле

$$Z\% = 100\% \cdot (\text{БПК}_{1\text{гл}} - \text{БПК}_1) / \text{БПК}_1.$$

Пероксидазная активность донных отложений определялась по модифицированной автором методике Карягиной и Михайловой [5]. Пробы донных отложений (1-2 г) экспонировались при 30°C 30 минут с 10 мл 1% гидрохинона и 1 мл 0,05% перекиси водорода, после чего экстрагировались 10 мл ацетона и после фильтрации колориметрировались на длине волны 400 нм. Параллельно ставилась контрольная проба без реагентов для учета окраски экстрактов. Активность ферmenta измерялась в мг образовавшегося бензохинона на 1 г пробы в час.

Дегидрогеназная активность донных отложений определялась по модифицированной автором методике Козлова и Михайловой [5]. 1-2 г пробы экспонировали 24 ч при 30°C в полностью заполненной пробирке с притертой пробкой, с 50 мг CaCO₃, 5 мл 2,5% раствора трифенилтетразолийхлорида и 1 мл - 0,05% глюкозы, после чего экстрагировали 20 мл ацетона, фильтровали и колориметрировали на 540 нм относительно проб, прогретых 2 ч при 180°C. Активность ферmenta измерялась в мг образовавшегося трифенилформазана на 1 г пробы в час.

Параллельно с биохимическими определениями была проведена экологическая оценка качества вод Северского Донца по гидрохимическим данным Госкомгидромета в тех же пунктах. Рассчет экологического индекса качества вод осуществлялся согласно методике экологической оценки [2].

Результаты выполненных определений приводятся в таблице 1.

Таблица 1

Оценка экологического состояния реки Северский Донец в пределах Харьковской области по ряду гидрохимических и биохимических параметров. Осень 1998 г - весна 1999г.

Точка отбора пробы	Ферментативная активность донных отложений				Самоочищающая способность водной среды				Экологический индекс по значениям параметров:			
	Пероксидазная *	Дегидрогеназная *			Абсолютные значения, мгO ₂ /л	Относительные значения, %		средним		наихудшим		
			1998	1999		1998	1999	1998	1999	1998	1999	
1.Выше г.Чугуев	13,34	2,25	0,029	0,034	0,29	0,19	80,5	40,4	2,6	3,5	4,3	5,7
2.Ниже г.Чугуев	14,64	5,25	0,534	0,130	0,95	1,86	327,6	229,6	3,2	3,6	5,3	5,7
3.Выше г.Змиев	12,67	3,73	0,291	0,017	0,71	0,35	87,7	97,2	2,5	3,4	4,0	5,3
4.Ниже г.Змиев	25,11	3,97	0,193	0,002	3,07	2,26	1461,9	327,5	2,7	3,5	4,7	5,7
5.Выше г.Изюм	12,72	6,80	0,086	0,010	1,14	1,49	380,0	402,7	2,8	3,7	5,0	5,7
6.Ниже г.Изюм	18,30	4,81	0,029	0,025	2,83	0,36	943,3	85,7	3,2	3,8	5,7	6,0

* Пероксидазная активность выражается в мг бензохинона на 1 г пробы в час

** Дегидрогеназная активность выражается в мг трифенилформазана на 1 г пробы в час.

Установлено, что как пероксидазная активность донных отложений, так и потенциальная самоочищающая способность воды имеет тенденцию к повышению в пунктах после городов, что связано, очевидно, с поступлением в водоток легкоразлагающихся органических соединений.

Следует отметить, что весной как потенциальная самоочищающая способность воды, так и пероксидазная активность донных отложений в пункте после Изюма была, наоборот, ниже, чем до него. Повидимому, это объясняется присутствием в воде токсических веществ. Не случайно, что в этот же период экологический индекс качества воды в этом же пункте был самым высоким.

Дегидрогеназная активность донных отложений максимальных значений достигала после г. Чугуев, а затем резко снижалась. После г. Змиев она была ниже, чем до города, как весной, так и осенью, а после г. Изюм осенью она была ниже а весной, напротив, несколько выше, чем до города.

Весной дегидрогеназная активность была ниже, чем осенью во всех контрольных створах. Высокая пероксидазная и дегидрогеназная активность донных отложений в осенний период связана с большей интенсивностью процессов биотрансформации органических веществ в это время. Это достаточно типично для

сезонной динамики многих показателей, связанных с биотрансформационными процессами.

В донных отложениях проходят процессы, связанные не только с деструкцией органического вещества, но и с его накоплением, особенно на небольших глубинах, в основном характерных для пресных водоемов.

В качестве примера определения пигментных характеристик донных и осевших планктонных водорослей можно привести их анализ в образцах донных отложений, отобранных в Днепровском водохранилище во время украинско-канадской экспедиции в 1996 году.

Определение проводилось по модифицированной автором методике Штойбина [6], разработанной для почв. Расчет содержания хлорофиллов - по методу tricolor [7], а каротиноидов - по уравнению Парсонса-Стрикланда [8]. Экстракция пигментов из донных отложений (10 г) проводилась 10 мл 90%-водного ацетона. Определялась оптическая плотность фильтратов на длинах волн 490, 630, 645, 665 и 750 нм. Контрольное определение - остаточная оптическая плотность после промывки эфиром разбавленных на 50% водой экстрактов. Рассчитывался индекс Маргалефа – соотношение концентраций хлорофилл "а" / каротиноиды. Данные измерений приведены в таблице 2.

Таблица 2.

Пигментные характеристики водорослей в донных отложениях
Днепровского водохранилища, сентябрь 1996 г.

Точка отбора пробы	Хлорофиллы, мкг/г			Каротиноиды, мкSPU/г	Индекс Маргалефа
	а	б	с		
Начало озерной части водохранилища	14,69	4,12	1,02	6,82	2,15
Залив Вольнянский	2,15	0,54	0,01	0,98	2,19
Залив Гадючий	1,43	0,42	0,01	0,72	1,99
Центр озерной части водохранилища	1,35	0,48	<0,01	0,66	2,05
Выше г. Запорожье, у левого берега	9,88	3,14	0,43	4,88	2,02
О. Ленина	1,41	0,47	0,06	0,73	1,93

Содержание хлорофилла "а" и каротиноидов существенно варьировало (на порядок) по различным участкам водохранилища. При этом обращает на себя внимание достаточно постоянное соотношение величин содержания различных пигментов, характерное для интенсивно растущих популяций водорослей. Надо отметить, что в этот момент в Днепровском водохранилище наблюдалось интенсивное развитие и планктонных водорослей.

Учитывая, что для большинства биохимических параметров нормативные значения в настоящий момент не установлены, особое значение приобретает выбор фоновых участков водных экосистем, которые могут служить эталоном для этих показателей.

На основании анализа международного опыта, а также исследований, выполненных в Украине, представляется целесообразным включать в программы наблюдений на водных объектах биохимические показатели, которые характеризуют различные типы проходящих в экосистемах процессов. Особого внимания заслуживает применение экспрессных биохимических методов анализа, а также методов, для которых возможна разработка автоматических датчиков и дистанционных способов определения, что могло бы значительно повысить эффективность контроля в условиях аварийных ситуаций.

Литература:

- Малышева А.Г., Растворников Е.Г., Беззубов А.А., Дорогова М.Д., Совершенствование аналитического контроля водных объектов окружающей среды. // Гигиена и санитария, 2000 г., №2.- С. 69-72.
- Романенко В.Д., Жукінський В.М., Оксюк О.П. та ін., Методика екологічної оцінки якості повітряних вод

за відповідними категоріями К., Символ-Т, 1998.- 28 с.

- Метод определения влияния токсичности на скорость ассимиляции и диссимиляции (A-Z - тест по Кнеппу). // Унифицированные методы исследования качества вод. Часть III. Методы биологического анализа вод. М., Секретариат СЭВ, 1983.- С. 168-180.
- Гак Д.З.. Принципы определения потенциальной самоочищительной способности природных вод методом специфических добавок. // Научные основы контроля качества поверхностных вод по гидробиологическим показателям. Тр.сов.-англ.семинара., Л., Гидрометеоиздат, 1977.- С. 209-214.
- Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. М.: Наука, 1990.- 189с.
- Хазиев Ф.Х. Кабиров Р.Р., Количественные методы почвенно-альгологических исследований. Уфа, 1986.- 172 с. (Препр./ Институт биологии БФАН СССР)
- Л.Р.Измельцева, Динамика хлорофилла "а" и вспомогательных пигментов. // Мониторинг фитопланктона Новосибирск: Наука, 1992.- С. 81-91.
- Бульон В.В. Первичная продукция планктона внутренних водоемов. Л.: Наука, 1983.