

УДК 547. 912: 594. .

ПРОСТОЙ СПОСОБ ПОДГОТОВКИ ПРОБ ДЛЯ АНАЛИЗА СОДЕРЖАНИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В СИСТЕМЕ «ВЗВЕСЬ – МИДИИ – БИООТЛОЖЕНИЯ» МЕТОДОМ АТОМНОЙ АБСОРБЦИИ

Поспелова Н.В., Копытов Ю.П., Нехорошев М.В.

Анализ содержания тяжелых металлов в организме и окружающей среде представляет большой интерес, так как с одной стороны эти вещества выступают как загрязнители, с другой стороны – как неотъемлемая часть организма и окружающей их среды.

Исследование содержания микроэлементов в гидробионтах – объектах марикультуры – связано с решением многих вопросов, один из которых – выявление общих биологических закономерностей поведения и миграции различных химических элементов в морских экосистемах и понимание биологической роли и функций следовых количеств металлов в физиолого-биохимических процессах. Двустворчатые моллюски-фильтраторы могут эффективно перемещать взвесь из воды в донные отложения, чем влияют на геохимические свойства осадков, геохимический цикл металлов в прибрежных водах в результате фильтрационной деятельности моллюсков [1].

Важным этапом биохимических исследований в этой области является разработка новых и совершенствование существующих методов определения микроэлементов в морской воде, взвешенном материале, донных осадках и гидробионтах, так как содержание многих микроэлементов в природных объектах довольно низкое. Химические методы анализа, положенные в основу таких экологических исследований, должны отвечать следующим требованиям: высокая чувствительность, хорошая воспроизводимость, а также возможность определения нескольких элементов в одной пробе.

Целью данной работы является разработка метода подготовки проб для определения тяжелых металлов (кадмия, цинка, свинца и меди) в системе «взвешенное вещество – мягкие ткани мидии – фекалии мидий». Этот подход позволяет выявить экологическую значимость мидийных хозяйств, оценить соответствие моллюсков, выращенных в марихозействе, санитарно-гигиеническим нормам, а также определить степень мелиорации среды (в отношении тяжелых металлов) в районе расположения марихозейства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования содержания металлов в системе «взвесь – моллюски – биоотложения» был использован метод атомно-абсорбционной спектроскопии с электротермической атомизацией (ААС ЭТА) на спектрофотометре С-115 М1 в комплексе Графитом –5. Метод ААС ЭТА выгодно отличается от ААС с пламенной атомизацией своей очень высокой (на 1-2 порядка выше) чувствительностью [2], отсутствием необходимости работы с взрывоопасными газами, высокой степенью автоматизации (управление с ПК и компьютерная обработка данных, наличие автосамплера на 42 пробы). Для компенсации химических (матричных) помех в данном случае использовалась дейтериевая лампа. Для анализа использовали графики атомизации, указанные в [4].

Для определения металлов в мягких тканях моллюсков в качестве предварительной подготовки чаще всего используют сухую (при $t = 450^{\circ}\text{C}$) и кислотную минерализацию [5]. Нам необходимо было подобрать единую пробоподготовку для всех видов проб для сопоставимости результатов. Так как навески взвеси и биоотложений были минимальны (1-10 мг), поэтому была выбрана кислотная минерализация (табл.1).

Определенную проблему вызвал отбор взвешенного вещества, поскольку его содержание в воде было минимальным – 1-3 мг/л. Так как количество взвеси и, соответственно, содержание металлов в ней были малы, а чувствительность метода достаточно высока, незначительное загрязнение извне приводит к недостоверности результатов, и к фильтрам предъявлялись особые требования. При попытке использовать стекловолоконные фильтры GF/C с размером пор 0,8 мк были получены отрицательные результаты чистоты. Фильтры промывали 100 мл горячей азотной кислоты различной концентрации (1,25%, 1,7%, 2,5%, 5%) затем 50 мл бидистиллированной воды, однако избавиться от высоких фоновых значений металлов на фильтрах не удалось, а это дало бы высокую ошибку при анализе. Возможно, это связано с тем, что стекловолоконные фильтры хорошо адсорбируют металлы.

Для дальнейших исследований мы использовали ядерные фильтры, так как они удовлетворяли всем требованиям для анализа взвеси на металлы, фоновые значения холостой пробы были достаточно низкими.

Используя подобранную нами методику подготовки проб (табл. 1), в ноябре 2003 г. провели исследования на экспериментальном марихозяйстве ИнБЮМ НАН Украины. Мидий *Mytilus galloprovincialis* Lam. размером 5 - 6 см на преднерестовой стадии отбирали с коллекторов и отделяли мягкие ткани от створки. Время прохождения пищи через кишечник моллюсков определяли, поместив последних в фильтрованную морскую воду с добавлением зеленой микроводоросли *Tetraselmis suecica* и заметив время от начала потребления корма до появления зеленых фекалий [6].

Таблица 1.

Подготовка проб и анализ содержания тяжелых металлов в них

Название этапа	Взвешенное вещество	Мягкие ткани мидий	Биоотложения
1. Отбор материала	1. Морскую воду отбирали в 20 – литровые бутылки с того же горизонта, что и моллюсков.	1. Моллюсков одной размерности на одной стадии половозрелости отбирали с коллекторов с одного горизонта.	1. Для сбора фекалий мидий сразу после отбора проб помещали в фильтрованную морскую воду на 24 ч для освобождения содержимого их желудков.
2. Подготовка к минерализации	2. Взвесь фильтровали через ядерные фильтры с размером пор 0,5 мк. Фильтры перед фильтрацией промывали 100 мл горячим 5% раствором HNO_3 , затем 50 мл бидистиллированной воды. За один раз фильтровали 1 литр морской воды, взвесь на фильтре промывали, затем смывали минимальным количеством бидистиллята (5-10 мл), раствор выпаривали, остаток высушивали до постоянной массы при $t = 105^\circ\text{C}$	2. Мягкие ткани мидий отделяли от створок раковины пластмассовым ножом и пинцетом, измеряли сырой и сухой вес тканей.	2. Собранные фекалии собирали пипеткой, дважды промывали бидистиллятом, высушивали до постоянной массы.
3. Минерализация	3. Кислотную минерализацию проводили в растворе концентрированной 65% HNO_3 марки «ОСЧ». Разложение проходит быстрее, если его проводить в автоклаве при $t = 120^\circ\text{C}$ и 2 атм., для чего посуда должна быть герметично закрыта. Если возможности использования автоклава нет, то разложение проводится выпариванием кислотных экстрактов на песчаной бане под навесом, чтобы исключить загрязнение проб. В пробирку с пробой вносили 2 мл HNO_3 и оставляли на ночь. Затем содержимое выпаривали, посуду охлаждали и вновь вносили 2 мл кислоты и упаривали. Процедуру повторяли, пока кислотные экстракты не становились бесцветными или светло-желтыми. Полученный минерализат выпаривали досуха, сухой остаток растворяли в бидистилляте (4-5 мл) и использовали для анализа. Параллельно проводили минерализацию добавляемых к навеске реактивов для контроля их чистоты.		
4. Особенности анализа	4. Для калибровки ААС на указанные элементы, которая проводится каждый раз при переходе от определения одного элемента к другому, очень удобным оказалось использование Государственного стандартного образца растворенных металлов ГСОПМ-28, в состав которого, помимо анализируемых нами 4 элементов, входит пятый – железо. Калибровка на Cd и Zn проводилась в диапазоне концентраций 1,25-5,0 мкг/л (по западной литературе – 1,25-5,0 ppb или part per billions), на Cu – 12,5-50,0 мкг/л, на Pb – 25,0-100 мкг/л. Погрешность метода, согласно нормативным документам [3], достаточно высока ($\pm 30\%$), что определяется очень высокой чувствительностью метода и сложной пробоподготовкой.		

ПРОСТОЙ СПОСОБ ПОДГОТОВКИ ПРОБ ДЛЯ АНАЛИЗА

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве иллюстрации апробации метода показано содержание тяжелых металлов (Pb, Cu, Zn, Cd), регламентируемых медико-биологическими требованиями, в мягких тканях мидии *Mytilus galloprovincialis*, взвешенном веществе и биоседиментах мидий (табл. 2).

Таблица 2.
Содержание микроэлементов в системе «взвесь – мидии – биоотложения»,
мкг/г сухой массы

Проба	Cd	Pb	Cu	Zn
Взвешенное вещество	<u>62,8 - 187,7*</u> 125,4	<u>120,9 - 197,3</u> 152,2	<u>306,7 - 514,2</u> 370,0	<u>119,9 - 443,8</u> 286,8
Мягкие ткани мидии	<u>6,00 - 10,04</u> 7,5	<u>16,44 - 22,7</u> 18,9	<u>22,9 - 31,7</u> 28,2	<u>45,4 - 75,5</u> 60,6
Биоотложения мидий	<u>37,1 - 58,1</u> 42,0	<u>12,8 - 18,7</u> 14,6	<u>92,6 - 172,8</u> 138,2	<u>82,1 - 201,1</u> 124,9
ПДК для мидий	12	60	180	1200

*- в числителе – пределы колебания показателя; в знаменателе – среднее значение.

Из таблицы 2 видно, что содержание меди и цинка в моллюсках выше, чем кадмия и свинца, причем концентрация цинка в тканях мидии в 2 раза превышает содержание меди, в 3 раза – свинца и в 8 раз – кадмия. Высокие концентрации цинка в тканях моллюска объясняется более высоким содержанием его в среде, также он входит в состав ферментов (Zn – важный ферментный кофактор в организмах). Роль цинка в метаболизме белков настолько фундаментальна, что некоторые авторы сравнивают его с незаменимой аминокислотой [7].

Концентрация кадмия, меди, цинка в мягких тканях моллюска прямо пропорционально содержанию каждого элемента во взвешенном веществе (таблица 2). Как видно из приведенных данных, практически всегда среди исследованных металлов количественно преобладает цинк и медь, тогда как кадмий и свинец присутствуют в меньших количествах. Наблюдается сходство между микроэлементным составом мидий, составом взвеси и биоотложений. Подтверждается тенденция уменьшения концентрации микроэлементов в пищевой цепи фитопланктон – моллюски: в водной экосистеме наибольшей способностью концентрировать переходные и тяжелые металлы обладают взвешенное вещество и донные отложения, а затем следует бентос, рыбы [8].

Анализ содержания металлов показал значительное концентрирование цинка, кадмия, и меди в биоотложениях мидий – в 2, 6 и 4,5 раз соответственно - по сравнению с тканями. При этом концентрации всех металлов в тканях мидий с марихозайства не превышали ПДК для мяса моллюсков и ракообразных [9], что особенно важно для марикультуры. Полученные данные (табл.2) позволяют определить степень мелиорации среды марихозайством. Расчеты показывают, что 10000 мидий товарного размера с одного 8-метрового коллектора за сутки производят около 300 г сухого вещества или 109,5 кг в год. Таким образом, 1 га

фермы (1000 коллекторов) образует 109,5 тонн биоотложений в год и, следовательно, на небольшом участке в черте города мидии могут очистить среду за год от более 1,5 кг свинца и 4,7 кг кадмия в год только за счет биоотложений, не учитывая самой продукции.

Марикультура – выращивание моллюсков – в странах Черноморского бассейна находится еще на стадии развития, в отличие от стран Евросоюза, где в разрешенных для выращивания моллюсков зонах не должно быть химических загрязнителей и особенно важно, чтобы концентрации тяжелых металлов не превосходили ПДК для мяса мидий [10].

ВЫВОДЫ

Разработана методика подготовки проб для анализа содержания тяжелых металлов в системе «взвесь – мидии – фекалии» методом ААС ЭТА. Подобная пробоподготовка экономна по времени и расходу реактивов, а также создает мягкие условия разложения органического вещества.

Преобладающими металлами во всех пробах являются цинк и медь. Наблюдается сходство между микроэлементным составом мидий и составом взвеси и биоотложений. Показано значительное концентрирование цинка, кадмия, и меди в биоотложениях мидий, по сравнению с тканями моллюсков.

Список литературы

1. Wen-Xiong Wang, Fisher N.S. Assimilation of trace elements and carbon by the mussel *Mytilus edulis*: Effects of food composition // *Limnology and oceanography*. – 1996. – № 2 (41) – P. 197-207.
2. Современные методы анализа и оборудование в санитарно-гигиенических исследованиях. – М.: ФГУП «Ингерсэп», 1999. – 496с.
3. Методика выполнения измерений массовой концентрации Cd, Zn, Cu, Pb, As в пищевых продуктах. Атомно-абсорбционный метод с использованием электротермической атомизации МВВ 081/12 – 16 – 98. – Северодонецк: КНПП «Химавтоматика – аналитприбор», 1998 – 64 с.
4. Ермаченко Л.А., Ермаченко В.М. Атомно-абсорбционный анализ с графитовой печью. Методическое пособие под редакцией заслуженного врача РСФСР, кандидата медицинских наук Подуновой Л.Г. – Москва, 1999 – 98 с.
5. ГОСТ 26929 – 94. Межгосударственный стандарт. Сырье и продукты пищевые. Подготовка проб. Минерализация для определения содержания токсичных элементов. Введ. 01.01.1998. 15 с.
6. Цихон-Луканина Е. А. Трофология водных моллюсков – М.: Наука, 1987. – 176 с.
7. Авцын А.П. Микроэлементозы человека // *Клиническая медицина*. – 1997. – №6 (65) – С. 36-44.
8. Патин С.А. Экологическая токсикология и биохимия загрязняющих веществ в мировом океане: автореф. дисс. ... докт. биол. наук. – М., 1977. – 52 с.
9. Збірник важливих офіційних матеріалів з санітарних і протиешдемічних питань // Видання офіційне. У шести томах. Том 1. – Київ, 1997. – 268 с.
10. Холодов В.И. Санитарный контроль моллюсков, выращиваемых в морских хозяйствах Украины и странах ЕС // *Рыбное хозяйство Украины*. – 2004. – №3/4. – С. 28-33.

Поступила в редакцию 01.03.2006 г.