

На правах рукописи

САРАТОВСКИХ Елена Анатольевна

**ПРОЦЕССЫ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ В МЕХАНИЗМЕ
ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ
ТЕХНОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

03.00.02 – биофизика
03.00.16 – экология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Москва – 2008

Работа выполнена в Институте проблем химической физики РАН и
Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор
О.Ф. Филенко

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Ю.П. Козлов

доктор физико–математических наук, профессор
Е.В. Веницианов

доктор биологических наук
Л.В. Семеняк

Ведущая организация: Московский государственный университет
технологий и управления

Защита диссертации состоится «___» _____ 2008 г. в _____ часов
на заседании Специализированного Совета Д 501.001.55 при Московском госу-
дарственном университете им. М.В. Ломоносова, биологический факультет по
адресу: 119992, г. Москва. Ленинские горы. МГУ. Биологический факультет,
ауд. № 389.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Московского государствен-
ного университета им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «___» _____ 2008 г.

Ученый секретарь
Специализированного совета,
кандидат биологических наук

Н.В. Карташева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Опасность химического загрязнения окружающей среды проявляется в прямом и опосредованном токсическом действии на живые организмы значительных количеств веществ, техногенного происхождения. Техногенные загрязняющие вещества приводят к возникновению химических реакций – в объектах окружающей среды и изменению биохимических реакций, протекающих в организмах. В результате экосистемы теряют способность к самоочищению. Накопление токсикантов в природных объектах обуславливает прогрессирующие темпы сокращения объемов и ухудшения качества ресурсов жизнеобеспечения человечества – запасов питьевой воды, промысловых организмов, почв, пригодных для сельскохозяйственного использования.

При существующих технологиях, рост промышленного производства и энергетики связаны с образованием отходов пропорционально объёму произведённой продукции, что вызывает соответствующий рост загрязнения биосферы. Кардинальное решение проблемы состоит в переходе на безотходные технологии и реутилизацию материалов в производстве и потреблении, оборотные схемы водопользования и комплексное использование ресурсов.

В области сельского хозяйства (с/х) опасность применения пестицидов и других химических средств защиты растений (ХСЗР) обусловлена их прямой токсичностью по отношению к почвенным микроорганизмам, формирующим плодородие почв. Зачастую, ХСЗР отличаются высокой устойчивостью к биотрансформации, из-за блокирования окислительных процессов, и характеризуются низкой способностью к разложению под действием солнечной радиации; поэтому аккумулируются в почве, воде, в живых организмах. В результате может снижаться продуктивность с/х культур и ухудшаться качество продукции; возникновение мутаций приводит к появлению более токсикорезистентных видов сорной растительности. Переход химических загрязняющих веществ (ЗВ) с продуктами питания в организмы животных и человека является причиной возникновения практически всех форм хронических заболеваний у населения, а так же таких тяжёлых нарушений, как онкологические или патологии у новорождённых.

Решение совокупности этих сложных проблем в значительной степени определяется успехами фундаментальных исследований в области физической химии, биохимии, химической экологии. Раскрытие молекулярных механизмов биологического действия экотоксикантов на структурно-функциональные системы клетки - ферментные системы, биомембраны, генетический аппарат - необходимы для успешной борьбы за чистоту окружающей среды и безопасность существования человека. Без понимания химических механизмов формирования токсичности невозможно создавать методы контроля состояния окружающей среды, прогнозировать возможную токсичность, отдалённые последствия применения препаратов, предотвращать возникновение вредных продуктов трансформации исходных соединений, разрабатывать эффективные и экологически безопасные способы переработки отходов промышленных и с/х-производств, стоков коммунально-бытового хозяйства.

Огромные объёмы выбросов ЗВ в объекты окружающей среды; биоаккумуляция, в сочетании с биотрансформацией поллютантов, приводящей к появлению более персистентных и токсичных соединений, чем исходные, - привели к высокому уровню загрязнения биосферы: санитарно-эпидемиологические станции (СЭС) выполняют более сотни измерений каждой отобранной пробы. Поэтому необходимы

новые интегральные методы биотестирования. Разработка способов детоксикации, очистки объектов природы от промышленных, с/х- и коммунальных стоков, с целью охраны биосферы, как среды обитания человека - задача, в которой новые решения могут возникать только на базе фундаментальных исследований и на стыке нескольких научных дисциплин.

На защиту выносятся **новая научная гипотеза** об определяющей роли процессов комплексообразования техногенных токсикантов с компонентами структурно-функциональных систем клетки в механизме токсического поражения организма.

Цель работы. Изучение роли процессов комплексообразования в механизме действия токсикантов на структурно-функциональные системы клетки и их значения для общебиологических проявлений интоксикации и экологических эффектов.

В связи с поставленной целью решались следующие задачи:

Исследование механизма химического действия экотоксикантов (пестицидов, комплексов металлов, хлорорганических соединений (ХОС), в частности, хлор фенолов) на микроэлементы, нуклеотиды; мембрано-связанные металлсодержащие окисляющие ферменты; липиды мембранных структур.

Установление корреляции между процессами комплексообразования ЗВ, протекающими в организме, энергодиффицитом клетки и физиологическими эффектами *in vivo*. Создание интегрального метода экспресс-контроля токсикологического состояния водных объектов окружающей среды.

Исследование продуктов разложения ЗВ. Разработка технологии детоксикации и очистки питьевой и сточной вод, вытяжек из твёрдых объектов или промышленных отходов от ЗВ с использованием процессов комплексообразования, обработки ультрафиолетом (УФ), в комплексе с биологическими методами.

Выявление связи между результатами, полученными в ходе целенаправленного мониторинга водного объекта (на наличие пестицидов, металлов, ХОС) и технологией очистки сточных вод на городских очистных сооружениях.

Научная новизна. Впервые показано, что техногенные токсиканты, относящиеся к соединениям различных химических классов, а также образованные ими комплексы с рядом металлов проявляют высокую способность к дальнейшему комплексообразованию с такими компонентами живой клетки, как моно- и динуклеотиды. Создана математическая модель, позволяющая количественно оценить степень комплексообразования токсикантов с нуклеотидами. Определены константы устойчивости образующихся комплексов.

Впервые проведено сравнение ингибирования активности окислительной металлсодержащей ферментной системы - НАДН-оксидоредуктазы, восьмью пестицидами различного химического строения, комплексами гербицида лонтрел с восьмью разными металлами, и солями этих металлов. Определены кинетические параметры и тип ингибирования. Выявлен порядок изменения антиредуктазной активности ЗВ в зависимости от величины их константы ингибирования фермента. Показано, что в активном центре фермента соли металлов конкурируют за место связывания с акцептором электронов, а лиганды и комплексы - с донором. Прочность связи ЗВ с ферментом (и токсические свойства этого ЗВ) возрастает при переходе от иона металла к лиганду и к комплексу.

Создана новая математическая модель процесса переноса токсикантов через липосомальные мембраны, впервые доказывающая, что комплексообразование с липидами является лимитирующей стадией процесса переноса через мембраны и

причиной биоаккумуляции ЗВ. Рассчитанные коэффициенты массопереноса имеют обратную корреляцию с константами комплексообразования.

Выявлено, что причиной возникновения мутаций (типа сдвига рамки считывания), при действии ЗВ (ХОС, пестицидов и металлокомплексов) на многоклеточный организм является образование комплексов с ДНК и РНК, приводящих к нарушению нативности двойной спирали, гидролизу фосфодиэфирных связей. Определены константы устойчивости комплексов ЗВ с полинуклеотидами. Показана корреляция констант комплексообразования с физиологическими эффектами токсичности, проявляемыми *in vivo*: влиянием на рост численности почвообитающих микроорганизмов и гидробионтов, со степенью генотоксичности изученных ЗВ.

Впервые установлено, что образование комплекса техногенного токсиканта с аденозинтрифосфорной кислотой (АТФ) приводит к энергодефициту клетки, который является важной причиной развития интоксикации, приводит к гибели клетки и целого организма. Характеристикой энергодефицита является константа комплексообразования, которая коррелирует с количественными параметрами биологического действия ЗВ: подавлением прорастания семян, ростом вегетирующих растений, жизнедеятельностью организмов, подавлением ферментативной активности, индуцированием генных мутаций.

Показано, что гербицид лонтрел и его комплексы с металлами трудно поддаются биологической деградации. Впервые установлены продукты, образующиеся при разложении гербицида лонтрел под действием УФ составляющей солнечного света. Выявлена повышенная токсичность продуктов разложения гербицида лонтрел по сравнению с исходным соединением.

Практическая значимость. Получены новые данные о существовании в расторе устойчивых бидентатных комплексов пестицидов с ионами металлов. Показана экологическая опасность возможного возникновения подобных комплексных соединений в открытых водоёмах и клетках живых организмов, включая теплокровных высших трофических уровней, из-за повышенных токсических свойств комплексов.

Установлена корреляция между константой комплексообразования пестицидов с АТФ и эффектом подавления прорастания семян, гербицидным действием на вегетирующие растения, содержанием хлорофилла в листьях, что может быть использовано в качестве экспресс-теста на этапе первичного скрининга пестицидов с АТФ-зависимым механизмом действия.

Исследованы кинетические закономерности УФ разложения гербицида лонтрел, которые могут быть использованы при очистке стоков промышленных производств, разработке технологий очистки почв, вод, утилизации запасов ХСЗР.

Показана потенциальная канцерогенная и мутагенная опасность ЗВ (пестицидов: лонтрел, зенкор, базагран, раундап, кузагард, сетоксидим, тачигарен, тилт; металлокомплексов гербицида лонтрел; хлорсодержащих фенолов), обусловленная их комплексообразованием с ДНК и РНК.

Доказано, что техногенные ЗВ ингибируют действие окисляющих ферментных систем в организмах, что снижает способность к самоочищению водоёмов и почв.

Предложен новый метод определения интегральной токсичности объектов окружающей среды: воды, почв, продуктов питания.

Проводившийся в течение нескольких лет целенаправленный мониторинг среднего течения реки Волги, показал, что причиной наличия хлорорганических ЗВ в

концентрациях, значительно превышающих ПДК, является хлорирование сточных вод на городских очистных сооружениях.

Разработаны способы очистки вод (питьевого водоснабжения, технологического цикла, сточных вод) с применением УФ излучения. На основании проведённого мониторинга состояния очистных сооружений и питьевого водоснабжения г. Казани, предложены методы интенсификации очистки и увеличения их пропускной способности. Замена хлорирования на УФ обработку сточных вод и циркуляция их - значительно улучшит экологическую обстановку водных бассейнов.

Вклад автора в работы, выполненные в соавторстве и включённые в диссертацию, состоит в формировании направления, постановке общей задачи, личном участии во всех этапах работы: в ходе экспериментального исследования, в анализе и интерпретации полученных данных, в планировании на их основе новых перспективных направлений научных исследований и технологических разработок.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены на XIX и XVI международном Симпозиуме «Современная химическая физика» (Туапсе, 2007, 2004); на международном Конгрессе «Вода: экология и технология» (Москва, 2000, 1996, 1994); на международной конференции «Высокоорганизованные каталитические системы» (Москва, 2004); на XI международной конференции «Химия органических и элементоорганических пероксидов» (Москва, 2003); на международном семинаре «Активация малых молекул комплексами металлов» (Ленинград, 1989); на IV Всесоюзном совещании по кристаллохимии неорганических и координационных соединений (Бухара, 1986); на Всесоюзном координационном совещании по пестицидам (Черноголовка, 1988); на Всесоюзном совещании по химии и технологии пиридин содержащих пестицидов (Черноголовка, 1988), и др.

Публикации. По материалам диссертации опубликована 21 работа в реферируемых журналах, 3 отчёта по программе Минэкологии РФ «Экологическая безопасность России», 7 отчётов по научно-практическим хозяйственным работам.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения; обзора литературы; главы, посвящённой материалам и методам; 6 глав собственных исследований; заключения; выводов; списка литературы, охватывающего 585 источника, из них - 50% иностранных. Работа изложена на 485 страницах машинописного текста, включает 80 рисунков, 56 таблиц, 11 схем, 6 фотографий, 2 чертежа.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ. Литературный обзор

В этой главе собраны и обобщены литературные данные по воздействию техногенных токсикантов на окружающую природу. Сопоставлены различные точки зрения на механизм действия пестицидов. Освещена роль микроэлементов в жизнедеятельности живых организмов, с которыми, главным образом, связываются процессы комплексообразования в биологических системах. Проведённый анализ литературных данных показывает, что, несмотря на многочисленные исследования молекулярных механизмов действия различных токсикантов, как на модельных системах, так и на реальных биологических объектах, многое в этом вопросе остаётся не ясным. На момент начала исследований, вплоть до настоящего времени,

данные о роли процессов комплексообразования в механизме действия ЗВ, и формировании токсичности ограничены и связываются исключительно с ролью металлов. С другой стороны, вопросы, связанные с молекулярными взаимодействиями ЗВ в метаболических процессах так же рассматриваются весьма узко, ограничиваясь, как правило, одной ферментной системой. На основе критического анализа литературных данных нами были сформулированы конкретные задачи исследования, определена последовательность их решения.

Глава 2. СПОСОБЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЗВ НА МОЛЕКУЛЯРНОМ УРОВНЕ НА КОМПОНЕНТЫ КЛЕТКИ И ВОДНЫЕ ОБЪЕКТЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ. Объекты и методы исследований

В качестве объекта исследования взяты действующие вещества восьми широко используемых пестицидов различного химического строения (гербициды: раундап, базагран, кузагард, сетоксидим, лонтрел, зенкор; фунгициды: тачигарен, тилт); хлорпроизводное фенола – 2,4,6-трихлорфенол; красители – бенгальский розовый и метиленовый голубой; соли и бидентатные комплексы лонтрела с ионами 8 металлов (Cu, Co, Mo, Mn, Mg, Fe, Zn, Ni).

Состав и строение синтезированных комплексов исследовали методами элементного анализа, ЭПР, ИК и электронной спектроскопии, рентгенографии. Образование комплексов с нуклеотидами изучали флуоресцентным методом, при концентрации ЗВ от 10^{-8} до 10^{-2} М. Определение температуры плавления ДНК проводили спектроскопически в термостатируемой кювете.

В работе использовалась выделенная из мембранных структур клеток метаноокисляющих бактерий *Methylococcus capsulatus* (штамм М, КФ 1.6.99.25), дополнительно очищенная НАДН-оксидоредуктаза, молекулярная масса 180 кДа. Кинетические параметры и тип ингибирования определяли по методике Михаэлиса-Ментен. Проникновение ЗВ через мембраны изучали на бислойных липосомах из фосфатидилхолина и холестерина. В качестве флуоресцентной метки использовалось этенопроизводное аденозинтрифосфорной кислоты (ε-АТФ): спектр возбуждения $\lambda=312$ нм, максимум флуоресценции $\lambda=420$ нм.

Анализ влияния пестицидов и комплексов на прорастание семян, рост растений и содержание хлорофилла, проводили на однодольных (озимая пшеница «Миrowsкая 80») и двудольных (горох «Улановский юбилейный») растениях. Жизненные циклы и популяционную динамику микроартропод испытывали на почвообитающих коллемболах видов *Folsomia candida* (Isotomidae) и *Ceratophysella denticulate*. Токсикологическую оценку водных растворов экотоксикантов выполняли на культуре инфузорий *Tetrahymena pyriformis* и светящихся бактериях *Benekea harvey* (штамм В 1 7) по стандартным методикам. Генотоксичность определяли на модифицированном тесте Эймса *Salmonella*/микросомы.

Биохимическое поведение лонтрела и $\text{Cu}(\text{лонтрел})_2$ изучали в лабораторном аэротенке, на активном или очистных сооружениях, подвергнутом мутагенной обработке нитрозометилмочевинной. Фотохимическое разложение проводили в кварцевом реакторе; использовали лампы марок ДРШ-1000, ДРБ-8 и БРА-15 с длинами волн излучения в диапазоне 250–600 нм и барботированием кислородом, озоном, воздухом, аргоном. Продукты фоторазложения лонтрела установлены газовым хроматомасс-спектрометрическим методом. Определение ЗВ в процессе мониторинга Волги выполняли высокоэффективной жидкостной хроматографией.

Глава 3. ХЕЛАТИРОВАНИЕ МЕТАЛЛОВ, КАК ОДНА ИЗ ПРИЧИН УВЕЛИЧЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ КСЕНОБИОТИКОВ

Пестициды и металлы являются в настоящее время преобладающими ЗВ окружающей среды; с другой стороны – микроэлементы входят в состав клеток живых организмов. Естественно, что изучение процессов комплексообразования были начаты с исследования взаимодействия металлов и пестицидов.

§1. Синтез и свойства бидентатных комплексов ЗВ

Изучалась комплексообразующая способность лонтрела (3,6-дихлорпикколиновой кислоты - 3,6-ДХПК = L) и 3,4,5-ТХПК с металлами: Co(II), Mn(II), Cu(II), Ni(II), Mg(II), Mo(IV), Zn(II), Fe(II). Комплексы получены при взаимодействии спиртового раствора лонтрела с водными растворами различных солей: хлоридами, карбонатами, сульфатами, аммиакатами. Во всех случаях происходит образование комплексов соотношения 1:2. В ИК спектрах всех комплексов присутствуют полосы поглощения (п.п.) в пределах $1610\text{--}1590\text{ см}^{-1}$, соответствующие $\nu(\text{C=O})$ координированной. Появление в спектрах комплексов новой п.п.

в области 1620 см^{-1} указывает на существование координированной группы COO^- по типу O-M-O, т.е. на образование прочной ковалентной связи металл-кислород. Интенсивная п.п. 920 см^{-1} в спектре лонтрела принадлежит $\nu(\text{C-N})$. А её отсутствие в спектрах комплексов указывает на перераспределение энергии данной связи при образовании новых соединений. Вновь появляющаяся во всех спектрах п.п. в области 460 см^{-1} можно идентифицировать как $\nu(\text{M-N})$. Соответственно установлены п.п., принадлежащие $\delta(\text{O-M-O})$ и $\delta(\text{N-M-N})$.

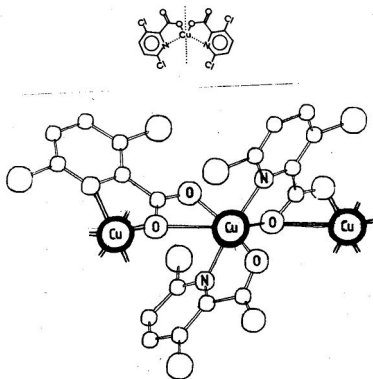


Рис. 1. Структура комплекса CuL_2

Анализ ИК спектров синтезированных комплексов показал следующий порядок $\nu(\text{COO}^-)$: $\text{Ni}=\text{Fe}<\text{Mo}=\text{Co}<\text{Cu}<\text{Mn}<\text{Zn}<\text{Mg}$. Известно, что частота валентного колебания карбонила уменьшается симбатно увеличению константы устойчивости комплекса, т.е. NiL_2 и FeL_2 наиболее прочные, а MnL_2 , ZnL_2 и MgL_2 - наименее.

Данные рентгеноструктурного анализа трёх медных комплексов показали, что они имеют октаэдрическое строение с разной степенью искажения координационного полиэдра. В центросимметричном комплексе (рис. 1) хлорпикколиновые фрагменты связаны с металлом атомами азота и одного из атомов кислорода карбоксильной группы с образованием пятичленных металлоциклов. Кристаллы CuL_2 имеют полимерную цепочечную структуру. До октаэдрической координации атом Cu дополняется двумя атомами кислорода карбоксильной группы соседней молекулы, с образованием 4-х членного хелатного металлоцикла. В результате один из лигандов является концевым, а второй - мостиковым. При этом образуется полимерная цепь - Cu-O-Cu- с расстояниями Cu-O 2,13 и 2,74 $\text{\AA}$.

§2. Поведение металлокомплексов в водных растворах

Мелкодисперсные образцы комплексов CuL_2 имеют аксиально-симметричный спектр ЭПР. Существенное отличие g-фактора от чисто спинового и форма спектра свидетельствуют о значительной примеси орбитального магнитного момента в суммарном магнитном моменте неспаренного электрона, что свидетельствует об октаэдрическом искажении кристаллического поля лигандов. Из сравнения спектров ЭПР замороженных растворов следует, что при растворении в воде все комплексы сохраняют координационное окружение центрального ядра. Слабое уширение сигналов растворённых в воде образцов при 300 К свидетельствует о частичном спаривании электронов, т.е. объединении двух и более молекул в полимерные цепочки, аналогичные $[\text{Cu}(\text{L}_2)]_n$.

Таким образом, в нативных условиях рассмотренные комплексы существуют как единое целое в недиссоциированном состоянии. Они способны участвовать в дальнейшем комплексообразовании с биоактивными лигандами за счёт заполнения координационной сферы металла. В водной экосистеме с широким набором ЗВ, возможно образование комплексных соединений, аналогичных рассмотренным.

Глава 4. НУКЛЕОТИДЫ КАК ОБЪЕКТ АТАКИ КСЕНОБИОТИКОВ

Состав биологических макромолекул прост в своей основе. Все живые организмы состоят из одних и тех же молекул, используемых как строительные блоки. Такими «блоками», в частности, являются нуклеотиды, играющие одну из ключевых функций в метаболизме и репликации, выполняют энергетические и регуляторные процессы, участвуют в биосинтезе. Клетки организмов улавливают, сохраняют и передают энергию в химической форме, главным образом в виде энергии, заключённой в молекулах моонуклеотида АТФ. Поэтому мы исследовали образование комплексов с нуклеотидами пестицидов и их комплексов с металлами.

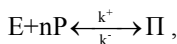
§1. Комплексование техногенных токсикантов с АТФ

Тушение флуоресценции ϵ -АТФ наблюдается при концентрации пестицида от 10^{-7} до 10^{-2} М, что свидетельствует о возникновении комплексов ϵ -АТФ-пестицид.

Таблица 1. Значения констант комплексобразования нуклеотидов с пестицидами и металлокомплексами гербицида лонтрел ($K_{\text{к/обр}}$, M^{-1})

Соединение	$K_{\text{к/о}} \cdot 10^{-3}$, M^{-1} ϵ -АТФ pH = 6,8	$K_{\text{к/обр}} \cdot 10^{-3}$, M^{-1} ϵ -НАДН	Соединение	$K_{\text{к/обр}} \cdot 10^{-3}$, M^{-1} ϵ -АТФ pH = 6,8	$K_{\text{к/о}} \cdot 10^{-3}$, M^{-1} АТФ pH = 1,68	$K_{\text{к/обр}} \cdot 10^{-3}$, M^{-1} ϵ -НАДН
Базагран	4,7±0,4	-	MgL_2	0,8±0,02	21,1±14,6	-
Зенкор	26,5±3,3	21,33±1,5	MnL_2	2,2±0,1	40,4±14,8	-
Кузагард	9,7±0,5	2,51±0,04	FeL_2	8,8±0,4	47,2±20,3	0,55±0,06
Лонтрел	15,0±2	11,70±0,4	CoL_2	600±200	32,2±0,6	3,05±0,14
Раундап	8,2±1,2	2,20±0,41	NiL_2	21,6±0,5	105,8±54	4,74±0,34
Сетоксид	5,0±0,3	2,84±0,71	CuL_2	851,4±82	296,6±90	4,56±0,16
Тачигрен	1,1±0,04	1,80±0,39	ZnL_2	1,6±0,06	86,3±18	-
Тилт	0,8±0,06	0,46±0,06	MoL_2	3,6±0,4	-	2,15±0,07

Для уточнения механизма образования, и оценки констант устойчивости комплексов нами была создана математическая модель процесса. Предполагалось, что взаимодействие пестицидов (P) с ϵ -АТФ (E) происходит по схеме:



где Π – комплекс; n – стехиометрический коэффициент; $K_{\text{к/обр}} = k^+/k^-$ – константа

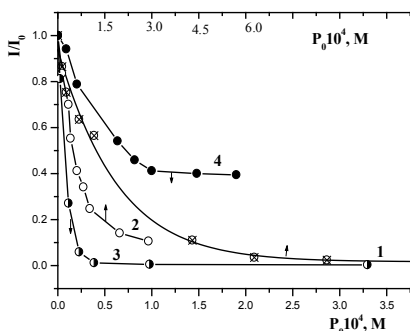


Рис. 2. Зависимость изменения относительной флуоресценции от концентрации пестицида или металлокомплекса:

1 - лонтрел с ϵ -АТФ; 2 - лонтрел с АТФ; 3 - CuL_2 с ϵ -АТФ; 4 - CuL_2 с АТФ.

Сплошная линия – теоретическая кривая, точки – данные эксперимента. Концентрации: ϵ -АТФ = $1 \cdot 10^{-5}$ М; АТФ = $2 \cdot 10^{-4}$ М;

значения n и константы комплексообразования ($K_{\text{к/обр}}$). Наиболее прочные комплексы с ϵ -АТФ образуют зенкор и лонтрел, а наиболее слабые – тилт и тачигарен. Величина $K_{\text{к/обр}}$ изученных пестицидов изменяется в ряду: зенкор > лонтрел > кузагард > раундап > сетоксидим > базагран > тачигарен > тилт (табл. 1).

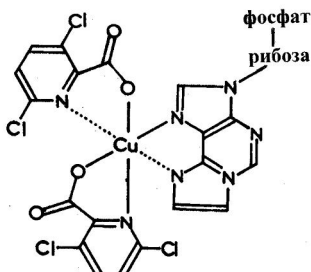


Рис. 3. Строение тройного комплекса ϵ -АТФ с металлокомплексами гербицида лонтрел = $[\epsilon\text{-АТФ-Cu(L)}_2]$.

комплексообразования:

$$K_{\text{к/о}} = \frac{[E_o] - [E]}{[E]\{[P_o] - n([E_o] - [E])\}^n}$$

Определенный стехиометрический коэффициент n для всех изученных соединений равен $1 \pm 0,2$, т.е. с одной молекулой ϵ -АТФ взаимодействует лишь одна молекула пестицида. По найденным значениям $K_{\text{к/обр}}$ и n рассчитывали теоретические кривые титрования. Все расчеты проводили на ЭВМ БЭСМ-6.

На рис. 2 приведены экспериментальные зависимости изменения относительной флуоресценции (I/I_0) от исходной концентрации пестицида (P_0) и соответствующие им теоретические кривые для гербицида лонтрел и комплекса CuL_2 , рассчитанные по найденным значениям

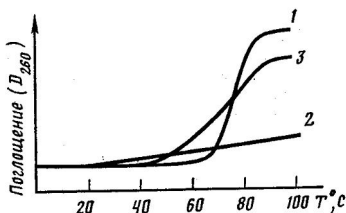


Рис. 4. Кривые плавления ДНК:

1. – контроль. В присутствии: 2. - лонтрел, 3. - Fe(L)_2 .

В случае комплексов Cu-, Co-, NiL₂ - K_{к/обр} с ε-АТФ выше, чем у исходного лонтрела; у комплексов других металлов, на один - два порядка ниже. Прочность комплексов ε-АТФ с комплексами M(L)₂ = [ε-АТФ-M(L)₂] изменяется в ряду: Cu > Co > Ni > Fe > Mo > Mn > Zn > Mg.

Структура комплекса ε-АТФ с металлокомплексами лонтрела представлена на рис. 3. Тушение флуоресценции АТФ, как и в случае ε-АТФ, происходит без изменения положения максимума возбуждения и эмиссии флуоресценции. Комплекс [АТФ-ЗВ] образуется за счёт протонирования атома азота N-7 аденинового гетероцикла, одновременно атом азота терминальной NH₂- группы может связываться с молекулой ЗВ за счёт образования водородной связи. Прочность комплексов с АТФ в 5 – 10 раз выше, чем с ε-АТФ (табл. 1).

§2. Взаимодействие ЗВ с ди- и полинуклеотидами

Результатом тушения флуоресценции этенопроизводного динуклеотида НАДН (ε-НАДН) является образование ковалентной связи с адениновым фрагментом. С одним модифицированным звеном взаимодействует лишь одна молекула пестицида. Константы комплексообразования, рассчитанные на одно звено представлены в табл. 1. По величинам K_{к/обр} пестициды выстраиваются в гипотетический ряд активности, идентичный полученному при взаимодействии с АТФ: наибольшей K_{к/обр} обладает зенкор, наименьшей тагигарен и тилт. Комплексы лонтрела с Cu, Co, Ni, Fe, Mo образуют прочные комплексы с динуклеотидом (табл. 1). При взаимодействии с ДНК и РНК CuL₂, CoL₂, NiL₂, MoL₂ имеют K_{к/обр} выше, чем лонтрел (табл. 2).

Для выяснения влияния пестицидов на вторичную структуру нуклеиновых кислот проводили термическую денатурацию ДНК. Вещества с высокими K_{к/обр} образуют наиболее прочные комплексы с аденином и оказывают глубокое воздействие на структуру ДНК. Под их влиянием плавление ДНК становится не кооперативным (рис. 4), гиперхромный эффект (ГЭ) значителен (40% в контроле; 6-7% у зенкора и лонтрела). Кузагард, сетоксидим, металлокомплексы имеют высокую константу связывания, но из-за больших размеров и разветвлённого строения не в состоянии внедриться в двойную спираль и полностью нарушить нативность. Плавление ДНК остаётся кооперативным. Однако, температура плавления уменьшается на несколько градусов, интервал плавления увеличивается (почти в два раза для CoL₂), ГЭ значителен - до 10% у MoL₂. Таким образом, идёт процесс отщепления от ДНК низкомолекулярных продуктов в результате гидролиза фосфодиэфирных связей.

§3. Изменение структуры ДНК под действием ксенобиотиков

ХОС, в частности 2,4,6-трихлорфенол (ТХФ) в концентрации 10⁻⁷ – 10⁻⁶ М не нарушают нативности двойной спирали ДНК, оказывая на неё не глубокое воздействие. При плавлении T_{нач.пл.}⁰, интервал плавления и T_{пл}⁰С – близки к контролю, лишь ГЭ уменьшается в два раза (табл. 2). При возрастании концентрации ТХФ от 10⁻⁶ – 10⁻² М, T_{нач.пл.}⁰ снижается, интервал T_{пл}⁰С возрастает. В результате комплексования молекул ТХФ с адениновыми основаниями ДНК, происходит интеркаляция ТХФ между пуриновыми и пиримидиновыми основаниями, перекомплексование, приводящее к гидролизу фосфодиэфирных связей и выщеплению оснований - к образованию низкомолекулярных алкилированных продуктов.

По мере роста концентрации ТХФ, ГЭ монотонно снижается (рис. 5) до 11,3% - почти в 3 раза по сравнению с контролем. Для максимальной из исследовавшихся концентраций ТХФ = 10⁻² М, T_{пл}⁰С существенно ниже, чем у чистой ДНК. Однако,

характер плавления во всём диапазоне рассмотренных концентраций остаётся кооперативным – плавление одного участка приводит к плавлению другого, т.е. ТХФ в большей степени взаимодействует с концами полимерной молекулы, «отрезая» от неё низкомолекулярные куски. Молекулы лонтрела (3,6-ДХПК) и ТХФ, имеющие аналогичную пространственную структуру, образует комплексы с имидным водородом аденина или карбоксильным кислородом цитозина в цепи: гуанин-цитозин,

Таблица 2. Структурные изменения ДНК в присутствии токсикантов

Название	ε -ДНК $K_{\kappa/o} \cdot 10^{-3} M^{-1}$	ε -РНК $K_{\kappa/o} \cdot 10^{-3} M^{-1}$	$T_{пл}$ $^{\circ}C$	ГЭ, %	ТХФ М	$T_{пл}$ $^{\circ}C$	ГЭ, %
Контроль			74,6	40,10	Конт	61	37,0
Лонтрел	1,4 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,2	н/к	6,30	10 ⁻²	60,5	19,0
Зенкор	7,0 $\pm$ 0,7	10,8 $\pm$ 1,3	““	7,60	10 ⁻³	57,5	18,4
Раундап	0,54 $\pm$ 0,02	1,00 $\pm$ 0,05	““““	10,00	6 $\cdot$ 10 ⁻⁴	56,5	15,5
Кузагард	1,5 $\pm$ 0,1	1,47 $\pm$ 0,05	72,6	24,17	3 $\cdot$ 10 ⁻⁴	56,5	20,5
Тачигарен	0,12 $\pm$ 0,01	0,83 $\pm$ 0,07	72,5	37,83	10 ⁻⁴	58	18,7
Тилт	0,10 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,04	73,2	15,00	5 $\cdot$ 10 ⁻⁵	56,5	14,7
Сетоксидим	3,6 $\pm$ 0,5	5,9 $\pm$ 1,1	74,3	13,15	10 ⁻⁵	57	15,8
CuL ₂	1,5 $\pm$ 0,4	2,3 $\pm$ 0,3	67,2	16,50	10 ⁻⁶	60	11,3
CoL ₂	4,1 $\pm$ 0,2	4,6 $\pm$ 0,2	73,6	36,49	10 ⁻⁷	62	17,7
NiL ₂	3,3 $\pm$ 0,2	4,8 $\pm$ 0,2	71,0	22,50	-	-	-
FeL ₂	0,43 $\pm$ 0,03	0,48 $\pm$ 0,02	72,8	35,40	-	-	-
MoL ₂	5,4 $\pm$ 0,3	7,3 $\pm$ 0,5	74,5	10,75	-	-	-

аденин-тимин, согласно схеме 1. По мере роста концентрации токсиканта растёт количество таких комплексов на одной молекуле ДНК. За счёт образования комплексов 3В происходит нарушение вторичной и первичной структур ДНК.

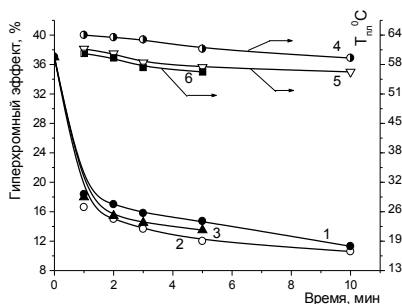


Рис. 5. Кинетика изменения гиперхромного эффекта и температуры плавления ДНК под действием 2,4,6-трихлорфенола:

1, 5 - ТХФ без облучения (расчёт);
2, 4 - ТХФ при облучении $\lambda = 313$ нм;
3, 6 – ТХФ + бенгальский розовый, $\lambda = 540$ нм.

Правая шкала: кривые 1 – 3.

Левая шкала: кривые 4 – 6.

Судя по влиянию на ДНК, продукты, образующиеся при фотолизе ТХФ, не зависят от длины волны облучения (УФ - 254, 313; VIS - 540 нм), но сильно изменяются при увеличении времени экспозиции. По мере увеличения концентрации продуктов разложения ТХФ – дибензофенола (ДБФ) и дибензофурана (ДБФур), происходит понижение $T_{пл}^{\circ}C$, $T_{нач,пл}^0$, увеличение интервала плавления. К максимальному гидролизу фосфодиэфирных связей ДНК приводит смесь ТХФ и продуктов его 50-60%-ной трансформации. Продукты полного разложения ТХФ (100% превращения) в большей степени воздействуют на вторичную структуру ДНК (рис. 5, кривая

2), чем сам ТХФ. Об этом свидетельствует значительное уменьшение величины ГЭ – до 10,6%. Мы считаем, что образуемые ДБФ и ДБФр комплексы с тимином, аденином, гуанином и цитозином приводят к разрыву водородных связей между пуриновыми основаниями, и к нарушению нативности двойной спирали и, в конечном итоге, - разделению двух комплементарных полинуклеотидных цепей.

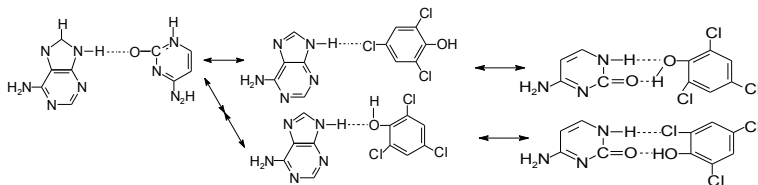


Схема 1

Такие ЗВ, как красители, ведут себя по отношению к ДНК по-разному: бенгальский розовый (БР) не оказывает влияния на плавление ДНК. При сенсibilизированном фотолизе БР и ТХФ, между ними образуются комплексы, которые в меньшей степени воздействуют на ДНК, чем чистый ТХФ. Метиленовый голубой (МГ), самостоятельно без ТХФ вызывает серьёзные нарушения вторичной структуры ДНК. Под его влиянием плавление ДНК становится не кооперативным, ГЭ = 5,7%. Столь существенный ГЭ, даёт нам основание считать, что происходит полное нарушение нативности двойной спирали. Таким образом, МГ образует комплексы с пуриновыми основаниями, что приводит к разрыву пептидных связей и нарушению комплементарности спирали ДНК.

Глава 5. ТЕХНОГЕННЫЕ ТОКСИКАНТЫ КАК ИНГИБИТОРЫ ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ

Хорошо известно, что все окислительные процессы в клетке катализируются ферментами. Очевидно, что вещество, в следовых количествах оказывающее биологическое действие, влияет на какую-либо ферментную реакцию. В качестве примера нами было изучено ингибирование техногенными токсикантами НАДН-оксидоредуктазы (НАДН-ОР), обладающей широкой субстратной специфичностью. В частности, НАДН-ОР участвует в окислении метана и его галлогензамещенных до формальдегида; СО до СО₂; алканов до спиртов; алкенов до эпокисоединений; NH₃ до гидроксилamina, катализирует включение атома кислорода по С-Н, N-Н, С=С и С=О связям.

§1. Ингибирование экотоксикантами НАДН-оксидоредуктазной реакции

Наибольшей ингибирующей активностью обладают зенкор и лонтрел. Концентрации, приводящие к инактивации фермента на 50% (I₅₀), у них наименьшие (табл. 3). Ингибирующая способность Cu-, Mo-, FeL₂ выше, чем у исходного лонтрела. Константа Михаэлиса по донору электронов НАДН составила K_m(НАДН) = 0,66 · 10⁻³ М; по акцептору электронов неотетразолию хлористому - K_m(НТ) = 2,47 · 10⁻³ М. Лонтрел, зенкор, кузагард, тачигарен, Cu-, Fe-, Mn-, MoL₂ конкурентно ингибируют редуктазу по донору электронов (рис. 6), видимо, являясь его структурным аналогом, пестицид связывается с ферментом в месте присоединения НАДН с образованием непродуктивного комплекса. Сетоксидим, раундап, тилт, Mg-, Ni-, Zn-, CoL₂ - неконкурентно ингибируют фермент по НАДН (рис. 7). Причём, при постоянном

значении K_m величина V_{max} уменьшилась по сравнению с опытом без ингибитора с $7,4 \cdot 10^{-6} \text{ лМ}^{-1}\text{с}^{-1}$ до $(2,0; 2,0; 2,2) \cdot 10^{-6}$, соответственно. Ряд активности соединений, выстроенный по величинам константы ингибирования (K_i) по НАДН: $\text{CuL}_2 < \text{MoL}_2 < \text{зенкор} < \text{лонтрел} < \text{FeL}_2 < \text{MnL}_2 < \text{ZnL}_2 < \text{NiL}_2 < \text{MgL}_2 < \text{базагран} < \text{CoL}_2 < \text{кузагард} < \text{тачигарен} < \text{раундап} < \text{тилт} < \text{сетоксидим}$.

Таблица 3. Влияние токсикантов на НАДН-оксидоредуктазу

Пестицид или комплекс - без ингибитора: $V_{max} = 7,40 \cdot 10^{-6} \text{ Мсек}^{-1}$; $S_1 = 6,58 \cdot 10^{-3} \text{ М}$; $S_2 = 2,65 \cdot 10^{-3} \text{ М}$. Соль - без ингибитора: $V_{max} = 2,75 \cdot 10^{-6} \text{ Мсек}^{-1}$; $S_1 = 1,54 \cdot 10^{-4} \text{ М}$; $S_2 = 3,30 \cdot 10^{-4} \text{ М}$. Тип ингибирования (Т/и): к – конкурентный; н – неконкурентный; б – бесконкупунтный; с – смешанный

Инги- битор	$I_{50}, \text{ М}$	$V_{max},$ Мсек^{-1}	$S_1, \text{ М}$ НАДН,	$K_i \cdot 10^4$ М НАДН	Т / и	$V_{max},$ Мсек^{-1}	$S_2, \text{ М}$ (НТ)	$K_i \cdot 10^4$ М НТ	Т / и
лонтрел	$1,1 \cdot 10^{-3}$		$1,23 \cdot 10^{-3}$	1,00	к	$1,88 \cdot 10^{-6}$	$6,98 \cdot 10^{-4}$	7,42	б
зенкор	$5,0 \cdot 10^{-4}$		$4,93 \cdot 10^{-3}$	0,25	к	$0,23 \cdot 10^{-6}$	$3,39 \cdot 10^{-4}$	8,94	б
базагран	$6,0 \cdot 10^{-4}$	$1,82 \cdot 10^{-6}$	$1,83 \cdot 10^{-4}$	12,80	б	$0,26 \cdot 10^{-6}$	$2,55 \cdot 10^{-4}$	8,40	б
раундап	$1,7 \cdot 10^{-3}$	$3,33 \cdot 10^{-6}$	$6,17 \cdot 10^{-4}$	22,00	н	$0,21 \cdot 10^{-6}$	$2,00 \cdot 10^{-4}$	42,9	б
кузагард	$2,7 \cdot 10^{-2}$		$9,86 \cdot 10^{-3}$	14,00	к		$5,72 \cdot 10^{-3}$	159	к
сетокс.	$1,7 \cdot 10^{-2}$	$2,00 \cdot 10^{-6}$	$7,59 \cdot 10^{-4}$	397,5	н		$11,00 \cdot 10^{-3}$	8,04	к
тачигар.	$2,7 \cdot 10^{-3}$		$2,47 \cdot 10^{-3}$	21,00	к		$5,30 \cdot 10^{-3}$	4,55	к
тилт	$2,2 \cdot 10^{-3}$	$1,25 \cdot 10^{-4}$	$5,98 \cdot 10^{-4}$	23,00	н		$13,00 \cdot 10^{-3}$	1,52	к
MgL_2	$2,0 \cdot 10^{-3}$	$1,66 \cdot 10^{-6}$	$8,97 \cdot 10^{-4}$	12,67	н		$23,83 \cdot 10^{-3}$	3,55	к
MnL_2	$3,0 \cdot 10^{-3}$		$4,93 \cdot 10^{-3}$	3,80	к	$1,72 \cdot 10^{-6}$	$1,81 \cdot 10^{-3}$	22,3	с
ZnL_2	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$2,00 \cdot 10^{-6}$	$8,22 \cdot 10^{-4}$	10,19	н	$1,1 \cdot 10^{-6}$	$1,72 \cdot 10^{-3}$	2,46	с
CuL_2	$3,3 \cdot 10^{-4}$		$32,9 \cdot 10^{-3}$	0,06	к	$0,44 \cdot 10^{-6}$	$9,37 \cdot 10^{-4}$	4,01	н
CoL_2	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$2,20 \cdot 10^{-6}$	$7,89 \cdot 10^{-4}$	13,73	н	$1,68 \cdot 10^{-6}$	$1,40 \cdot 10^{-3}$	13,1	с
NiL_2	$2,0 \cdot 10^{-3}$	$1,80 \cdot 10^{-6}$	$1,23 \cdot 10^{-3}$	12,36	н	$1,1 \cdot 10^{-6}$	$3,11 \cdot 10^{-3}$	11,7	н
FeL_2	$1,1 \cdot 10^{-3}$		$8,97 \cdot 10^{-3}$	1,13	к	$1,54 \cdot 10^{-6}$	$2,20 \cdot 10^{-3}$	11,7	н
MoL_2	$8,5 \cdot 10^{-4}$		$19,7 \cdot 10^{-3}$	0,13	к		$47,62 \cdot 10^{-3}$	0,41	к
$\text{Cu}(\text{ac})_2$	$3,3 \cdot 10^{-5}$	$1,1 \cdot 10^{-6}$	3,92	1,15	с		13,19	0,67	к
$\text{Mo}(\text{ам})$	$3,3 \cdot 10^{-4}$	$1,39 \cdot 10^{-6}$	3,03	8,83	с		6,60	4,40	к
$\text{Mn}(\text{ac})_2$	$1,3 \cdot 10^{-6}$	$9,66 \cdot 10^{-7}$	1,15	0,014	б		8,80	0,02	к
$\text{Fe}(\text{ac})_2$	$3,3 \cdot 10^{-4}$	$2,75 \cdot 10^{-6}$	4,55	14,23	к		4,40	4,13	к
$\text{Ni}(\text{ac})_2$	$3,3 \cdot 10^{-5}$	$7,66 \cdot 10^{-7}$	3,17	0,88	с		14,66	0,70	к

В отношении ингибирования по акцептору электронов: кузагард, тацигарен, сетоксидим, тилт, MgL_2 , MoL_2 могут быть отнесены к конкурентным ингибиторам. Зенкор, лонтрел, базагран, раундап проявили бесконкурентное ингибирование редуктазы. Можно допустить, что ингибитор и акцептор электронов связываются с разными местами в активном центре фермента.

В отличие от пестицидов, у металлокомплексов лонтрела встречается смешанное ингибирование по акцептору электронов: ZnL_2 , CoL_2 , MnL_2 . Возможно, образуется комплекс фермент-ингибитор, к которому присоединяется субстрат. Комплексы NiL_2 , CuL_2 , FeL_2 проявили себя как неконкурентные ингибиторы НАДН-ОР по НТ. Данный тип ингибирования наблюдается при аллостерическом присоединении ингибитора, которое снижает активность фермента, а не его сродство к субстрату.

При этом может происходить присоединение функциональных групп субстрата и ингибитора к различным местам активного центра фермента.

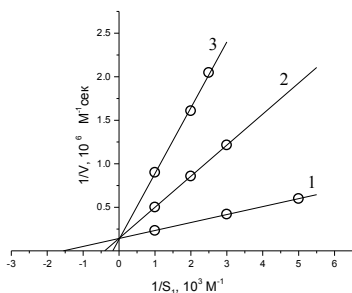


Рис. 6. Зависимость ингибирования НАДН-ОР лонтрелом (координаты Лайнуивера-Бэрка):
1. — без ингибитора.
Лонтрел: 2. — $0,3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; 3. — $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
 $C_{\text{НТ}} = 2,47 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $C_{\text{НАДН}_2\text{ОР}} = 1,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$;
 $C_{\text{НАДН}} = 1,0 \cdot 10^{-4} \div 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$;

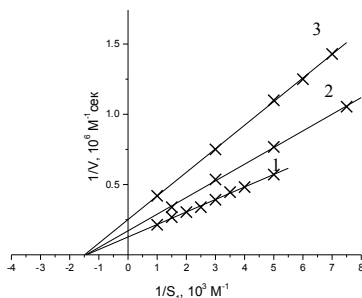


Рис. 7. Зависимость ингибирования НАДН-ОР раундапом (координаты Лайнуивера-Бэрка):
1. — без ингибитора.
Раундап: 2. — $1,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; 3. — $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.
 $C_{\text{НТ}} = 2,47 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $C_{\text{НАДН}_2\text{ОР}} = 1,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$;
 $C_{\text{НАДН}} = 2,0 \cdot 10^{-4} \div 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$;

§2. Действие солей металлов на процессы окисления, осуществляемые ферментными системами

Сравнение ингибирования НАДН-ОР солями металлов и соответствующими комплексами лонтрела показало, что соли Mg(II) , Zn(II) и Mn(II) - не ингибирует фермент (10^{-2} M), не зависимо от аниона. Комплексы этих металлов не взаимодействуют с НАДН (табл. 1).

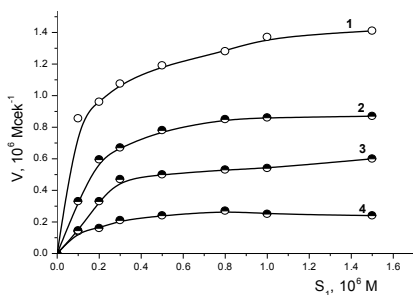


Рис. 8. Кинетические кривые зависимости скорости окисления НАДН-ОР от концентрации НАДН при постоянной концентрации НТ: 1. — без ингибитора; Ni(ac)_2 : 2. - $3,3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$; 3. - $3,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$; 4. - $1,7 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.
 $C_{\text{НТCl}} = 2,67 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $C_{\text{ОР}} = 2,83 \cdot 10^{-7} \text{ M}$;
 $C_{\text{НАДН}} = 1,0 \cdot 10^{-4} \div 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$;

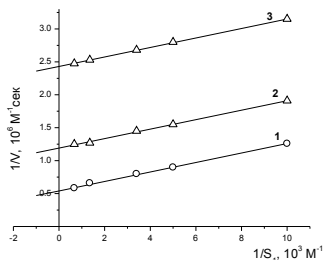


Рис. 9. Зависимость ингибирования НАДН-ОР Co(ac)_2 (координаты Лайнуивера-Бэрка): 1. — без ингибитора; Mn(ac)_2 : 2. - $1,3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$; 3. - $3,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.
 $C_{\text{НТ}} = 2,67 \cdot 10^{-3} \text{ M}$; $C_{\text{ОР}} = 2,83 \cdot 10^{-7} \text{ M}$;
 $C_{\text{НАДН}} = (1,0 \cdot 10^{-4} - 1,5 \cdot 10^{-3}) \text{ M}$;

Соли Fe(II), Mo(VI), Cu(II), Ni(II), Co(II) обратимо ингибируют НАДН-ОР в концентрациях от $3,3 \cdot 10^{-6}$ М (рис. 8). Комплексы с лонтрелом этих металлов проявляют высокую антиредуктазную активность (I_{50}), которая возрастает в ряду: $\text{Fe}(\text{асас})_2 = \text{Mo}(\text{ам})_6 < \text{Ni}(\text{ас})_2 = \text{Cu}(\text{ас})_2 < \text{Co}(\text{ас})_2$ (табл. 3). Соли ингибируют фермент в концентрации на один – три порядка меньше, чем соответствующие комплексы. Наибольшая разница у иона Co(II) и CoL_2 : $I_{50} = 1,33 \cdot 10^{-6}$ и $1,5 \cdot 10^{-3}$ М, соответственно. Минимальная разница – у иона Mo(VI): $I_{50} = 3,3 \cdot 10^{-4}$ М; MoL_2 имеет $I_{50} = 8,5 \cdot 10^{-4}$ М. Порядок возрастания величины I_{50} в случае комплексов обратен ряду для солей металлов: $\text{CuL}_2 < \text{MoL}_2 < \text{ZnL}_2 < \text{FeL}_2 = \text{L} < \text{CoL}_2 < \text{NiL}_2 = \text{MgL}_2 < \text{MnL}_2$.

При переходе от солей к комплексам (за исключением Fe – по НАДН и Mo – по НТ) изменяется характер ингибирования: CoL_2 ингибирует фермент неконкурентно, а соль – бесконкурентно (рис. 9), вероятно, в результате неспецифического взаимодействия с белковой матрицей вне активного центра фермента. Такое взаимодействие вызывает конформационные изменения на участке транспорта электрона, что ведёт к уменьшению скорости ферментативной реакции.

Комплексы CuL_2 , MoL_2 и FeL_2 конкурируют с НАДН за место связывания на ферменте (табл. 3). CuL_2 ингибирует окисление НАДН почти в 20 раз менее интенсивно, чем Cu(II), тогда как MoL_2 – в 80 раз, по сравнению с Mo(VI). Наблюдаемые отличия обусловлены различиями в структуре соединений, изменением характера связи металл-лиганд. В составе комплекса с лонтрелом металл не способен действовать как свободный катион. Ингибирующим компонентом здесь служит сам комплекс, либо один или оба лиганда, связанные в комплекс. Величины K_i по НАДН изменяется в ряду: соль > лиганд > комплекс. Следовательно, антиредуктазная активность возрастает при переходе от соли к лиганду и к комплексу. В случае Co и Ni, наоборот, прочность связи фермента с ингибитором возрастает при переходе: соль < лиганд < комплекс.

Соли металлов конкурентно ингибируют НАДН-ОР по акцептору электронов. По величинам констант ингибирования они располагаются в ряд: Mo(VI) > Fe(II) > Ni(II) > Cu(II) > Co(II). Для комплексов в ряду активности по K_i : $\text{MnL}_2 > \text{CoL}_2 > \text{FeL}_2 = \text{NiL}_2 > \text{CuL}_2 > \text{MgL}_2 > \text{ZnL}_2 > \text{MoL}_2$ наблюдается практически та же закономерность: прочность связывания токсиканта-ингибитора возрастает при переходе: соль < лиганд < комплекс. В поведении солей определяющим фактором является ион металла и строение его электронных оболочек, поэтому рассмотренные соли металлов не конкурируют с НАДН за место связывания. В комплексах металлов доминирующим влиянием обладает лигандное окружение. Пиридиновое кольцо имеет строение близкое к НАДН, т.е. способно занять место субстрата на белке, а

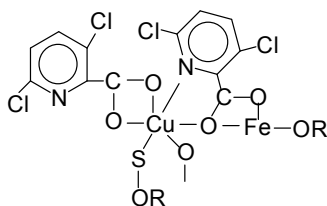


Схема 2

Коэффициент Хилла $h = 1$ для рассмотренных солей металлов – к ферменту присоединяется только один ион. У комплексов и токсикантов – ингибиторов – потен-

циальных лигандов, $h = 1,5 \div 2,0$. Две молекулы токсиканта или его металлокомплекса связываются с одной молекулой фермента. Поскольку токсиканты легко взаимодействуют с металлами, видимо, одним местом присоединения их на ферменте является ион металла, входящий в состав активного центра (в форме $2Fe-2S$ кластера), а вторым – аминокислоты белковой матрицы.

Глава 6. ВЛИЯНИЕ ЭКОТОКСИКАНТОВ НА ПРОНИЦАЕМОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

Мембраны клеток специально созданы природой для сохранения внутриклеточного химического состава, и для защиты организмов от ксенобиотиков, находящихся в окружающей среде. Транспорт ЗВ через мембраны является первичной и лимитирующей стадией, предшествующей химическому взаимодействию токсиканта с биологическими молекулами.

§1. Кинетика переноса токсикантов через липосомальные мембраны

Процесс массопереноса ЗВ через мембрану внутрь клетки изучался нами на липосомах, начинённых ε -АТФ (рис. 10) по тушению флуоресценции. Для количественной характеристики нами была создана математическая модель процесса,

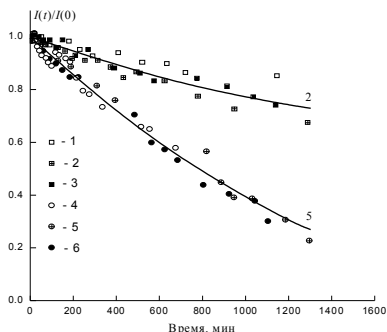


Рис. 10. Изменение интенсивности флуоресценции инкапсулированной ε -АТФ от времени воздействия лонтрела (точки 1-3) и CoL_2 (точки 4–6). Концентрация ε -АТФ = $1 \cdot 10^{-4}$ М.

Концентрация гербицидов в рабочей кювете: $1 \cdot 10^{-4}$ (1, 4); $1 \cdot 10^{-3}$ (2, 5); $1 \cdot 10^{-2}$ (3, 6) М. Точки – данные эксперимента.

Сплошная линия – расчёт. Скорость переноса пестицида через липидную мембрану $j(t)$, описывается уравнением:

Согласно которой концентрация ε -АТФ внутри липосом $[E]$ связана с экспериментально измеряемой интенсивностью флуоресценции $I(t)$ соотношением: $[E] = [E_0] \cdot I(t)/I(0)$, где $I(0)$ – начальная величина свечения в ячейке до прибавления токсиканта - тушителя. Скорость переноса пестицида через липидную мембрану $j(t)$, описывается уравнением:

$$\frac{K_{k/o} \cdot [E]^2 + [E_0]}{K_{k/o} \cdot [E]^2} \cdot \frac{d[E]}{dt} = -j(t)$$

в котором, $K_{k/o}$ – константа комплексообразования ЗВ с ε -АТФ.

Расчёт удовлетворительно описывает экспериментальные данные. Скорость переноса пестицида через липидную мембрану не зависит от градиента концентраций ($j = \text{const}$), не зависит от исходной концентрации, оставаясь постоянной при изменении концентрации от 10^{-2} до 10^{-4} М, определяется исключительно свойствами липидного бислоя и строением молекулы ксенобиотика. Токсиканты, характеризующиеся высокими значениями констант комплексообразования обладают меньшей скоростью проникновения через мембраны клеток.

Наибольшую скорость переноса проявили сетоксидим ($j = 41,2 \cdot 10^{-8} \text{ Мс}^{-1}$) и кузагард ($j = 14,7 \cdot 10^{-8} \text{ Мс}^{-1}$) (табл. 4). Эти соединения обладают сложным строением, имеют в своём составе значительные по размерам органические жирные фрагменты. Близкими оказываются скорости переноса базагра и лонтрела. Зенкор – самый

активный комплексообразователь, имеет наименьшую скорость переноса. Значения констант массопереноса имеют обратную корреляцию со значениями $K_{K/O}$ с ε -АТФ – с их способностью к образованию комплексов с функциональными молекулами живой клетки: АТФ, НАДН, ДНК, РНК. По величинам $K_{K/O}$ с ε -АТФ ряд активности выглядит: $CuL_2 = CoL_2 > \text{зенкор} > NiL_2 > \text{лонтрел} > \text{кузагард} > FeL_2 > \text{раундап} > \text{сетоксидим} > \text{базагран} > MoL_2 > \text{тачигарен} > \text{тилт}$. По величине скорости массопереноса, рассмотренные соединения выстраиваются в ряд: $\text{зенкор} < \text{лонтрел} < \text{базагран} < CoL_2 < \text{раундап} < \text{кузагард} < CuL_2 < \text{сетоксидим}$.

Таблица 4. Значения констант массопереноса ЗВ через липосомальную мембрану

Названия веществ	J·10 ⁸ , М·с ⁻¹			ср. J·10 ⁸ , М·с ⁻¹	K _{бет/Н2О}	K _{бет/Н2О}
	исходные концентрации				20 мин	18 мес
	10 ⁻² , М	10 ⁻³ , М	10 ⁻⁴ , М			
зенкор	2,1	7,6	2,8	2,143±3,4	66,57	100,4
лонтрел	4,1	5,2	2,8	4,13±1,6	2,56	3,38
кузагард	14,7	14,7	14,5	14,67±3,0	0,30	0,77
раундап	10,9	13,8	9,7	10,87±1,2	0,46	2,27
сетоксид.	41,2	41,2	41,2	41,18±1,4	7,83	25,00
базагран	5,9	6,1	5,1	5,9±2,76	52,19	70,43
CuL ₂	18,0	15,6	21,2	18,04±1,1		
CoL ₂	7,0	6,2	8,0	7,03±5,6		

Причиной обратной зависимости является высокая комплексообразующая способность рассмотренных пестицидов: в процессе диффузии внутри липидного бислоя происходит их химическое взаимодействие с фосфатидилхолином, которое определяет скорость переноса ЗВ внутрь липосомы. Видимо, пестицид образует комплекс с фосфатидилхолином состава 1:1 (а) или 1:2 (б), согласно схеме 3:

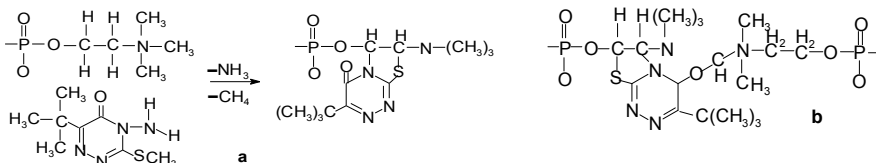


Схема 3

Важно, что скорость проникновения комплексов металлов через биологическую мембрану значительно выше, чем у исходного пестицида: у CoL_2 почти в 2 раза, а у CuL_2 почти в 5 раз.

§2. Кинетика процесса биоаккумуляции ЗВ в модельных системах

Константы распределения между *n*-октанолом и водой (K_{oct/H_2O}) пестицидов и металлокомплексов представлены в табл. 4.

Максимальную липофильность проявляют зенкор и базагран ($K_{oct/H_2O} = 66,57$ и $52,19$). Наименьшую: раундап и кузагард ($K_{oct/H_2O} = 0,46$ и $0,30$). Процесс перехода пестицидов из воды в октанол – неполярную фазу характеризовался во времени несколькими стадиями с различными скоростями переноса (рис. 11). В первые 20 ми-

нут скорость у всех соединений максимальна, затем она существенно падает, но и после 18 месяцев наблюдения процесс накопления ЗВ в неполярной фазе продол-

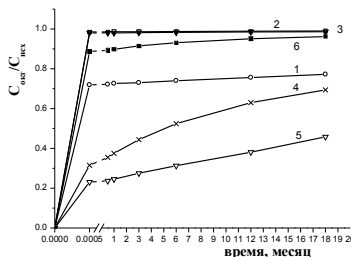


Рис. 11. Кинетические кривые накопления ЗВ в октаноле:
1. — лонтрел; 2. — зенкор; 3. — базагран; 4. — раундап.

жается. По величинам констант скорости процесса перехода ЗВ в жирную фазу ($k = V/[c]$) на первом участке — k_I рассмотренные пестициды располагаются в ряд активности: зенкор ~ базагран > сетоксидим > лонтрел > раундап > кузагарт.

На основании всей совокупности полученных данных можно сделать вывод, что комплексообразование техногенных токсикантов является наиболее общим механизмом их действия, присущим ЗВ различного химического строения.

Глава 7. ФОРМЫ ПРОЯВЛЕНИЯ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ НА УРОВНЕ ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ

Выше показано, что техногенные токсиканты образуют комплексные соединения с биологическими молекулами. Причём, каждое ЗВ характеризуется своей константой комплексообразования. Представляло большой интерес сравнить константы комплексообразования полученные на молекулярном уровне с физиологическими эффектами, проявляемыми токсикантами на живых организмах.

§1. Связывание АТФ как первичный механизм ингибирования прорастания семян

Поскольку, большинство рассматриваемых нами техногенных ЗВ являются гербицидами, предназначенными для обработки растений, исследование их влияния на физиологические эффекты многоклеточных организмов мы начали с рассмотрения фитотоксических свойств. В табл. 5 представлены данные по влиянию пестицидов

Таблица 5. Подавление прорастания семян и образования хлорофилла в двудольных растениях (горох «Улановский юбилейный») при действии пестицидов и их константы комплексообразования с ϵ -АТФ

Пестицид, [10^{-3} M]	зен кор	лонт- рел	куза- гарт	сеток- сидим	база- гран	тачи- гарен	тилт
$K_{\kappa/\phi} \cdot 10^{-3}, M^{-1}$	26,5 $\pm 3,3$	15,9 $\pm 2,0$	9,7 $\pm 0,5$	5,0 $\pm 0,3$	4,7 $\pm 0,4$	1,1 $\pm 0,04$	0,8 $\pm 0,06$
подав. прораст%	92 $\pm$ 4	90 $\pm$ 1	80 $\pm$ 10	75 $\pm$ 5	60 $\pm$ 10	55 $\pm$ 5	45 $\pm$ 10
[хлрф]·10 ⁻³ , мл ⁻¹	8,37	8,48	20,46	22,20	23,15	87,5	87,5

на прорастание семян двудольных растений. Прослеживается чёткая зависимость: с убыванием константы комплексообразования падает гербицидный эффект, вызываемый пестицидом. Та же тенденция прослеживается во влиянии пестицидов на прорастание семян злаковых культур.

Все комплексы металлов в концентрации 10^{-8} – 10^{-4} М ингибируют прорастание семян гороха и пшеницы (рис. 12). Фитотоксические свойства металлокомплексов несколько отличны от свойств самого лонтрела.

Присутствие металлов: Co, Ni, Cu увеличивает ингибирующее действие лонтрела; Fe и Mn его несколько снижают. Это находится в соответствии с величинами $K_{к/о}$ данных соединений с АТФ.

Опрыскивание вегетирующих растений пестицидами приводит к различным повреждениям: хлороз, некроз листьев, скручивание, полегание стеблей пшеницы, отмирание точки роста. Проращивание семян в присутствии АТФ и АТФ+пестицид показало, что лонтрел, зенкор, раундап, тилт на горохе; лонтрел, базагран, сетоксидим, тачигарен на пшенице проявляют сильно выраженную АТФ-зависимость. Всхожесть семян в среде АТФ+пестицид на 20-50% выше, чем без АТФ.

Содержание хлорофилла в образцах гороха и пшеницы на 5-7 день после обработки (табл. 5) демонстрирует обратную зависимость от $K_{к/о}$ соответствующего пестицида.

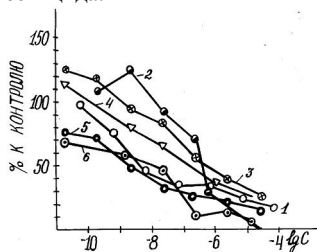


Рис. 12. Влияние комплексов гербицида лонтрел на прорастание злаковых культур:

1. – лонтрел; 2. – CuL₂; 3. – FeL₂; 4. – MnL₂; 5. – NiL₂; 6. – CoL₂.

Во всех сериях экспериментов, на двудольных и злаковых растениях чётко прослеживаются закономерности: а) максимально активны – зенкор и лонтрел; б) активны – раундап, кузагард, сетоксидим; в) слабо активны – базагран, тачигарен, тилт. Полученные данные показывают, при обработке семян гербициды проникают внутрь семени и сохраняются в проростках, что приводит к ингибированию прорастания. Медленное прорастание с биохимической точки зрения означает, что в клетках снижен уровень АТФ, а его увеличение коррелирует с выходом из состояния покоя. Таким образом, комплексование с АТФ – нарушение энергетического

метаболизма или возникновение энергодефицита, реализуется *in vivo* в живой клетке, и являются причиной фитотоксического (в данном случае – гербицидного) действия техногенных ЗВ.

§2. Изменение жизненных циклов и популяционной динамики почвообитающих коллембол под влиянием гербицидов

Обитающие в почве организмы оказываются в тесном контакте с ЗВ. Коллемболы (ногохвостки) – широко распространены и многочисленны. Совместно с другими обитателями почв они создают её плодородие; влияют на степень гидроморфности и характер процессов гумификации. При однократном внесении гербицидов изменяется поведение коллембол: раундап увеличивает двигательную активность, кузагард – затомаживает. Затем активность восстанавливается. При многократном внесении пестицидов на субстрат скорость роста численности популяции отстает от контроля (рис. 13). Максимальное увеличение численности микроартропод после воздействия раундапа наблюдается в районе 25-35, а кузагарда – 45-55 суток. В этот период, общее число особей (при минимальных концентрациях гербицида) сопоставимо с контролем. Степень воздействия препаратов возрастает при увеличении концентрации, что выражается в снижении численности микроартропод. Во

всех концентрациях в присутствии кузагарда рост численности происходит существенно медленнее, чем в присутствии раундапа. После 27 суток для раундапа и 48

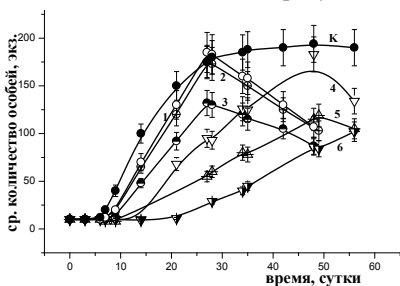


Рис. 13. Изменение численности популяции коллембол *Folsomia candida* при многократном внесении раундапа и кузагарда: раундап: 1. - 10^{-4} М; 2. - 10^{-3} М; 3. - 10^{-2} М; кузагард: 4. - 10^{-4} М; 5. - 10^{-3} М; 6. - 10^{-2} М. К – контроль.

яиц в кладках: под влиянием кузагарда (50% от контроля, 10^{-2} М) в большей степени, чем раундапа (60% от контроля, 10^{-2} М). Продолжительность эмбрионального периода в присутствии раундапа 6 дней = контролю; кузагарда – возрастает в 1,5÷2 раза. Кузагард снижает долю выхода ювенильных особей в 2,3 раза (при 10^{-2} М); раундап – в 1,2÷1,5 раза. Кратность увеличения численности популяции через месяц после обработки раундапом (при 10^{-2} М) падает в 2 раза; под воздействием кузагарда - более чем в 5 раз (10^{-2} М); в 2 раза (10^{-3} М), и только при 10^{-4} М близка к контролю. Раундап оказывает большее влияние на первое поколение, кузагард - на второе.

Таблица 6. Показатели размножения коллембол при многократном внесении ЗВ. ([1] - Балабина И.П., 1991. [2] - Пономарёва О.Н., 1990.)

Показатели	Кузагард <i>F. candida</i>		Раундап <i>F. candida</i>		Лонтрел [1] <i>F. candida</i>		Базагран [2] <i>C.denticulata</i>	
	Конт	10^{-2} М	Конт	10^{-2} М	Конт	10^{-2} М	Конт	10^{-2} М
Сроки появления первых кладок, дни	14±0	42±0	3±0	3±0	10±0,6	48±1,5	6±2	8±0
Количество яиц в кладках (экз.)	100±1	50±1	51±10	30±20	16,3±4,9	5,3±1,8	12±48	12±3
Продолжительность эмбрион. развития (дни)	7±0	10±3	6±4	6±0	7,7±0,3	13,3±1,6	9±1	9±1
Доля выхода ювенильных особей, %	77±0	33±20	60±17	40±18	100±0	78±0	80±0	50±0
Кратность увеличения численности через месяц	16±0	3±1,5	18±8	9±7	16±0	0,9±0	6,3±0	0,5±0

Комплексы оказывают существенное воздействие на общее число взрослых и молодых особей коллембол *Xenylla grisea* (*Hypogastruridae*) при однократной обработке во всех рассмотренных концентрациях (рис. 14). Рост концентрации увеличи-

суток для кузагарда (10^{-4} и 10^{-3} М) наблюдается резкое снижение численности микроартропод. В варианте с раундапом высокая смертность коллембол совпадает с периодом линьки ювенилов первого поколения (21 – 28 суток); с кузагардом - второго поколения (48 – 54 суток). В конце наблюдения под воздействием раундапа численность возросла в 9-11; кузагарда – 10-13; в контроле - в 19 раз.

При многократном внесении препаратов изменяются показатели процесса размножения (табл. 6). Наблюдается задержка появления первых кладок до 42 дней (14 в контроле) при внесении кузагарда (10^{-2} М). Снижается количество

вает эффект. При 10^{-2} М количество коллембол в 2 раза ниже, чем при 10^{-4} М – за 5 недель. При равных исходных концентрациях действие CuL_2 существенно сильнее, чем MnL_2 : в 3,1 раза при 10^{-4} М; в 2,6 раз при 10^{-3} М. Аналогично - при 10^{-2} М.

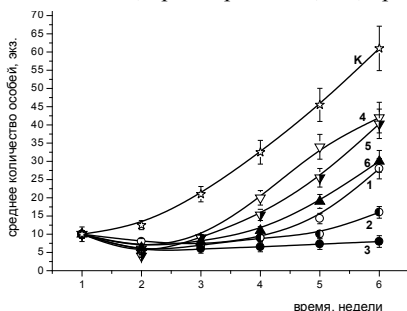


Рис. 14. Изменения общей численности коллембол *Xenylla grisea* после однократного внесения CuL_2 , MnL_2 : Концентрации - CuL_2 : 1 - 10^{-4} М; 2. - 10^{-3} М; 3. - 10^{-2} М. MnL_2 : 4. - 10^{-4} М; 5. - 10^{-3} М; 6. - 10^{-2} М. К – контроль.

Комплексы ЗВ-ДНК, как показано в Главе 4, изменяют вторичную структуру двойной спирали. Сопоставление показателей размножения микроартропод (табл. 6) с $K_{\text{к/обр}}$ ЗВ с ϵ -ДНК и ϵ -РНК (табл. 2) демонстрирует корреляцию молекулярных параметров с эффектами, проявляемыми живыми организмами. По-видимому, рассмотренные ЗВ изменяют строение и функции ДНК и РНК коллембол, нарушают процесс репликации. Это является причиной нарушения репродуктивных функций организма и приводит к снижению численности потомства. Величины $K_{\text{к/обр}}$ токсичных химических соединений с нуклеотидами (АТФ, ДНК) коррелируют с биологической активностью, проявляемой ЗВ – степенью воздействия на жизненные циклы почвообитающих коллембол.

Таким образом, ингибирование энергетического метаболизма, нарушение процесса репликации, в результате комплексообразования, являются причиной снижения численности почвенных микроартропод при соприкосновении с гербицидами.

§3. Связь процессов комплексообразования и токсичности ЗВ в отношении гидробионтов

Известно, что ЗВ поступают и накапливаются в природных водных средах, достигают живых организмов, заставляя их противостоять или адаптироваться оказываемому воздействию. Токсичность растворов в отношении люциферазы, выделенной из светящихся бактерий *Benekea harvey*, возрастает пропорционально концентрации пестицидов: нарастание токсичности максимальное у зенкора, наиболее слабое - у тачигарена (рис. 15). Тачигарен (10^{-1} М) нетоксичен: - индекс токсичности $T < 19\%$. Базагран во всей области концентраций слабо токсичен: $24 < T \leq 40\%$. Высокая токсичность наблюдалась при концентрации зенкора $5 \cdot 10^{-3}$ М; лонтрела - 10^{-2} М; раундапа - 10^{-1} М. Изменения коэффициента токсичности ($K, \%$) в отношении инфузории *Tetrahymena pyriformis* от концентрации ЗВ – аналогичны. Во всех концентрациях наибольшую токсичность проявляет зенкор. Токсичность пестицидов

По убыванию воздействия на численность микроартропод, изученные вещества выстраиваются в ряд: $\text{CuL}_2 > \text{лонтрел} > \text{кузагарт} > \text{раундап} > \text{базагран} > \text{MnL}_2$, который коррелирует с их $K_{\text{к/обр}}$ с ϵ -АТФ. Почти в 400 раз $K_{\text{к/обр}}$ CuL_2 выше, чем $K_{\text{к/обр}}$ MnL_2 – во столько раз CuL_2 превосходит MnL_2 по прочности связи с АТФ.

По сравнению с лонтрелом, $K_{\text{к/обр}}$ CuL_2 больше в 54,6; и в 7 раз меньше у MnL_2 . Биологическая активность CuL_2 также выше, чем у MnL_2 . В большей степени MnL_2 влияет на численность взрослых особей, а CuL_2 – на численность потомства, прирост молоди самый низкий (10^{-4} М).

уменьшается в ряду: зенкор > лонтрел > раундап > базагран > тачигарен. Значения концентрации, приводящей к 50%-ной токсичности (EC_{50}) полученные на люциферазе бактерий и инфузориях представлены в табл. 7.

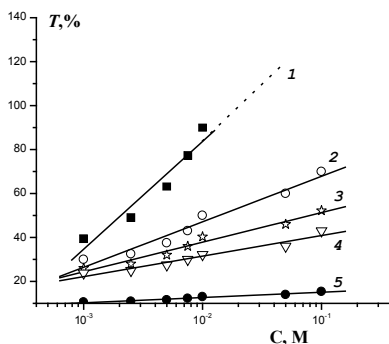


Рис. 15. Изменение токсичности в отношении *Benekea harvey* от концентрации пестицидов: 1. - зенкор; 2. - лонтрел; 3. – раундап; 4. - базагран; 5. – тачигарен.

Величина EC_{50} в случае Cu-, Co-, Ni-, MoL_2 – на порядок и более; Mn-, ZnL_2 – в 1,5 – 2 раза ниже, чем у исходного лиганда (табл. 7). Только у MgL_2 EC_{50} выше лонтрела. На модельной тест-системе – бактериальной люциферазе из *Benekea harvey* in vitro контролируется иннактивация одного фермента. Наблюдается корреляция между снижением люциферазной активности и энергодефицитом, создаваемым ЗВ. В опыте in vivo инфузории *Tetrahymena pyriformis* проявляют резистентность, характерную для многоклеточного живого организма.

Таблица 7. Значения EC_{50} пестицидов и комплексов металлов, М

пестицид	<i>Benekea harvey</i> , люцифераза штамм В1 7	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	комплекс	<i>Benekea harvey</i> , люцифераза штамм В1 7	<i>Tetrahymena pyriformis</i>
зенкор	$(4,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$	$(2,4 \pm 0,4) \cdot 10^{-3}$	CuL_2	$(1,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$
лонтрел	$(8,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-3}$	$(5,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-3}$	CoL_2	$(3,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$
раундап	$(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-2}$	$(1,3 \pm 0,3) \cdot 10^{-2}$	NiL_2	$(5,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$(3,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$
базагран	$(2,9 \pm 0,1) \cdot 10^{-2}$	$(5,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-2}$	MoL_2	$(7,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	$(7,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$
тачигар.	$(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-1}$	$(2,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-1}$	MnL_2	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$	$(5,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$
MgL_2	$(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-2}$	$(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-2}$	ZnL_2	$(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$	$(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$

Токсичность комплексов металлов проявляется при концентрациях на один - два порядка более низких, чем любого из рассмотренных пестицидов (табл. 7). Аналогично параметры EC_{50} пестицидов и комплексов металлов указывают, что токсичность последних на один - два порядка выше, чем у всех пестицидов и исходного лиганда – лонтрела, в частности. В области изученных концентраций, как

пестициды, так и комплексы металлов располагаются в одной и той же последовательности по убыванию степени токсичности.

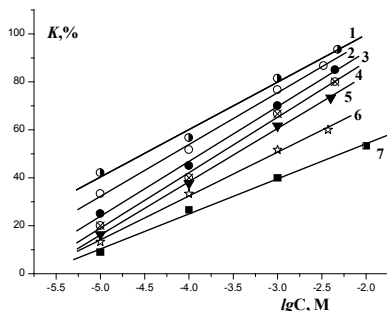


Рис. 16. Зависимость коэффициента токсичности в отношении инфузории *Tetrahymena pyriformis* от логарифма концентрации комплексов металлов:

1. - CuL_2 ; 2. - CoL_2 ; 3. - NiL_2 ; 4. - MoL_2 ; 5. - MnL_2 ; 6. - ZnL_2 ; 7. - MgL_2 .

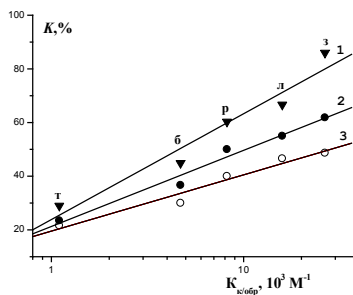


Рис. 17. Изменение степени токсичности пестицидов в отношении *Tetrahymena pyriformis* в зависимости от их константы комплексообразования с АТФ:

Концентрации: 1. - 10^{-1}M ; 2. - 10^{-2}M ; 3. - 10^{-3}M . 3 – зенкор; л – лонтрел; р – раундап; б – базагран; т – тачигарен.

Изменение токсичности растворов ЗВ в отношении *Tetrahymena pyriformis* (рис. 17), свидетельствует о наличии корреляции между снижением репродуктивной способности от $K_{\text{к/обр}}$ техногенного токсиканта с ДНК. Зависимость прямо пропорциональная: токсичность веществ с низкими значениями $K_{\text{к/обр}}$ – наименьшая, а у веществ с высокими значениями константы, с высокой способностью к комплексообразованию – наибольшая. Наблюдается корреляция эффекта токсичности по отношению к бактериям *Benekea harvey* и инфузориям *Tetrahymena pyriformis* от величины энергодефицита, создаваемого комплексами металлов. Обе зависимости прямо пропорциональные и имеют место при концентрациях $10^{-1} - 10^{-7}\text{M}$.

Количественную характеристику обнаруженной корреляции даёт сравнение токсикантов при одной концентрации - EC_{50} (рис. 18). Приводимая закономерность связывает энергодефицит клеток, вызываемый ЗВ с определяемой величиной $K_{\text{к/обр}}$ с АТФ, с эффектом токсичности, проявляющимся на тест-объекте. Использование установленной зависимости для прогноза величины EC_{50} на основании известного значения $K_{\text{к/обр}}$ позволяет предположить, что EC_{50} кузагарда, сетоксидима и тилта должны составлять $1,0 \cdot 10^{-2}$; $3,0 \cdot 10^{-2}$ и $1,1\text{M}$, соответственно. Аналогично, рис. 19 иллюстрирует закономерность, связывающую ферментативную активность бактерий и репродуктивную способность инфузорий с величиной энергодефицита, создаваемого в клетке организма металлокомплексами.

Выявленная закономерность изменения величины токсичности ЗВ от его константы комплексообразования с АТФ подтверждается литературными данными на большом количестве разных видов многоклеточных организмов (рис. 18). Она может быть использована в качестве экспресс-теста для определения токсичности ЗВ по отношению к гидробионтам.

Проведённые нами исследования показывают, что при попадании ЗВ техногенного происхождения (пестициды или комплексы металлов) внутрь организма про-

исходит его химическое связывание с микроэлементами, нуклеотидами, ферментами, липидами. Образуются прочные комплексы ЗВ с АТФ, НАДН, НАДН-ОР, ДНК,

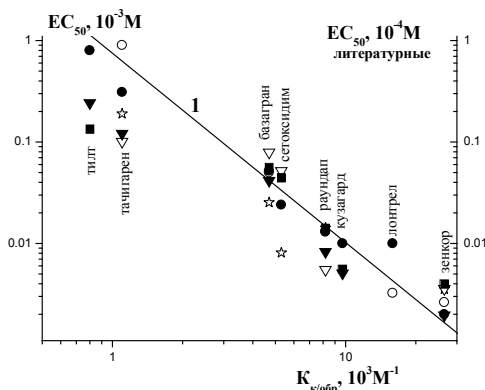


Рис. 18. Корреляционная зависимость между величиной EC_{50} при воздействии пестицидов, определённой на *Tetrahymena pyriformis* от величины энергодифицита клетки, создаваемого загрязняющим веществом:

1 – закономерность изменения EC_{50} от $K_{k/обр}$;
 ○ – экспериментальные точки;
 литературные данные: ● – зоопланктон – *Daphnia magna*; рыбы – ☆ – *Lepomis macrochirus* ювенилы до 0,4 см, ▽ – *Oncorhynchus mykiss* ювенилы; ▼ – *Oncorhynchus mykiss* взрослые; ■ – *Cyprinodon variegatus* взрослые.

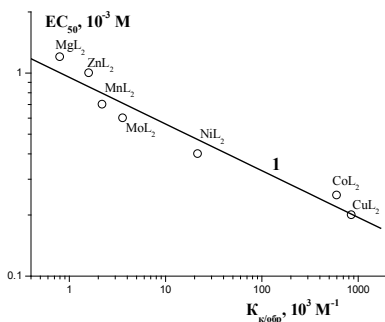


Рис. 19. Закономерность изменения EC_{50} комплексов металлов в отношении инфузорий *Tetrahymena pyriformis* от их констант комплексообразования.

характеризующиеся $K_{k/обр}$.

Возникновение биоорганических комплексов приводит к нарушению энергетического метаболизма в организме. Возникает энергодифицит клетки, который приводит к её гибели.

На организменном уровне, такой внутримолекулярный механизм действия ЗВ выражается в форме снижения ферментативной активности бактерий, репродуктивной способности инфузорий, микроартропод, подавления прорастания, роста растений.

§4. Корреляция способности к образованию комплексов ЗВ с ДНК с их генотоксичностью

Установленная нами способность ксенобиотиков к образованию комплексов с ДНК и РНК (Глава 4), безусловно, сопряжена с серьёзными последствиями для всего организма. Прочные химические связи ЗВ с ДНК могут индуцировать генные мутации, - это вызывает необходимость более глубокого исследования. Результаты определения генотоксичности на тесте Эймса *Salmonella*/микросомы приведены в табл. 8. На штамме TA100 кузагард проявил слабую прямую мутагенную активность (мутагенный индекс МИ=1,8). Все пестициды проявили мутагенность на штамме TA98. Самым активным мутагеном оказался зенкор, - прямой мутагенный эффект (МА-) = 25,2. Остальные пестициды обнаружили слабый прямой мутагенный эффект, с величиной МИ (МА- < 10). По величине МИ, ЗВ располагаются в ряд активности: зенкор>базаран>лонтрел = кузагард > раундап > тагипарен > сетокси-

дим. Зенкор, базагран, лонтрел и кузагард вызывают у *Salmonella typhimurium* на штамме TA98 мутации ДНК типа сдвига рамки считывания.

Таблица 8. Величины мутагенных индексов ЗВ
 MA^+ - с метаболической активацией; MA^- - без метаболической активации.

Пестициды	штаммТА98		штамм ТА100		ком пле ксы	штаммТА98		штаммТА100	
	мутагенный индекс					мутагенный индекс			
	MA ⁺	MA ⁻	MA ⁺	MA ⁻		MA ⁺	MA ⁻	MA ⁺	MA ⁻
контроль	1	1	1	1	MoL ₂	3,3	5,2	1,4	1,5
зенкор	3,2	25,2	1,1	1,3	FeL ₂	4,2	2,8	1,5	1,1
лонтрел	5,5	2,0	0,4	1,1	CoL ₂	3,0	1,8	1,4	1,1
кузагард	5,3	2,0	1,6	1,80	NiL ₂	5,2	4,3	1,2	1,4
раундап	5,3	1,8	1,7	1,1	CuL ₂	3,1	1,6	1,4	1,2
сетоксид.	3,0	0,9	0,7	0,9	MnL ₂	2,5	2,0	0,8	1,2
базагран	2,3	2,2	1,5	1,5	ZnL ₂	4,3	1,7	1,5	1,23
тачигар.	2,0	1,5	1,4	1,5	MgL ₂	2,3	3,8	1,8	1,3

Пестициды активно метаболизируются монооксигеназной системой печени крыс (табл. 8). Метаболиты зенкора оказались менее генотоксичны, чем исходное ЗВ. Метаболиты лонтрела, кузагарда, раундапа и тацигарена проявили мутагенные активности, заметно возросшие по сравнению с прямой активностью этих веществ. В результате метаболической активации их МИ возрастают в 1,5-2,9 раза. Генотоксичность раундапа, сетоксидима и тацигарена выявилась только после метаболической активации, - они оказались промутагенами. При этом МИ раундапа возрастает в 3, а сетоксидима - в 3,3 раза. Рассмотренные пестициды вызывают у штамма TA98 мутации типа сдвига рамки считывания. Величина МИ изменяется в ряду: зенкор > лонтрел > кузагард > раундап > сетоксидим > базагран > тацигарен.

Все комплексы металлов с лонтрелом (табл. 8) проявили прямую активность на штамме TA98. Максимальная активность выявлена у MoL_2 (МИ=5,2). За MoL_2 следуют NiL_2 > MgL_2 > FeL_2 > (L) > MnL_2 . Не обнаружили прямой мутагенной активности CoL_2 , ZnL_2 и CuL_2 .

После метаболической активации все металлокомплексы проявили генотоксичность с МИ < 10. Мутагенная активность метаболитов MoL_2 и MgL_2 снизилась по сравнению с пробами без метаболической активации, у FeL_2 , NiL_2 , MnL_2 , - возросла. CoL_2 , ZnL_2 и CuL_2 обнаружили только промутагенный эффект. Мутагенная активность метаболитов в два раза выше, чем у комплексов. По промутагенной активности они выстраиваются в ряд: (L) ~ NiL_2 > ZnL_2 ~ FeL_2 > MoL_2 ~ CuL_2 ~ CoL_2 > MnL_2 ~ MgL_2 . Активность метаболитов NiL_2 близка к исходному лонтрелу, у MnL_2 и MgL_2 - существенно ниже.

Комплексы MoL_2 , NiL_2 , FeL_2 и MgL_2 проявили прямую мутагенную активность выше, чем у лонтрела. У MnL_2 слабая активность близкая к лонтрелу. Генотоксичность CuL_2 , CoL_2 и ZnL_2 ниже, чем у лонтрела и проявляется только после метаболической активации. Только у NiL_2 метаболическая мутагенная активность соизмерима с лонтрелом. У других комплексов гербицида лонтрел метаболическая мутагенная активность в 1,5-2 раза меньше, чем у лонтрела.

Установленные величины МИ сравнили с величинами $K_{к/обр}$ этих соединений с ДНК и РНК, приведенными в табл. 2. Как следует из рис. 20, в изменении величин

МИ прослеживается корреляция с последовательностью уменьшения значений их $K_{к/обр}$ с ДНК. Изменение $K_{к/обр}$ ЗВ с РНК происходит симбатно с $K_{к/обр}$ этих соединений с ДНК, поэтому зависимость МИ от $K_{к/обр}$ с РНК имеет аналогичный вид.

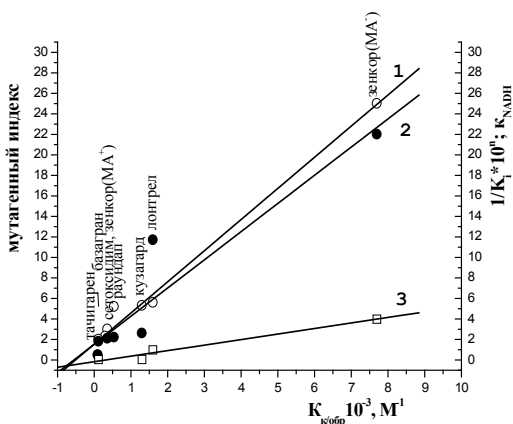


Рис. 20. Зависимость мутагенного индекса пестицидов от их констант комплексообразования с ДНК (1). Изменения $K_{к/обр}$ пестицидов с НАДН (2) и констант ингибирования НАДН-ОР (K_i) пестицидами (3) от $K_{к/обр}$ пестицидов с ДНК:

Кривая 1 — $\bigcirc$ — экспериментальные точки: зенкор, лонтрел, кузагард, раундап, сетококсим, базагран; Кривая 2 — $\bullet$, по оси $y = K_{к/обр} \cdot 10^{-1}, M^{-1}$ с НАДН, табл. 1;

Кривая 3 — $\square$, по оси $y = 1/K_i \cdot 10^{-4}, M^{-1}$ табл. 3.

тер (рис. 20, кривая 2) изменений: $K_{к/обр}$ ϵ -НАДН от $K_{к/обр}$ с ϵ -ДНК; и значений МИ от величины $K_{к/обр}$ пестицида с ϵ -ДНК. Обе зависимости прямолинейные, имеющие практически одинаковый угол наклона. Кривая 3 характеризует изменение константы ингибирования ($1/K_i$) НАДН-ОР по НАДН: увеличение МИ происходит симбатно с нарастанием прочности комплекса фермент-ингибитор.

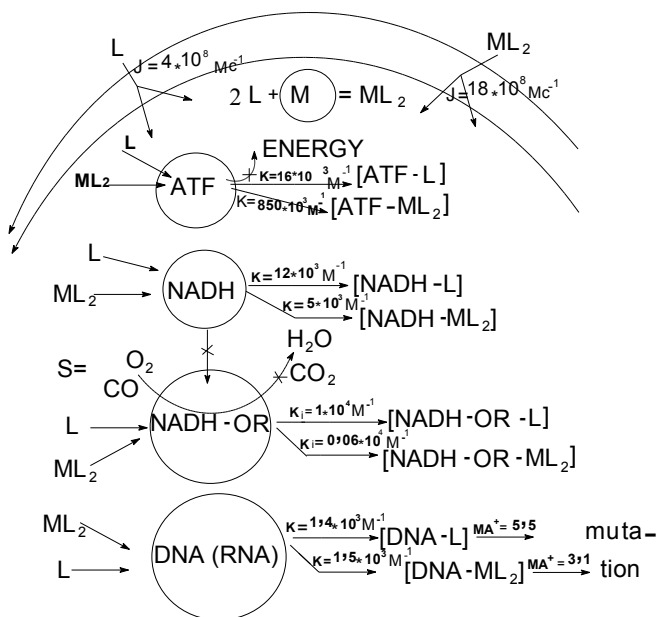
Поскольку, ингибирование ферментативной активности происходит за счёт встраивания пестицида в место присоединения НАДН к ферменту, т.е. такими ЗВ, которые являются донорами электронов, следовательно, вещества, обладающие электроно-донорными свойствами, будут обладать более высокой мутагенной активностью: чем выше электроно-донорная способность ЗВ, тем выше его мутагенный индекс. Выявленная корреляция МИ с комплексообразованием отражает химические свойства пестицидов и их металлокомплексов, их электроно-донорную природу, способность к образованию ковалентных и координационных связей, то есть возникновению стойких химических соединений — комплексов.

Мутагенное действие ЗВ коррелирует с их способностью образовывать устойчивые комплексы с ДНК *in vitro*. Комплексы MoL_2 , NiL_2 , MgL_2 , FeL_2 проявляют более высокую прямую мутагенную активность, чем исходный гербицид лонтрел. Таким образом, пестициды являются генетически опасными веществами. Образую-

У млекопитающих и других высших организмов на проявление мутагенного и канцерогенного эффекта влияет ряд факторов, прежде всего метаболическая активность монооксигеназ, функционирующих в присутствии НАДФН или НАДН. Прямые мутагены не нуждаются в метаболической активации, но, попадая в организм, подвергаются воздействию монооксигеназной системы. В случае промутагенов эта система выполняет роль активирующей, в случае прямых мутагенов она детоксицирует их, — снижает частоту мутаций. При сравнении полученных результатов с приводимыми в Главе 5 данными по ингибированию НАДН-ОР, одного из ферментов монооксигеназной системы, обнаруживается идентичный харак-

щиеся конъюгаты пестицидов с другими неорганическими и органическими загрязнителями окружающей среды способны усиливать мутагенные и канцерогенные свойства, т.е. их применение представляет реальную угрозу для экосистем и для человека.

Вероятный биологический механизм разветвлений направлений действия техногенных токсикантов внутри клетки, представленный на схеме 4, обобщает всю сумму полученных результатов (Главы 3-7).



зенкор > лонтрел > кузагард > раундап > сетоксидим > базагран > тачигарен > тилт;
CuL₂ > CoL₂ > NiL₂ > L ≈ FeL₂ ≈ ZnL₂ ≈ MoL₂ >> MgL₂ ≈ MnL₂

Схема 4. Разветвление направлений действия техногенных токсикантов внутри клетки.

Причиной изменений, проявляемых растениями (гербицидный эффект, в отношении прорастания семян и вегетирующих растений, уровень хлорофилла), насекомыми; водными (ингибирование люциферазы, снижение прироста клеток), почвообитающими (изменение жизненных циклов, снижение репродуктивных функций) организмами, является подавление энергетического метаболизма и возникновение **энергодефицита** клетки, вследствие взаимодействия техногенного токсиканта с АТФ. Происходит нуклеотидное «разветвление» направлений действия ЗВ: образуются комплексы с а) мононуклеотидом - (АТФ); б) динуклеотидом - (НАДН); в) полинуклеотидами - (ДНК, РНК).

Прерывание энергетических процессов и цепей транспорта электронов, блокирование функционирования цикла трикарбоновых кислот и фотосинтетических процессов – всё это результат энергодефицита, возникающего из-за образования комплексных соединений ЗВ с нуклеотидами.

Техногенные токсиканты ингибируют систему функционирования окислительно-восстановительных ферментов. В этом ключевом «узле» жизнедеятельности любого организма токсическое действие ЗВ претерпевает второе - «ферментативное разветвление» (Схема 4): а) связывание ЗВ с металлами, составляющими свободный пул внутри клетки и необходимыми для синтеза металл-содержащих ферментов; б) комплексообразование ЗВ с динуклеотидом НАДН, являющимся коферментом многих ферментов; в) собственно ингибирование активности фермента (ов), взаимодействие возможно как в активном центре, так и вне его. В результате, в организме блокируются процессы жизнедеятельности, осуществляемые этими ферментами. С другой стороны, организм не может окислить и «вывести» токсины. Таким образом, вторым механизмом формирования токсичности техногенных ЗВ является **ингибирование окислительно-восстановительных процессов** – блокирование цепи переноса электрона в организмах разных трофических уровней.

Химические ЗВ связываются в комплексные соединения с ДНК и РНК, происходит третья - «генетическое разветвление» (Схема 4) токсического действия: а) соединения с высокими $K_{к/обр}$ встраиваются между пуриновыми и пиримидиновыми основаниями, нарушают нативность двойной спирали ДНК и (или) РНК, гидролизуют фосфодиэфирные связи. В результате происходит образование полиплоидных сорняков у растений. Рост численности микроартропод отстает от контроля: (задерживается появление кладок; снижается количество яиц в кладках; возрастает продолжительность эмбрионального периода, падает кратность увеличения численности популяции). У гидробионтов происходит снижение репродуктивной способности; б) ЗВ проявляют прямой мутагенный эффект - все пестициды на штамме TA98 *Salmonella typhimurium* вызывают мутации типа сдвига рамки считывания. **Мутагенная активность** изученных ЗВ коррелируют с величинами их $K_{к/обр}$ с ДНК и РНК; в) все ЗВ, обладающие комплексообразующими свойствами, являются промутагенами - проявляют генотоксичность после метаболической активации.

Глава 8. РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ОБЕСПЕЧЕНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ

Высокая степень загрязнения окружающей природы (Глава 1) настоятельно требует использования достижений современной науки и техники для контроля состояния объектов окружающей среды и очистки сбрасываемых стоков и газовых выбросов промышленных производств. Поэтому значительная часть нашей работы была посвящена нами изучению возможности практического использования способности токсикантов к комплексообразованию.

§1. Использование комплексообразования для извлечения хлорсодержащих ароматических соединений из водных объектов

ХОС и пестициды, в частности, как показано в Главах 3 – 4, образуют комплексные соединения. Кроме того, в Главе 1 указывалось, что для очистки стоков или водных объектов окружающей среды, необходимо извлекать из них ЗВ и повторно использовать в производственных целях, либо утилизировать. Нами была изучена возможность, используя способность ЗВ к комплексообразованию, извлечь

пестицид (2,4-Д = 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота), краситель (исследовалось 14 красителей), ХОС: хлорбензол (I); 2-хлор-4-нитрофенол (II), из водных растворов, технических стоков, смесей органических соединений с помощью фторсодержащих растворителей (перфтордекалина и перфторсилола). Методом электронной спектроскопии было показано, что соединения I и II образуют химические связи с молекулами перфтордекалина, в результате чего могут быть извлечены из раствора в воде или ацетонитриле. Таким образом, перфтордекалин может быть использован для извлечения ХОС из воды. Извлечь с помощью перфтордекалина пестицид 2,4-Д или какой-либо краситель нам не удалось.

§2. Разработка метода экспресс определения общей токсичности воды

Проведённые нами исследования показали, что токсиканты-загрязнители окружающей среды: пестициды и металлы, ХОС, фенолы образуют с нуклеотидами комплексные соединения. Константы комплексообразования с АТФ коррелируют с токсичностью ЗВ, проявляемой в отношении многоклеточных живых организмов. Полученные корреляции можно использовать для определения токсичности растворов, содержащих смеси неизвестных веществ. В этом случае, следует говорить об обобщённой концентрации и, обобщённой константе связывания (K_{Σ}).

Измерение выполняется быстро, метод пригоден для определения общей токсичности воды (питьевой, сточной, объектов окружающей среды, водных вытяжек из твёрдых отходов и т.д.). Обладает высокой информативностью. Возможно проведение анализов в промышленных и полевых условиях. Может быть востребован: промышленными предприятиями, экологическими службами, СЭС, водозаборами, лабораториями МЧС, частными лицами. Используются доступные и дешёвые реагенты. Рассчёт экономической эффективности, выполненный на основании документа «Прейскурант. Тарифы на услуги, оказываемые Федеральным государственным учреждением «Специализированная инспекция аналитического контроля по Центральному региону», показывает, что использование предлагаемого метода позволяет снизить затраты на проведение одного определения ~ на 90%.

Уникальность предлагаемой разработки состоит в получении количественной информации о суммарной токсичности проб, аналогичной отклику живых организмов (инфузорий, дафний, светящихся бактерий, микроартропод), но без трудностей, связанных с использованием живых тест-систем. Возможность применения данного вида корреляций в качестве экспресс-метода определения токсичности водных объектов окружающей среды, проверялась нами в процессе мониторинга среднего течения реки Волги (Глава 8 §5). Величины K_{Σ} , как правило, соответствовали токсичности, определяемой на светящихся бактериях или инфузориях.

§3. Биоразложение экотоксикантов в природной среде

В Главе 5 нами показано, что техногенные токсиканты, характеризующиеся способностью к комплексообразованию, ингибируют окисляющие ферменты. Кроме того, (Глава 7 §3 и 4) ингибирование активности ферментных систем, в частности люциферазы, приводит к токсичности в отношении одно- и многоклеточных живых организмов. Поэтому мы рассмотрели возможность разложения ЗВ в многокомпонентной экологической системе.

Исследовалось поведение ЗВ под действием комплекса живых организмов активного ила (АИ) и солнечного света, т.е. в условиях, моделирующих природные водоёмы. Испытывали гербицид лонтрел (образцы 1-3), его медный комплекс (4),

сточные воды полупромышленного производства лонтрела (5). Токсикологическую оценку проб проводили методом биотестирования на культурах *Tetrahymena pyri-*

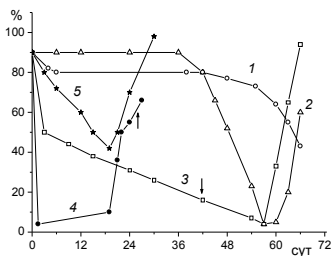


Рис. 21. Динамика изменения токсичности образцов АИ, содержащих лонтрел (1, 2, 3), CuL_2 (4), пробу промышленного стока (5): Обработка АИ НММ: 1. — нет; 2. — 6 часов; 3. — 18 часов. Лонтрел = $1,22 \cdot 10^{-3}$ М; пром. сток = $1 \cdot 10^{-3}$ М; CuL_2 = $0,4 \cdot 10^{-3}$ М. Стрелки - повторная обработка.

ственному изменению состава АИ и увеличению регистрируемого видового разнообразия: биоценоз представлен 2 типами низших растений (бактерии, водоросли) и 5 классами беспозвоночных (реснитчатые, саркодовые, жгутиконосцы, нематоды, коловратки). В образце, обработанном мутагеном в течение 18 ч, увеличивалось регистрируемое число видов в биоценозе АИ по сравнению с образцом, подвергнутому 6-часовой обработке (20 и 15 видов, соответственно): заметно увеличивалась численность коловраток, идентифицировались серобактерии, раковинные амёбы. Данное сообщество успешно сопротивлялось антропогенной нагрузке: токсичность образца, обработанного 18 ч, понижалась по сравнению с 6-часовой обработкой. При больших временах экспозиции (60-70 суток) наблюдалось снижение видового разнообразия. Через 18 мес. доминирующей остаётся одна линия зелёных одноклеточных водорослей - *Euglena viridis*, как наиболее устойчивый вид.

АИ во всех азотенках, кроме контрольного, был подвергнут обработке мутагеном с целью получения активации инцистированных живых организмов.

При 6-часовой обработке НММ (образец 2) токсичность оставалась высокой (~90 %) в течение 36 суток, затем резко падала, и к 56 суткам образец был практически нетоксичен. После 18-ти часовой обработки (образец 3) токсичность сразу падала до 50 %, затем монотонно снижалась, и к 60 дню наблюдения образец становился нетоксичным. Уменьшение токсичности после 18-ти часовой обработки по сравнению с 6-часовой инкубацией с НММ может объясняться изменением количественного соотношения видового состава АИ в результате мутагенного воздействия. Под действием мутагена происходит инцистирование большого количества находящихся в спящем состоянии микроорганизмов. Таким образом, мутагенная обработка АИ является весьма перспективным способом обработки АИ для улучшения видового разнообразия, и повышения окислительных свойств, в частности в отношении трудно разлагаемых пестицидов. Такая обработка должна приводить, в конечном итоге, к улучшению экологического состояния водных объектов.

formis и *Benekia harvey*.

Присутствие лонтрела, его медного комплекса или промышленного стока (1-5) в исследуемых концентрациях оказывает острое и хроническое действие на культуру инфузорий. Токсичность образца 1 сохранялась высокой (~80 %) в течение 2 месяцев наблюдения (рис. 21). До начала эксперимента в контрольном образце АИ идентифицированы 9 видов простейших организмов: представители водорослей, амёб, прикрепленных инфузорий, флагеллаты. После введения загрязнителя происходило уменьшение числа регистрируемых видов до 7 (табл. 9, столбец 1).

Обработка мутагеном (НММ) — N-нитрозо-N-метилмочевинной приводила к каче-

В течение 0-20 суток во всех образцах, как контрольном, так и подвергнутых мутагенной обработке (6 и 18 часов экспозиции), концентрация лонтрела и CuL_2 не изменяется (рис. 22). После 18-20 суток концентрация лонтрела в образцах 1-3 на-

Таблица 9. Гидробиологический состав активного ила

Организм	Б/обр. НММ	НММ, 6 ч	НММ 18 ч	Повтор НММ 6 ч	Повтор НММ 18 ч
водоросли (Algae)					
<i>Chlorella vulgaris</i>		+			
<i>Euglena viridis</i>					+
<i>Scenedesmus obliquus</i>	+	+	+	+	
<i>Ulothrix sp.</i>	+	+	масса	+	+
<i>Zooglea ramigera</i>					един-но
<i>Нумчатые</i>					един-но
простейшие (Protozoa)					
<i>Amoeba sp.</i>				+	+
<i>Arcella vulgaris</i>			+		
<i>Bodo globosus</i>		+	+	+	+
<i>Centropyxis aculeata</i>	+		+		
<i>Euglypha laevis</i>				+	
<i>Flagellata sp.</i>			+	масса	
<i>Gromia neglecta</i>			+	+	
<i>Lacrimaria sp.</i>		+		+	
<i>Litonotus anser</i>		+		+	
<i>Oicomonas socialis</i>				+	+
<i>Pamphagus hyalinus</i>	+	+			+
бактерии (Bacterium)					
<i>Bacillus sp.</i>					+
<i>Beggiatoa minima</i>			+		+
инфузории (Infusoria)					
<i>Aspidisca costata</i>			+		+
<i>Aspidisca lynceus</i>		+	+		
<i>Chilodonella uncinata</i>		+			
<i>Lelane monostyla</i>			+	+	+
<i>Tetrotrox sp.</i>		+	+		
<i>Thuricola similis</i>	+				
<i>Vorticella alba</i>		+	+		
коловратки (Rotatoria)					
<i>Cephalodella gibba</i>			+	+	+
<i>Cephalodella forticula</i>			+		+
<i>Colurella sp.</i>		+	+	+	+
<i>Notommata sp.</i>			+	+	+
<i>Rotaria neptunia</i>			+		+
<i>Rotaria rotatoria</i>	+	масса	+	+	+
реснитчатые (Gastrotricha)					
<i>Brachionus angularis</i>		+			
<i>Chaetonotus brevispinosus</i>	+		+		

чинала снижаться. Уменьшение содержания токсиканта в образцах 2 и 3 (АИ с мутагеном) происходило быстрее, чем в контроле. Приблизительно через 40 суток от начала опыта вновь устанавливалось стационарное состояние.

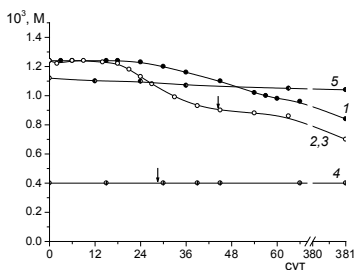


Рис. 22. Кинетические кривые био разложения образцов:

1, 2, 3. – лонтрел; 4. - CuL₂; 5. – пром. сток производства лонтрела. Обозначения и концентрации как рис. 21.

Таким образом, лонтрел относится к трудно био разлагаемым ХОС. Время обработки стоков в промышленных очистных сооружениях обычно составляет всего 8-11 часов. За это время возможно образование комплексов лонтрела с металлами – ещё более устойчивых, чем исходный лиганд.

§4. Фотохимическое окисление техногенных токсикантов

Поскольку, рассмотренные токсиканты не разлагаются сообществом организмов АИ, необходимо было разработать эффективные способы их окисления. Для этой цели нами был использован ультрафиолет (УФ) (Скурлатов Ю.И., 1986). Энергия кванта жёсткого УФ излучения с $\lambda=283$ нм (длина волны поглощения лонтрела) приблизительно в 1,5 раза больше энергии связи C=N (~260 кДж/моль), что достаточно для разрыва устойчивого пиридинового кольца.

4.1. Технология изготовления кварцевых ртутно-аргоновых ламп

Для проведения экспериментов по фоторазложению пиридиновых соединений были изготовлены ртутно-аргоновые лампы Ø 8 и 30 мм оригинальной конструкции (Васильев Г.К., Кирьянов В.И. 1994). Их достоинством является значительный ресурс времени работы, по сравнению с промышленными. Лампы Ø 8 мм дают возможность больших вариантов технологического использования в пакете по несконьку штук в одном защитном кварцевом кожухе при создании водопогружных УФ установок.

4.2. Кинетические закономерности и технологические параметры процесса разложения токсикантов под действием УФ света

Разложения гербицида лонтрела при УФ облучении в течение 8 часов без дополнительных воздействий или при перемешивании инертным газом не происходило (рис. 23). Барботирование током воздуха или кислорода способствует притоку кислорода в зону реакции. При действии жёсткого УФ излучения, одним из продуктов – фотохимической трансформации кислорода является озон. Молекула озона

на под действием УФ диссоциирует на электронно-возбуждённый атом кислорода и молекулу кислорода в синглетном состоянии, которые, обладая высокой окисляющей способностью, приводят к разложению гербицида. В результате одновременного воздействия УФ, кислорода, воздуха и перемешивания за 24- 25 часов реак-

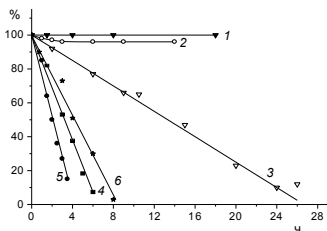


Рис. 23. Изменение концентрации лонтрела от времени УФ облучения: 1. - без барботирования; 2. - аргон, лампа ДРБ-8; 3. - воздух, лампа ДРБ-8; 4. - озон, лампа ДРБ-8; 5. - воздух, лампа ДРШ-1000; 6. – O_2 , H_2O_2 , лампа БРА-15.

8 происходит за 24 часа, в то время как при использовании лампы ДРШ-1000 на разложение необходимо всего 3-3,5 часа. Однако, образцы, содержащие продукты полного окисления гербицида, продолжали обладать токсичностью в отношении светящихся бактерий. Но помещённые в аэротенк с АИ они успешно перерабатывались сообществом микроорганизмов. Полученные растворы уже не проявляли токсичности в отношении *Benekea harvey* и *Tetrahymena pyriformis* ни для одной из исследовавшихся концентраций.

4.3. Продукты разложения гербицида лонтрел

В Главе 8 §3 показано, что способность ЗВ к комплексообразованию повышает их устойчивость к биотрансформации и УФ разложению. Более того, установленный факт (п.4.2.), что продукты окисления гербицида лонтрел обладают собственной токсичностью, вызвал необходимость их определения и дальнейшего изучения форм проявления комплексообразования в реальной экологической системе.

Судя по электронным спектрам водного раствора лонтрела до и после облучения, за 24-38 часов в спектрах анализируемых образцов не происходит ни сдвига максимума полосы поглощения, ни образования дополнительных полос. Процесс разложения происходит в одну стадию без образования побочных продуктов в значительных концентрациях. При этом pH раствора изменялся с 4,25 до 3,81.

ИК спектры продуктов разложения лонтрела принципиально отличаются от исходного вещества. Интенсивная полоса поглощения (п.п.) $\nu(C=O)$ при 1710 см^{-1} расщепляется на четыре полосы: 1780 , 1740 , 1715 и 1690 см^{-1} , что может быть объяснено распадом исходного 3,6-ДХПК, и образованием других соединений со следующими фрагментами: п.п. при 1780 см^{-1} может относиться к $\nu(C=O)$ в группировке $\begin{array}{c} \text{---C---C---} \\ | \quad \quad | \\ \text{O} \quad \quad \text{O} \end{array}$; при 1740 см^{-1} – к $\nu(C=O)$ при сопряжении связи $C=O$ с ненасыщенной $C=C$; п.п. при 1715 см^{-1} относится к ассиметричному колебаниям двух $C=O$; и, наконец, п.п. при 1690 см^{-1} относится к колебанию $C=O$, связанной с ароматическим кольцом. Существенные изменения проявились в области низких частот 800 -

500 см⁻¹, где лежат п.п. $\nu(\text{C}_{\text{ar}}-\text{Cl})$ и $\nu(\text{C}-\text{Cl})$. Произошло перераспределение интенсивностей полос и сдвиг по частоте. В спектре продукта разложения появляются очень интенсивные п.п. при 605, 530 см⁻¹, которые могут относиться к колебаниям C-Cl и C_{ar}-Cl, что вполне объяснимо в связи с возможностью накопления ХОС.

Таблица 10. Вещества, полученные при УФ разложении лонтрела

№	Соединение	13 ч. УФ облуч.		38ч. УФ облуч.	
		в долях от IV	$\cdot 10^{-5}$, М	в долях от IV	$\cdot 10^{-6}$, М
IV	3,6-дихлорпиколиновая к-та	1,00	25,0	1,00	5,00
VI	трихлоробутанол	0,18	4,87	1,32	7,14
VII	2,3,5-трихлоропиридин	0,12	3,16	-	-
V	4-хлоро- бензоил хлорид	0,11	3,00	0,50	2,74
X	2,6-дихлоро-3-нитро-пиридин	0,11	2,74	-	-
II	дихлоробутанол	0,06	2,00	0,26	1,75
I	4-хлоро-1,2- диметил-бензол	0,05	1,71	0,17	1,16
III	3-хлоро-бензоил хлорид	0,06	1,65	0,28	1,54
VIII	трихлоробутанол (изомер)	0,02	0,54	0,26	1,41
IX	гексахлороциклогексан	0,02	0,34	0,32	1,62

По данным масс-хроматографического анализа (табл. 10) после 13 часов УФ облучения в реакционной смеси, кроме самого лонтрела, идентифицировано ещё 9 веществ (I-X), но преобладающим остаётся лонтрел (IV). Помимо замещённых пиридинов (первичных продуктов трансформации), основными продуктами являются замещённые хлорбензолы и хлорбутанолы. Образование последних объяснимо разрывом пиридинового кольца в результате вторичных процессов окисления. Увеличение времени облучения приводит к возрастанию их концентрации. После 13 часов УФ облучения в реакционной смеси соединение VI присутствует в концентрации $4,87 \cdot 10^{-5}$ М, что в 5 раз меньше, чем концентрация лонтрела в то же время. Концентрации других идентифицированных веществ в 10-50 раз меньше, чем исходное соединение. К 38 часам УФ облучения полностью разлагаются промежуточные хлорпиридиновые соединения (VII и X). Концентрация лонтрела в этот момент составляет $5 \cdot 10^{-6}$ М. Существенно возрастают концентрации других продуктов распада: гексахлороциклогексана – гербицид линдан (IX концентрация $\leq 1,62 \cdot 10^{-6}$ М) – почти в 25 раз и трихлорбутанола (VIII концентрация $\leq 1,41 \cdot 10^{-6}$ М и VI – концентрация $\leq 7,14 \cdot 10^{-6}$ М). Трихлорбутанол становится преобладающим в смеси. В конечной пробе его количество превосходит лонтрел.

Накопление техногенных токсикантов в реках, морях и океанах хорошо известно. Поэтому сравнивали кинетику окисления лонтрела в дистиллированной, искусственно приготовленной морской и речной воде из реки Клязьмы. Вид кинетических кривых изменяется при переходе от дистиллированной к морской или речной воде (рис. 24). В дистиллированной воде под действием УФ концентрация лонтрела изменяется с постоянной скоростью и доходит до нуля к 22 часам наблюдения. В реальных растворах течение первых 10 часов скорость исчезновения лонтрела (исходная концентрации $1,42 \cdot 10^{-3}$ М) выше, чем в дистиллированной воде. Затем она

существенно уменьшается и становится ниже, чем в дистиллированной. К 45 часам наблюдения концентрации лонтрела в обоих образцах остаются значительными:

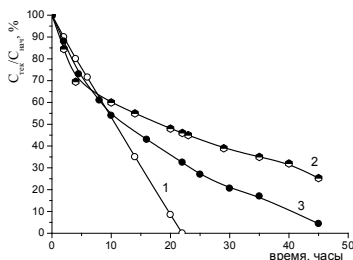


Рис. 24. Кинетика изменения концентрации лонтрела под действием УФ излучения и при барботировании кислородом при 25⁰С:

1. – дистиллированная вода; 2.– искусственная морская вода; 3. - вода из реки Клязьмы. Лонтрел = $1,42 \cdot 10^{-3}$ М.

$3,6 \cdot 10^{-4}$ М (25% от исходной концентрации) в морской воде и $0,6 \cdot 10^{-4}$ М (4,4%) – в речной. Скорость фотоокисления лонтрела в речной воде оказалась выше, чем в морской. В начальный период времени в растворе одновременно протекают два параллельных процесса: разложение лонтрела и связывание его в комплекс с металлами. Концентрация металлов в морской воде выше, чем в речной. Поэтому концентрация образующихся комплексов в ней выше. Под действием УФ комплексы разлагаются с меньшей скоростью, чем лонтрел (Глава 8 §3). Этим объясняется значительное накопление ЗВ в морях и океанах.

§5. Оценка загрязнения среднего течения реки Волги

На основании результатов, полученных в §4 и §3 Главы 8, мы поставили вопрос: есть ли условия для протекания процессов комплексобразования в реальной крупной водной экосистеме. Необходимо было определить наличие токсикантов:

Таблица 11. Содержание в Волге загрязняющих веществ, величины ПДК и обобщенной константы связывания (K_{Σ})

Токсикант	Конц. мг/л	Рыбохоз. ПДК мг/л	K_{Σ} эксперим.
ПХБ	н/обн.	10^{-3}	$2 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1}$ (1-3% токсичности)
ДДТ	$2 \cdot 10^{-5}$	10^{-4}	
ГХЦГ	$2 \cdot 10^{-5}$	0,03	
метафос	н/обн.	0,02	
нефтепродукты	$\leq 0,2$	0,05	
фенол	$\leq 0,005$	0,001	
NO_2^-	$\leq 0,3(\text{N})$	0,02(N)	
NH_4^+	$\leq 0,3(\text{N})$	0,4–1,0(N)	
Cu^{+2}	$\leq 0,01$	0,001	$15 \div 20 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1}$ (30-40% токсичности)
Co^{+2}	-	0,01	
Zn^{+2}	$\leq 0,01$	0,01	
H_2O_2	$\leq 10^{-5} \text{ М}$	-	

пестицидов, в том числе ХОС (способность к комплексобразованию показана в предыдущих Главах), металлов; а так же опробовать разработанный (Глава 8 §2) метод определения токсичности. С этой целью был проведён мониторинг Волги в районе Куйбышевского водохранилища и г. Казани. Измеряли содержание пести-

цидов (ДДТ – 4,4'-дихлордифенилтрихлорметилметан – инсектицид; ПХБ – пентахлорбензиловый спирт – фунгицид «бластин»; ГХЦГ – гексахлорциклогексан – инсектицид «линдан»; метафос – О,О диметил-О-(4-нитрофенил)тиофосфат – инсектицид), ХОС и фосфорорганических соединений, ионов металлов. Одновременно выполняли токсикологические эксперименты на *Benekea harvey*, *Tetrahimena piriiformis* и ветвистоусом рачке *Daphnia magna* (табл. 11).

1. Содержание пестицидов в воде в анализируемый период не превышало ПДК. Обнаружены продукты УФ разложения: лонтрела (ГХЦГ) и метафоса (тиофенол). Оба – более токсичны, чем исходные препараты.

2. Концентрации: Cu(II) превышала ПДК; Mn(II) варьировала ~ 20-40 мкг/л и в донных отложениях ~ 0,1 вес %.

3. В живой и погибшей рыбе концентрации ХОС – не значительны. Содержание в тканях рыб С, Cl, Р – ниже ПДК; ионов Mn сравнимо с Fe.

4. Стандартные гидрохимические показатели – в пределах нормы: содержание кислорода не ниже 80% насыщения, значения pH среды монотонно возрастало во времени от $7,5 \pm 0,4$ в мае до $8,35 \pm 0,1$ в июле. БПК от 2,5 до 3,5 мг О₂/л, содержание нитратов ≤ 4 мкг/л.

Таблица 13. Содержание фенола и его хлорпроизводных, мкг/л; результаты биотестирования воды в районе водозабора Казани (1а – первый подъём, 1б – питьевая)

Вещество – ПДК	01.10		10.10		02.11		09.11		23.11		25.11		15.12		20.12	
	1 а	1 б	1 а	1 б	1 а	1 б	1 а	1 б	1 а	1 б	1 а	1 б	1 а	1 б	1 а	1 б
Фенол - 1																
4-нитроф. - 2					28,8						2,4					
2,4-динитроф. - 30											1,5					
2-хлорфенол - 1				5,7	12,4		30,6									
2-нитроф. - 60			0,7		2,2			0,9								
2,6-диметилф. - 250																
4-хлор,3-метилф.			5,8								3,2					
2,4-дихлорф. - 2					7,1						16,4					
трихлорфенол - 4	1,4		6,1	8,8							42					
пентахлорф. - 10	9,4		6,9	6,9					2,8			37	40	37,4	24	33
<i>T.pyriformis</i> (К)	1,2	1,1	1,2	1,0	0,9	0,8	0,98	0,9								
<i>D.magna</i> (молодь)	63	59	88	84	84	0	80	75	90	86			88	80	90	75
<i>B. harvey</i> (%)	30	40	28	28	25	6	37	37	20	25						

5. В большинстве проб воды, взятых в Куйбышевском водохранилище в районе Казани, в отношении *Benekia harvey* и *Tetrahimena piriiformis* не отмечалось ни острой, ни хронической токсичности. Выживаемость *Daphnia magna* в опыте и контроле, а также скорость прироста численности клеток инфузорий в анализируемых пробах и в контроле отличались не более, чем на 30 %. Токсичность была обнаружена исключительно, в районе сброса в Волгу стоков очистных сооружений Казани. Величина обобщённой константы связывания (K_2) колебалась в пределах 2-8, при разведении пробы в 100 раз, т.е. $K_{к/обр}$ составляла $\sim 4,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}$. Судя калибровке – токсичность приблизительно 40% (по *Benekea harvey*). Для контроля были сделаны смеси из обнаруженных веществ, в тех же концентрациях, определённые K_2 указаны в табл. 11. Они демонстрируют, что уровень токсичности отобранных проб определяют ионы меди. Несколько завышенные значения токсичности, определённые с помощью измерения тушения флуоресценции, по сравнению с био-тестами,

связано с тем, что в пробах воды могли находиться не токсичные, но способные к комплексообразованию с АТФ вещества.

Мониторинг показал, что в наибольшей концентрации присутствуют фенол и металлы. Хлорпроизводные фенола появляются в воде при её хлорировании, выполняемом на водозаборных станциях и очистных сооружениях. Пентахлорфенол (ПХФ), 4-хлортриметилфенол, (ТХФ) 2,4,6-трихлорфенол, практически не включаются в биологический круговорот. Наиболее токсичен ПХФ. Пестициды и ХОС проявляют высокую комплексообразующую способность, образуют комплексы с нуклеотидами и нуклеиновыми кислотами (Глава 4 §3), что приводит к возникновению мутаций (Глава 7 §4).

Таблица 12. Содержание фенола (ф) и его производных, мкг/л, в волжской воде в районе очистных сооружений Казани (Г/о – точка отбора: 2. – 1 км выше ГОС; 3. – в месте сброса; ниже ГОС: 4. – 1 км; 5. – 2 км).

Дата		фенол	4-нитроф.	2,4-динитроф.	2-хлорф.	2-нитроф.	2,6-диметилф.	4-хлор-3-метилф.	2,4-дихлорф.	ТХФ	ПХФ
Октябрь 1991	2	-	2,3	19,7	-	-	-	-	-	-	99,6
	3	497,3	103,0	182,7	78,9	-	-	-	-	6372,0	-
	4	-	182,7	-	-	-	27,2	31,8	-	44,2	87,5
	5	29,7	1,1	0,8	11,0	0,07	0,12	-	-	-	136,8
Январь 1992	2	-	-	-	10,6	0,14	-	-	-	-	1,8
	3	-	-	-	89,3	0,24	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	1,8	0,9	-	-	-	11,6	13,2
	5	-	-	-	-	0,26	-	-	-	-	-
Февраль 1992	2	-	-	36,6	-	8,1	25,2	129,8	-	33,1	128,6
	3	126,4	-	18,5	171,1	8,3	-	43,8	-	8,7	5,2
	4	-	-	2,1	7,3	-	-	10,3	17,9	-	1,4
	5	-	-	0,8	-	0,3	-	-	-	-	-
Март 1992	2	33,1	-	2,1	14,9	2,8	18,4	38,6	-	227,0	-
	3	232,2	54,2	18,0	100,4	-	70,7	837,1	2,2	44,6	28,7
	4	7,9	0,7	0,3	2,6	4,9	-	9,5	0,5	-	-
	5	-	-	0,2	-	0,6	6,9	18,5	-	-	-
Апрель 1992	2	23,8	-	-	83,6	3,6	15,1	-	-	84,8	84,8
	3	112,4	53,8	-	129,5	-	5,1	33,0	-	210,6	109,7
	4	107,9	55,9	-	38,9	-	-	-	-	132,1	143,3
	5	-	-	-	3,4	-	0,9	13,7	-	70,5	157,8
Май 1992	2	-	-	-	21,8	2,3	-	-	-	28,1	17,8
	3	14,4	-	41,6	-	9,7	76,9	236,3	-	127,8	29,0
	4	-	-	-	24,9	4,1	-	-	-	42,2	4,4
	5	-	-	-	26,5	3,0	-	-	-	-	-

Результаты анализа проб сырой воды, отобранных в районе питьевого водозабора представлены в табл. 13. Наблюдается значительное повышение содержания хлорпроизводных (по 2-хлорфенолу до 30, по 2,4-дихлорфенолу до 8, по ПХФ до 4 ПДК). В пробах, отобранных 10 октября и 23 ноября, после процедуры водоподготовки (обработки хлором) питьевая вода содержала 2- и пентахлорфенолы, в то время как в сырой волжской воде они отсутствовали. Очевидно, замещение произошло в процессе водоподготовки. Это свидетельствует о несоответствии существующей системы оценки качества воды изменяющимся антропогенным нагрузкам. Волжская вода в районе городского водозабора как до, так и после очистки не обладает острой токсичностью. Хроническая токсичность, определенная с приме-

нием в качестве биотеста *Daphnia magna*, была обнаружена в питьевой воде лишь 02 ноября 1992 года. Отмечается тенденция к ухудшению биологических показателей воды в процессе её очистки, о которой свидетельствует закономерное снижение потомства дафний в пробах питьевой воды по сравнению с сырой волжской водой. С помощью метода тушения флуоресценции токсичности не выявлено. Величина обобщённой константы связывания суммы ЗВ (K_{Σ}) колебалась в пределах 40%. Между водозабором и местом сброса городских очистных сооружений (ГОС), в Волгу сбрасывает сточные воды (СВ) завод «Оргсинтез», имеющий автономную систему водоподготовки. Практически во всех пробах (табл. 12), отобранных в районе ГОС, обнаружены фенол и его производные, содержание их превышает ПДК.

Выше места сброса ГОС волжская вода содержит значительные количества фенола и производных: до 33 ПДК фенола (03. 1992г.), до 83 ПДК 2-хлор-фенола (04. 1992г.), 13 ПДК ПХФ (02. 1992г.).

Наиболее высокое содержание фенолов обнаружено в районе сброса вод ГОС: до 500 ПДК фенола, до 1500 ПДК ТХФ, до 837 мкг/л 4-хлор,3-метилфенола, токсические свойства которого не изучены. По мере удаления от ГОС происходит разбавление ЗВ. При удалении на 2 км обнаружены 7 из 10 анализируемых веществ: фенол (до 30 ПДК), 2-хлорфенол (26 ПДК), ТХФ и ПХФ (до 16 ПДК).

Сезонная динамика характеризуется меньшими концентрациями в ноябре - январе и большими в марте - мае. Суммарная концентрация производных фенола и токсичность, определённая с помощью K_{Σ} изменяются симбатно. Очевидно, в летние месяцы возрастает концентрация ЗВ, способных к комплексообразованию.

Очевидна необходимость заменить хлорирование на экологически более чистые методы обеззараживания и очистки питьевой и СВ, например, с применением УФ-излучения. Конкретные технологические параметры на примере ХОС – гербицида лонтрел, приведены в Главе 8 §4.

§6. Анализ питьевой воды города Казани

Пробы отбирались на водозаборе города после первого подъёма волжской воды и через три часа после её обработки (табл. 13). Установлено содержание в воде фенола и девяти его производных в пробах воды первого подъёма в разные дни – выше или ниже ПДК. В питьевой воде только однажды зафиксировано значительное количество хлорпроизводных фенола: ТХФ = 2 ПДК; 2-хлорфенол = 5 ПДК. Во всех пробах зафиксировано присутствие ПХФ в значительных количествах. Очистка сырой воды, практически, не приводит к заметному уменьшению его концентрации. В образце за 20 декабря возрастает с 2,4 ПДК - в сырой, до 3,3 ПДК - в питьевой воде. Данный факт нельзя объяснить иначе, как замещением метил- и нитрогрупп на хлор при хлорировании в технологическом процессе очистки воды.

По совокупности биотестов (*Benechea harvey*, *Tetrahymena pyriformis*, *Daphnia magna*) качество питьевой воды удовлетворяет предъявляемым к ней требованиям, - не обладает острой токсичностью. С точки зрения токсичности питьевая вода 25 ноября, 15 и 20 декабря несколько «хуже» сырой. В пробе за 25 ноября получили 75 особей в сырой воде и 70 - в питьевой, при 90 единиц в контрольном опыте. Более высокая смертность тест-организмов после водоподготовки, указывает на проявления хронической токсичности. Одна из причин ухудшения - хлорирование воды, которое приводит к возникновению более токсичных ХОС. ПХФ является предшественником диоксина - одного из самых опасных загрязнителей окружающей среды. Таким образом, необходимо стремиться исключить первичную обработку воды

хлором. Для разрушения органических веществ, содержащихся в природной воде, использовать УФ в сочетании с перекисью водорода или озонированием.

§7. Очистка питьевой воды УФ методом на водозаборах

Работа по очистке питьевой воды из артезианского источника выполнялась в посёлке Азино г. Казани. Необходимость очистки воды из артезианских скважин обусловлена наличием в подземных водах остаточных количеств металлов, пестицидов, нефтепродуктов, солей, органических ЗВ, в том числе - ХОС, микроорганизмов. Учитывая низкий окислительный потенциал, характерный для грунтовых вод, обработка их пероксидом водорода или совместно H_2O_2 и УФ светом в сочетании с традиционными методами фильтрации позволяет добиться практически любой степени чистоты воды. Была предложена бактерицидная установка, обеспечивающая очистку от органических соединений и полное обеззараживание 150 м³/час воды. Обрабатываемая вода поступает в три соединённые параллельно камеры обеззараживания, где подвергается облучению УФ лампами, помещёнными в защитные кварцевые чехлы. Вода, прошедшая через УФ установку, может быть использована для непосредственного потребления в системах хозяйственно-питьевого водоснабжения или сброса в природные водоёмы. Использование установок на основе ламп низкого давления (Глава 8 §4 п.4.1) касетно модульного типа, выполненных в водопогружном варианте даёт возможность очистки любых объёмов воды.

§8. Способы улучшения работы городских очистных сооружений

Для увеличения пропускной способности ГОС был проведён анализ их работы и данных лабораторных исследований за 1991 г., имевшихся в производственном Управлении Казводоканал. Пропускная способность биологической очистки ГОС определялась эффективностью работы восьми вторичных отстойников и составляла 450 тыс. м³/сут., при ежедневной подаче 490-535 тыс. м³/сут. сточных вод: ежедневно от 40 до 85 тыс. м³/сут. СВ, - 10-20% общего городского стока сбрасывалось в Волгу без биологической очистки, сразу после первичных отстойников.

Нами рекомендовано на этапе механической очистки для повышения эффективности осадкообразования и дополнительной очистки СВ от фосфатов – загрязнения природных вод, способствующего цветению сине-зелёных водорослей, использование способности ЗВ к комплексообразованию: 1. Введение в поток сточной воды коагулянта-хлорида железа, который образует прочные нерастворимые комплексы с фосфатом. Степень улавливания фосфата при такой обработке СВ более 70%. Повышается осаждение металлов и некоторых органических примесей – комплексообразователей. 2. Введение в поток СВ флокулянта – полимерного водорастворимого катиона. Флокулянт вызывает укрупнение мелкодисперсных частиц, в том числе гидроксидов и фосфатов железа, тем самым возрастает скорость осаждения частиц и образуется более плотный осадок. С применением флокулянта эффективность очистки стока от взвешенных мелкодисперсных частиц и органических веществ, металлов и бактерий возрастает до 70-80%.

На этапе биологической очистки для интенсификации, применять обработку активного ила мутагеном.

Для целей обеззараживания использовать УФ излучение, являющееся эффективным стерилизующим средством, приводящим к дополнительной очистке и детоксикации СВ, что способствует интенсификации процесса биологической очистки.

ки и улучшению физиологического состояния АИ, тем самым ведёт к увеличению пропускной способности ГОС.

Использование УФ перспективно с экономической точки зрения: прекращается использование дорогостоящего хлора или озона, возрастает пропускная способность ГОС. Согласно данным американских исследователей (Purys. Inc., 1992), стоимость 1 моля квантов света (0,0025\$ США), намного ниже стоимости 1 моля озона (0,1\$ США), и сравнима со стоимостью 1 моля активного хлора (0,16\$ США). Экологически выгодно использование ультрафиолета, т.к. он позволяет избежать образования ХОС, фуранов и дибензофуранов, возникающих под влиянием озона, – предшественников супер-экоотоксикантов – хлордиоксинов, диоксинов. Возможна очистка практически от любого вида загрязнителей, как в локальных, так и в коллекторных стоках.

§9. Проект локальных очистных сооружений

Наиболее рациональная схема очистки промышленных СВ заключается в предварительной локальной очистке их на предприятиях от специфических примесей и дальнейшем смешении с хозяйственно-бытовыми СВ. Наряду с природоохранным эффектом очистка СВ зачастую имеет и экономическую целесообразность, особенно в тех случаях, когда со стоками теряются и выносятся в водоём ценные продукты, т.е. очистка должна сочетаться с утилизацией ценных материалов, создавать возможность безотходного производства.

Работы по созданию локальных очистных сооружений были выполнены нами на производственном обвальном объединении «Спартак» в г. Казани. Собственно производственный сток данного предприятия не значителен по объёму и не содержит сложных для разложения молекул. Но в объединённый заводской коллектор попадают стоки: чисто производственные, транспорта, содержащие бензин, мазут и моторные масла; а также бытовые, в том числе душевых комнат при раздевалках рабочего персонала, содержащие поверхностно активные вещества. Предложенная рациональная схема очистки и техническое решение размещения системы УФ очистки в водосборном коллекторе. Для эффективного разложения всех СВ разработана конструкция УФ установки, которая позволяет не только сливать в общегородской коллектор чистую воду, но и повторно её использовать в технологических целях, что обеспечивает большой экономический эффект.

ВЫВОДЫ

1. Загрязняющие вещества техногенного происхождения образуют комплексы с микроэлементами, нуклеотидами (АТФ, НАДН, ДНК, РНК), липидами клеточных мембран, ферментами. Процессы комплексообразования играют определяющую роль в механизме токсического поражения живого организма.

2. Техногенные токсиканты образуют бидентатные комплексы с металлами в объектах окружающей среды и микроэлементами в клетках живых организмов. Прочность комплексов изменяется в ряду: $\text{NiL}_2 > \text{FeL}_2 > \text{MoL}_2 = \text{CoL}_2 > \text{CuL}_2 > \text{MnL}_2 > \text{ZnL}_2 > \text{MgL}_2$. По сравнению с исходным загрязняющим веществом, металлокомплексы с медью, никелем, кобальтом, молибденом и железом повышают прочность 3-х компонентных комплексных систем с нуклеотидами и ферментами, что обуславливает значительное возрастание токсичности для тест-объектов (в отношении однодольных и злаковых растений, почвообитающих микроартропод и

гидробионтов). Металлокомплексы пестицидов практически не разлагаются микроорганизмами активного ила и УФ составляющей солнечного света, что способствует их накоплению в природных водных экосистемах.

3. Скорость процесса переноса загрязняющего вещества через липиды клеточных мембран характеризуется константой массопереноса, имеющей обратную корреляцию с константой комплексообразования. Транспорт металлокомплексов происходит с большей скоростью, чем соответствующего лиганда. Комплексообразование токсикантов с липидами приводят к их накоплению в неполярном слое клеточной мембраны, и является основной причиной биоаккумуляции загрязняющих веществ в тканях живых организмов.

4. Образование комплексов техногенных загрязняющих веществ с АТФ приводит к энергодефициту в тканях организмов. По величинам констант комплексообразования, исследовавшиеся соединения выстраиваются в два ряда активности: 1) зенкор > лонтрел (L) > кузагард > раундап > сетоксидим > базагран > тачигарен > тилт; 2) $\text{CuL}_2 > \text{CoL}_2 > \text{NiL}_2 > \text{L} \approx \text{FeL}_2 \approx \text{ZnL}_2 \approx \text{MoL}_2 \gg \text{MgL}_2 \approx \text{MnL}_2$. Отмечается прямая корреляция констант комплексообразования со способностью токсикантов подавлять прорастание семян, образование хлорофилла в листьях, рост вегетирующих растений, снижать численность микроартропод (коллембол видов *Folsomia candida* и *Xenylla grisea*) и гидробионтов (инфузорий *Tetrahymena pyriformis*).

5. Техногенные загрязняющие вещества ингибируют активность ферментных систем в организмах. Блокирование деятельности ферментов коррелирует с комплексообразующей способностью токсикантов. Антиредуктазная активность (на примере НАДН-оксидоредуктазы) возрастает в ряду: ион металла < пестицид < металлокомплекс. Это является причиной токсичности (снижение активности люциферазы бактерии *Benekea harvey*), останавливает протекание окислительных процессов в многоклеточных организмах, приводит к элиминации видов активного ила и накоплению загрязняющих веществ.

6. Биологический эффект от действия техногенных токсикантов на тест-объекты разного систематического положения коррелирует с величинами их констант комплексообразования с ДНК и РНК. Степень влияния на численность и жизненные циклы микроартропод (коллембол видов *Folsomia candida* и *Xenylla grisea*), подавление репродуктивной способности гидробионтов (инфузорий *Tetrahymena pyriformis*) убывает в последовательностях 1): зенкор > лонтрел (L) > кузагард > раундап > базагран > тачигарен; и 2): $\text{CuL}_2 > \text{CoL}_2 > \text{NiL}_2 > \text{MoL}_2 > \text{MnL}_2 > \text{ZnL}_2 > \text{L} > \text{MgL}_2$.

7. Образование комплексных соединений техногенных загрязняющих веществ с ДНК и РНК является причиной их генотоксичности. Пестициды и комплексы гербицида лонтрела с металлами проявляют прямую мутагенную активность, вызывая мутации типа сдвига рамки считывания. Генотоксичность MoL_2 , NiL_2 , MgL_2 и FeL_2 выше, чем у лонтрела. Все исследованные вещества являются промутагенами (на штаммах TA98 и TA100 бактерий *Salmonella typhimurium*).

8. Разработан новый метод экспресс-анализа токсичности объектов водной среды и водных вытяжек из твёрдых веществ. Он основан на корреляционной зависимости токсичности от величины энергодефицита, создаваемого загрязняющим веществом. Метод позволяет исследовать индивидуальные вещества и смеси. Достоинствами метода является использование дешёвых реагентов отечественного

производства, возможность проведения анализов в полевых условиях, соотнесение с биологическими тест - системами.

9. Мониторинг среднего течения реки Волги показал, что хлорирование коммунально-промышленных, сточных и питьевых вод приводит к повышению содержания токсичных хлорорганических соединений в природных водных объектах. Разработанные способы УФ очистки питьевой и сточных вод, исключаяющие стадию хлорирования в 80-90 гг. прошлого века были новыми технологическими решениями. Широкое использование созданных вариантов комбинированного применения УФ обработки и биологических методов, локальных очистных сооружений – остаются актуальными для практики настоящего времени.

Основное содержание диссертации опубликовано в следующих работах:

1. Алиев З.Г., Атовмян Л.О., Саратовских Е.А., Криничный В.И., Карцев В.Г. Синтез, структура и спектральные характеристики комплексов меди с производными пиколиновой кислоты // Известия АН СССР. Сер. хим. – 1988. - №11, С.2495 – 2501.
2. Саратовских Е.А., Кондратьева Т.А., Психа Б.Л., Гвоздев Р.И., Карцев В.Г. Комплексообразование некоторых пестицидов с аденозинтрифосфорной кислотой // Известия АН СССР. Сер. хим. – 1988. - №11, С.2501 - 2507.
3. Саратовских Е.А., Болдырева Н.М., Карцев В.Г. О применении метода мутагенной обработки активного ила для биоразложения гербицида лонтрел // Бюллетень по водному хозяйству. – 1988. - №1/2, С.28 - 33.
4. Саратовских Е.А., Личина М.В., Психа Б.Л., Гвоздев Р.И. О характере взаимодействия ди- и полинуклеотидов с некоторыми пестицидами // Известия АН СССР. Сер. хим. – 1989. - №9, С.1984 - 1989.
5. Саратовских Е.А. Синтез бидентатных комплексов 3,6-дихлорпиколиновой кислоты // Известия АН СССР. Сер. хим. – 1989. - №10, С.2327 - 2329.
6. Саратовских Е.А., Орлов В.И., Криничный В.И. ЭПР-спектроскопическое изучение металлокомплексов 3,6-дихлорпиколиновой кислоты // Известия АН СССР. Сер. хим. – 1989. - №11, С.2477 - 2481.
7. Саратовских Е.А., Папина Р.И., Карцев В.Г. Влияние некоторых пестицидов на двудольные и злаковые культуры // Сельскохозяйственная биология. Сер. Биология растений. – 1990. - №5, С.152 - 159.
8. Саратовских Е.А., Козлова Н.Б., Гончаров В.В. Оценка загрязнения Волги в зоне влияния сточных вод Казани // Водные ресурсы. - 1997. - Т.24. - №1, С.56 - 60.
9. Саратовских Е.А., Папина Р.И., Кондратьева Т.А. Нарушение энергетического метаболизма клеток в процессе прорастания семян двудольных и злаковых растений при действии на них различных пестицидов и металлокомплексов // Цитология. - 1999. - Т.41. - №3-4, С.308 - 309.
10. Saratovskikh E.A., Kondratieva T.A., Psikha B.L. On the transport of pesticide Lontrel through liposomal membranes // Cellular & Molecular Biology Letters. – 2000. - V.5. - №3, P.367 - 370.
11. Саратовских Е.А., Психа Б.Л., Гвоздев Р.И. Пестициды и окружающая среда // Вестник БГТУ. - 2004. - №8. ч.1, С.38 – 40.

12. Саратовских Е.А., Коршунова Л.А., Гвоздев Р.И., Куликов А.В. Ингибирование НАДН-оксидоредуктазной реакции гербицидами и фунгицидами различного строения // Известия АН. Сер. хим. – 2005. - №5, С.1284 - 1289.
13. Саратовских Е.А., Козлова Н.Б., Папин В.Г., Штамм Е.В. Разложение гербицида лонтрел биологическими и фотохимическими методами // Прикладная биохимия и микробиология. - 2006. - Т.42. - №1, С.44 - 51.
14. Саратовских Е.А., Полякова О.В., Рощупкина О.С., Лебедев А.Т. Продукты фотоллиза 3,6-дихлорпиколиновой кислоты (гербицида лонтрел) в водных растворах // Прикладная биология и микробиология. - 2007. - Т.43. - №2, С.252 - 256.
15. Саратовских Е.А., Штамм Е.В. Влияние хлор- содержащих фенолов на стабильность ДНК // Химическая физика. – 2007. - Т.26. - №7, С.77 - 83.
16. Саратовских Е.А., Коршунова Л.А., Рощупкина О.С., Скурлатов Ю.И. Ингибирование НАДН-оксидоредуктазы соединениями металлов // Химическая физика. – 2007. - Т.26. - №8, С.46 - 53.
17. Саратовских Е.А., Бокова А.И. Влияние гербицидов на популяцию почвообитающих коллембол // Токсикологический вестник. - 2007. - №5, С.17 - 23.
18. Саратовских Е.А., Глазер В.М., Костромина Н.В., Котелевцев С.В. Корреляция генотоксичности экотоксикантов с их способностью к комплексообразованию с ДНК // Экологическая генетика. - 2007. - Т.5. - №3, С.46 - 55.
19. Саратовских Е.А., Козлова Н.Б. Изучение аккумуляции пестицидов в жирной фазе // Токсикологический вестник. - 2008. - №1, С. 29 - 33.
20. Саратовских Е.А., Психа Б.Л., Гвоздев Р.И., Скурлатов Ю.И. Кинетическая модель процесса переноса техногенных загрязняющих веществ через липосомальные мембраны // Химическая физика. – 2008. – Т.27. - №7, С. 59–65.
21. Саратовских Е.А., Козлова Н.Б., Байкова И.С., Штамм Е.В. Корреляция между токсическими свойствами загрязняющих веществ и их константами комплексообразования с АТФ // Химическая физика. - 2008. - в печати.
22. Саратовских Е.А., Булатов А.В., Карцев В.Г. Синтез комплекса меди с 3,6-дихлорпиколиновой кислотой и её спектральные характеристики // Тр. ИХФ. Кинетика и механизмы физико-химических процессов. Черноголовка. – 1986. вып. 9. - С. 38.
23. Алиев З.Г., Карцев В.Г., Саратовских Е.А. Молекулярная структура комплексов Си с производными пиколиновой кислоты // Кристаллохимия неорганических и координационных соединений. Тез. докл. IV Всесоюз. совещания 1986 г. – Бухара. - М.: Наука, 1986. - С. 67.
24. Саратовских Е.А., Карцев В.Г. Изучение комплексообразования медного комплекса гербицида лонтрел с другими бидентатными лигандами // Тр. ИХФ РАН. Кинетика и механизмы физико-химических реакций. Черноголовка. – 1987. вып. 10. - С. 35.
25. Саратовских Е.А., Психа Б.Л., Шестаков А.Ф., Карцев В.Г., Алиев З.Г. Изучение физико-химических характеристик и реакционной способности пестицидов в модельных системах // Всесоюз. координационного совещания по пестицидам: Тез. докл. - Черноголовка, 1988. - С. 96.
26. Карцев В.Г., Кирковский Л.И., Богатыренко В.Р., Саратовских Е.А., Богатыренко Т.Н., Доброхотов В.Г., Лисецкая И.В., Лисицын Е.А. Разработка теоретических основ направленного синтеза фотодинамических гербицидов // Всесоюз.

- координационного совещания по пестицидам: Тез. докл. - Черноголовка, 1988. С. 129.
27. Саратовских Е.А., Психа Б.Л., Гвоздев Р.И., Карцев В.Г. Взаимодействие пиридинсодержащего гербицида лонтрел с аденозинтрифосфорной кислотой // Тр. Всесоюз. совещания по химии и технологии пиридин содержащих пестицидов: Тез. докл. - Черноголовка, 1988. вып. 2. - С. 78.
 28. Саратовских Е.А., Личина М.В., Психа Б.Л., Гвоздев Р.И. Образование комплекса 3,6-дихлорпиколиновой кислоты с динуклеотидами // Тр. Всесоюз. совещания по химии и технологии пиридин содержащих пестицидов: Тез. докл. - Черноголовка, 1988. вып. 2. - С. 79.
 29. Саратовских Е.А. Некоторые аспекты взаимодействия пиридинсодержащих пестицидов с ферментными системами // Тр. Всесоюзного совещания по химии и технологии пиридин содержащих пестицидов: Тез. докл. - Черноголовка, 1988. вып. 2. - С. 80.
 30. Саратовских Е.А. Металлокомплексы в модельном процессе ингибирования каталитической активности НАДН-редуктазы // Активация малых молекул комплексами металлов. Тез. докл. международного семинара октябрь 1989 г. - Ленинград, 1989. - С. 59.
 31. Скурлатов Ю.И., Штамм Е.В., Хайлов Е.Г., Васильев Г.К., Кирьянов В.И., Саратовских Е.А. Новые подходы к разработке технологии очистки и обеззараживания питьевой воды с применением источников УФ излучения // Вода: экология и технология. Тез. докл. международного конгресса 1994 г. - Москва, 1994. - Т.2. - С. 670.
 32. Саратовских Е.А., Козлова Н.Б., Кондратьева Т.А. Мониторинг водной среды среднего течения реки Волги // Вода: экология и технология. Тез. докл. международного конгресса 1996 г. - Москва, 1996. - Т.2. - С. 443 - 444.
 33. Саратовских Е.А., Кондратьева Т.А., Психа Б.Л. Загрязнение водных объектов токсикантами с/х производства и изучение их поведения на молекулярно-биологическом уровне (на примере пестицида лонтрел) // Вода: экология и технология – Акватек-2000. Тез. докл. международного конгресса 2000 г. - Москва, 2000. - С. 170.
 34. Саратовских Е.А., Смирнов В.А., Кондратьева Т.А. Деградация пестицида лонтрел в водных растворах // Вода: экология и технология – Акватек-2000. Тез. докл. международного конгресса 2000 г. - Москва, 2000. - С. 416.
 35. Скурлатов Ю.И., Штамм Е.В., Козлова Н.Б., Александрова Е.В., Саратовских Е.А. Пероксид водорода в экологической химии // Химия органических и элементарноорганических пероксидов. Тез. докл. XI Международной конф. 2003 г. - Москва, 2003. - С. 289.
 36. Саратовских Е.А., Коршунова Л.А., Гвоздев Р.И., Куликов А.В. Пестициды как ингибиторы ферментативных процессов // Высокоорганизованные каталитические системы. Тез. докл. Международной конф. 2004 г. - Москва. - С. 107.
 37. Саратовских Е.А., Штамм Е.В., Козлова Н.Б. Фотоокисление 3,6- дихлорпиколиновой кислоты // Современная химическая физика. Тез. докл. XVI Симпозиума 20 сент.–1 окт. 2004 г. – Туапсе, 2004. - С. 105 - 106.
 38. Саратовских Е.А., Коршунова Л.А. Исследование кинетики ферментативного окисления техногенных токсикантов // Современная химическая физика. Тез. докл. XIX Симпозиума 22 сент.–3 окт. 2007 г. – Туапсе, 2007. - С. 219 - 220.

39. Анализ содержания фенолов и Сl-фенолов в среднем течении реки Волги: Отчёт по хоз. договору с Казанским гор. водоканалом №522/91 (промежуточ.) / ИХФЧ РАН; Руководитель Е.А. Саратовских. - Ф.1, оп.1, дело №433, И2212. л.131. Архив ИПХФ РАН. – Черноголовка, 1991. Ч.1. – 14 с.
40. Анализ содержания фенолов и Сl-фенолов в среднем течении реки Волги: Отчёт по хоз. договору с Казанским гор. водоканалом №522/91 (промежуточ.) / ИХФЧ РАН; Руководитель Е.А. Саратовских. - Ф.1, оп.1, дело №453, И2212. л.150. Архив ИПХФ РАН. – Черноголовка, 1992. Ч.2. – 18 с.
41. Анализ содержания фенолов и Сl-фенолов в среднем течении реки Волги: Отчёт по хоз. договору с Казанским гор. водоканалом №522/91 (промежуточ.) / ИХФЧ РАН; Руководитель Е.А. Саратовских. - Ф.1, оп.1, дело №469, И2212. л.84. Архив ИПХФ РАН. – Черноголовка, 1993. Ч.3. - 19 с.
42. Анализ состояния и рекомендации по улучшению работы очистных сооружений города Казани: Отчёт по хоз. договору с Казанским гор. водоканалом. №522/91 (промежуточ.) / ИХФЧ РАН; Руководитель Е.А. Саратовских. - Ф.1, оп.1, дело №469, И2212. л.84. Архив ИПХФ РАН. – Черноголовка, 1993. Ч.5. - 21с.
43. Анализ питьевой воды города Казани: Отчёт по хоз. договору с Казанским гор. водоканалом №522/91 (промежуточ.) / ИХФЧ РАН; Руководитель Е.А. Саратовских. - Ф.1, оп.1, дело №469, И2212. л.84. Архив ИПХФ РАН. – Черноголовка, 1993. Ч.4 – 21 с.
44. УФ-метод очистки питьевой воды на водозаборе пос. Азино г.Казани: Отчёт по хоз. договору с Казанским гор. водоканалом №522/91 (промежуточ.) / ИХФЧ РАН; Руководитель Е.А. Саратовских. - Ф.1, оп.1, дело №485, И2117. Т.2. л.404. Архив ИПХФ РАН. – Черноголовка, 1994. Ч.6 – 7 с.
45. Проект локальных очистных сооружений для обувного производственного объединения «Спартак» г. Казань: Отчёт по хоз. договору с обувным объединением «Спартак» г. Казань № 1191/1 (заключит.) / ИХФЧ РАН; Руководитель Саратовских Е.А. - Ф.1, оп.1, дело №453, И2212. л.150. Архив ИПХФ РАН. – Черноголовка, 1992-1994. – 10 с.
46. Обобщение результатов натурных и лабораторных исследований по изучению состояния водных экосистем и систем питьевого водоснабжения: Отчёт по Программе «Экологическая безопасность России». Контракт ЭБР-662-93-К°. Мин. Экологии РФ (промежуточ.) / ИХФЧ РАН; Руководитель Е.А. Саратовских. - Ф.1, оп.1, дело №471, И2312. Т.2. л.155. Архив ИПХФ РАН. – Черноголовка, 1993. – Ч.1. – 29 с.
47. Проведение лабораторных и натурных исследований по использованию ряда биотестов для анализа водных экосистем: Отчёт по Программе «Экологическая безопасность России». Контракт ЭБР-662-93-К°. Мин. Экологии РФ (промежуточ.) / ИХФЧ РАН; Руководитель Е.А. Саратовских. - Ф.1, оп.1, дело №488, И2315. л.223. Архив ИПХФ РАН. – Черноголовка, 1994. – Ч.2. – 38 с.
48. Обобщение результатов натурных и лабораторных исследований по использованию биотестов для анализа водных экосистем: Отчёт по Программе «Экологическая безопасность России». Контракт ЭБР-662-93-К°. Мин. Экологии РФ (заключ.) / ИХФЧ РАН; Руководитель Е.А. Саратовских. – Ф.1, оп.1, дело №504, И2315, Т.1. л.120. Архив ИПХФ РАН. – Черноголовка, 1995. Ч.3 – 26 с.

Благодарности

Автор выражает искреннюю признательность научному консультанту, профессору кафедры гидробиологии МГУ, д.б.н. О.Ф. Филенко за ценные советы и указания, данные им в процессе проведения исследований и оформления диссертации.

Особую благодарность автор испытывает к д.х.н. Ю.И. Скурлатову, д.х.н. Е.В. Штамм, д.ф.-м.н. Г.К. Васильеву, д.х.н. Б.Л. Психа, д.х.н. В.Г. Карцеву, к.б.н. Р.И. Гвоздеву.

Огромную благодарность автор выражает сотрудникам ИХФ, ИПХФ, ИБХФ РАН и Биологического факультета МГУ: к.б.н. Н.Б. Козловой, к.х.н. Е.В. Вичугинской, к.х.н. О.С. Рощупкиной, к.х.н. Т.А. Кондратьевой, к.б.н. М.В. Личиной, Л.А. Коршуновой, д.ф.-м.н. В.И. Кириянову, к.ф.-м.н. Ю.А. Чернышову, к.ф.-м.н. В.Г. Папину, д.б.н. С.В. Котелевцеву, к.б.н. В.М. Глазеру, д.х.н. А.Т. Лебедеву, д.б.н. С.А. Маракушеву, д.т.н. Б.С. Фёдорову, О.Н. Дьяковой, к.б.н. С.К. Стебаевой, д.ф.-м.н. С.А. Жукову, д.ф.-м.н. В.К. Грязнову, д.х.н. В.А. Смирнову и другим.

Сдано в набор 2.07.08. Подписано в печать 7.07.08. Формат 60х90 1/16
Объем 2,75 п.л. Заказ 181. Тираж 100

Отпечатано в типографии ИПХФ РАН
142432, Московская обл., г. Черноголовка, пр-т ак. Семенова, 5