

УДК: [543.422.3-76+543.95]:546.492

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РТУТИ (II) БИОЛОГИЧЕСКИМ И ФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДАМИ

М.В. Королева, А.А. Калугин, А.А. Туманов, А.Д. Зорин
Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского
603600, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23
azorin@uic.nnov.ru;

Поступила в редакцию 26 марта 2003 г.

Разработана методика биологического определения ртути (II) в водных растворах. Показана возможность определения биологически активной формы ртути (катионной) с применением в качестве аналитических индикаторов бактерий *Bacillus subtilis niger* с использованием пробы малого объема (0.3 мл). Сопоставлены полученные результаты с результатами определения ртути (II) классическим физико-химическим методом – фотометрическим.

Королева Марина Валерьевна – аспирантка кафедры аналитической химии химического факультета Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского.

Калугин Альберт Александрович – кандидат химических наук, доцент.

Область научных интересов: фотометрический метод анализа.

Автор свыше 80 публикаций.

Туманов Александр Александрович – доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник НИИ химии Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, заслуженный деятель науки РФ.

Область научных интересов: аналитическая химия, биологический метод анализа.

Автор около 400 публикаций.

Зорин Аркадий Данилович – доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии химического факультета Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского. Действительный член Международной академии наук высшей школы, заслуженный деятель науки и техники РФ, лауреат Государственной премии СССР.

Область научных интересов: получение и анализ особо чистых веществ, определение и утилизация токсикантов, в том числе отравляющих химических веществ.

Автор более 400 публикаций.

В число особо опасных, токсичных веществ, попадающих в окружающую среду, входят тяжелые металлы. Одним из наиболее опасных металлов является ртуть. В результате природных биохимических процессов в окружающую среду поступило около $1.6 \cdot 10^{10}$ т ртути. Около 0,1% этого количества осталось в океанах в растворенном виде. Ртуть до настоящего времени накапливается в атмосфере в результате выветривания земной коры. Количество ртути, поступившее в окружающую среду в XX столетии в результате человеческой деятельности, почти в 10 раз превышает расчетное природное поступление [1 - 4].

Ртуть аккумулируется в головном мозге, почках, при острых отравлениях вызывает разрушение легких. При хроническом отравлении происходит нарушение нервной системы. Контроль за содержанием в окружающей среде такого опасного вещества, как ртуть, является очень важным.

Биологическая активность химических веществ зависит от формы их нахождения в исследуемых объектах [5-7]. Если формы биологически неактивны, то вреда они не наносят. Определение биологически активных форм токсикантов не обеспечивается физико-химическими методами анализа. В этом отношении выгодно отличается биологический метод. В последнее время он получает всё большее распространение при оценке загрязнения объектов окружающей среды.

Этому есть несколько причин.

Биометод в качественном варианте является методом входного анализа, обеспечивая исследователя информацией об опасности загрязняющих веществ и их смесей. Получение подобной первичной информации об объектах окружающей среды дает возможность избежать применения методов физико-химического анализа и связанных с этим затрат. Количественные варианты биологического метода позволяют определять загрязняющие вещества на уровне малых содержаний.

Основы метода заключаются в следующем. Для существования живых организмов необходима среда строго определенного, постоянного химического состава. При нарушении этого постоянства, за счет внесения исследуемого токсического вещества, через некоторое время организм подает сигнал. Ответный сигнал организма может быть разнообразным: изменение характера поведения (фактор избегания), интенсивности роста, скорости метаморфозы, состава крови, нарушение функций органов кроветворения, пищеварения, дыхания, размножения.

Обобщенным показателем эффективности действия исследуемого вещества на индикаторный организм является или его выживание, или летальный исход [8-9]. Количественное определение возможно, если установлена связь между интенсивностью ответного сигнала организма и содержанием исследуемого вещества.

Диапазон определяемых содержаний зависит от ряда факторов: характера и продолжительности воздействия химического соединения на организм, температуры и pH среды, видовой и родовой принадлежности организма, его индивидуальных особенностей и т.д.

В течение ряда лет ведется целенаправленный поиск биологических тест-объектов, с помощью которых можно определять микроколичества различных химических веществ. Среди таких тест-объектов можно выделить плесневые грибы рода *Aspergillus*. Они чувствительны к действию катионов ртути (II), токсическое действие которых объясняют, в частности, блокированием -SH групп молекул белка микроорганизмов [10].

Метод тканевых культур находит применение для определения концентраций вирусов, бактерий, токсинов, для установления токсических доз лекарственных веществ, а также во многих других исследованиях [11]. Клетки, живущие вне организма и тем самым лишенные его регулирующего влияния, обладают особенно высокой чув-

ствительностью к действию внешних факторов, в частности к изменению состава питательной среды. С помощью некоторых культур можно выполнить количественные определения, например, серебра и ртути до 10^{-7} моль/л. Однако данная методика достаточно сложна в практическом исполнении, что затрудняет ее применение [11].

Благодаря хорошо развитому химическому анализатору живородящих рыбок гуппи, их используют в токсикологических исследованиях [12]. При этом количественное определение химических веществ возможно вести как по летальному исходу, так и по изменению поведения (пищевые и половые реакции, изменение условных рефлексов и т. п.), что, несомненно, повышает чувствительность метода и расширяет диапазон его применения. По своей токсичности катионы могут быть выделены в следующий ряд: $Hg^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Pb^{2+} > Ni^{2+} > Mn^{2+}$. Для повышения объективности получаемых результатов целесообразно использовать несколько индикаторных организмов.

В литературе имеются данные об использовании в качестве аналитических индикаторов микроорганизмов группы актиномицетов (лучистых грибов) [13]. Однако возможность использования различных видов актиномицетов в качестве аналитических индикаторов на неорганические ионы ограничивается тем, что большинство видов указанных микроорганизмов растет лишь на нейтральных или слабощелочных питательных средах, где неизбежен гидролиз исследуемых солей.

Целью нашего исследования явилась разработка методики биологического определения катионов ртути (II) с использованием в качестве индикаторных организмов бактерий *Bacillus subtilis niger*. Выбор данных бактерий обусловлен их высокой чувствительностью к катионам тяжелых металлов и, в частности, к катионам ртути.

Проведение эксперимента

Методика биологического определения

На водяной бане расплавляли питательную среду, разливали ее по чашкам Петри, из расчета 30 мл в каждую из них. После отвержения агара чашки помещали в термостат и выдерживали при температуре $38^{\circ}C$ в течение 1 часа.

Для посева использовалась суспензия бактериальных клеток, имеющая концентрацию $1 \cdot 10^9$ клеток/мл. Концентрация суспензии устанавливается путем сравнения со стандартом мутности по Тарасевичу и при необходимости корректируется. Посев осуществлялся на поверх-

ность питательной среды. В чашку Петри вносились 0,1 мл бактериальной суспензии. Суспензию равномерно растирали шпателем по всей поверхности чашки Петри. Шпатель предварительно стерилизовали в пламени спиртовки.

После посева чашки Петри помещались в термостат и выдерживались при температуре 38 °С в течение двадцати минут.

В каждой чашке Петри в толще питательной среды делали по 3 лунки с помощью сверла для пробок, которое предварительно обжигали в пламени спиртовки. Затем в лунки с помощью шприца вводили по 0,3 мл исследуемого раствора нитрата ртути (II) известной концентрации. Чашки оставляли на сутки в термостате при температуре 38 °С.

Аналитическим сигналом служат диаметр и площадь зоны подавления роста бактерий вокруг лунок в питательной среде.

В диапазоне используемых в работе концентраций существует прямо пропорциональная зависимость между концентрацией введенного исследуемого раствора и аналитическим сигналом. По мере увеличения концентрации раствора наблюдается увеличение диаметра и площади зоны подавления роста бактерий. Значение диаметра и площади берется средним из шести измерений.

Методика фотометрического определения

Для проверки надежности результатов, полученных биологическим методом, исследуемые растворы были проанализированы фотометрическим методом. В качестве реагента был использован известный в аналитической практике - кадион ИРЕА.

Нами проведено исследование устойчивости комплекса ртути с кадионом во времени. Для этого снимали спектр поглощения приготовленного раствора комплекса ртути с кадионом в течение часа с интервалом 20 минут. Оптическая плотность исследуемого раствора ($4 \cdot 10^{-6}$ М) оставалась постоянной в течение часа. Этого времени было достаточно для проведения эксперимента. Оптическая плотность окрашенного комплекса, кроме длины волны, зависит и от других факторов, в первую очередь от рН. Для учета этого фактора проведено исследование влияния рН раствора на кривую светопоглощения. Как видно из рис. 1, 2, максимум оптической плотности соответствует значению длины волны 515 нм, а анализ влияния рН на вид спектра поглощения и положение максимума оптической плотности показал, что оптимальным является рН=5.

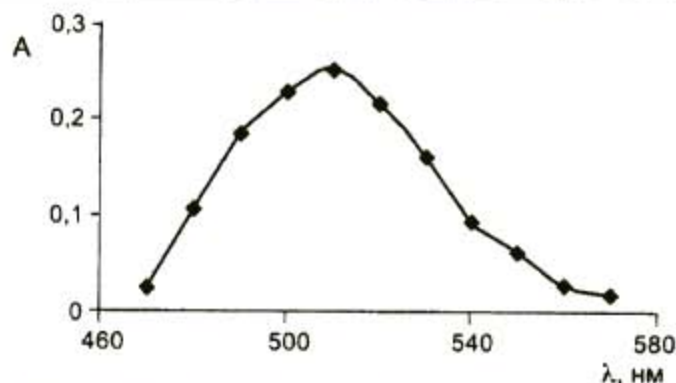


Рис.1. Кривая светопоглощения комплекса ртути с кадионом ($C_{\text{Hg}^{2+}} = 4 \cdot 10^{-6}$ М, $C_{\text{кадиона}} = 0,1\%$, A – оптическая плотность комплекса)

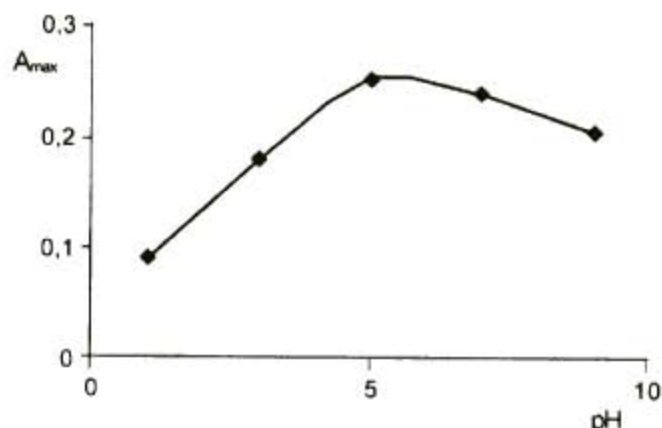


Рис.2. Влияние рН раствора на положение максимума кривой светопоглощения комплекса ртути с кадионом

Для построения градуировочной зависимости готовили серию растворов соли ртути с концентрациями от $5 \cdot 10^{-7}$ М до $7,5 \cdot 10^{-6}$ М. В колбу на 25 мл помещали 6 мл раствора соли, 4,55 мл изопропилового спирта, 1,5 мл 0,1% раствора кадиона и 12 мл дистиллированной воды. Перемешивали и фотометрировали при длине волны 515 нм.

Результаты и обсуждение

Биологическое определение

На первом этапе работы были измерены диаметры и площади зон подавления роста *Bacillus subtilis niger*. По этим данным построены градуировочные зависимости в координатах

D (мм) - $\lg C_{\text{Hg}^{2+}}$ и S (отн.ед.) - $\lg C_{\text{Hg}^{2+}}$. Градуировочные зависимости представлены на рис.3, 4.

Правильность предлагаемой методики проверялась с использованием растворов ртути, приготовленных из стандарт-титра ртути ($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$) с концентрацией 1,00 мг/мл, фон - 1 н HNO_3 . Результаты исследования представлены в табл. 1.

Данные исследования свидетельствуют о правильности методики и отсутствии систематической погрешности в полученных результатах.

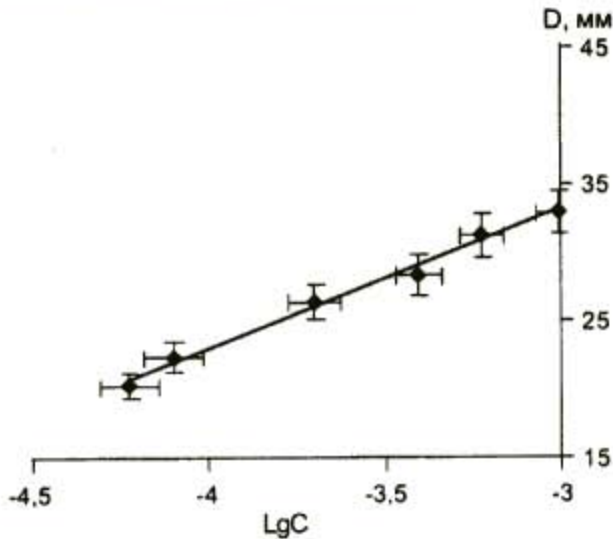


Рис.3. Градуировочная зависимость для определения ртути (II) по диаметру зон подавления роста бактерий (C – концентрация катионов ртути, моль/л; $D = 10,1 \cdot \lg C_{\text{Hg}^{2+}} + 63$). Коэффициент корреляции 0,997

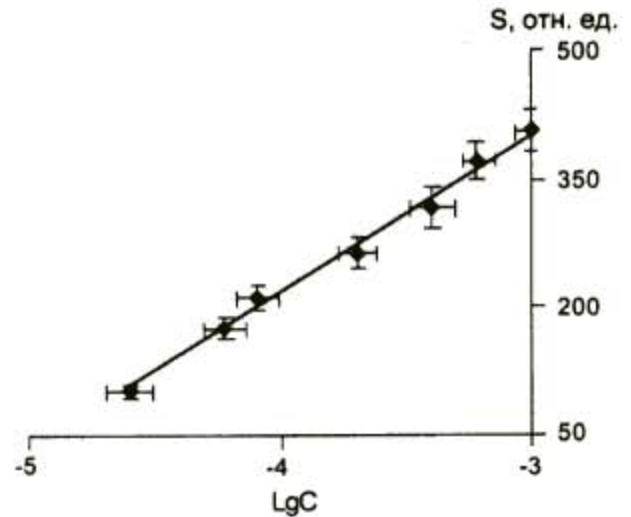


Рис.4. Градуировочная зависимость для определения ртути (II) по площади зон подавления роста бактерий (C – концентрация катионов ртути, моль/л; $S = 190 \cdot \lg C_{\text{Hg}^{2+}} + 968$). Коэффициент корреляции 0,998

Таблица 1

Результаты определения катионов ртути(II) биологическим методом по диаметру зон подавления роста бактерий

Введено, моль/л	Исследуемый раствор		Введено, моль/л	Стандартный раствор	
	Определено, моль/л	S _r		Определено, моль/л	S _r
6·10 ⁻⁵	(7±1)·10 ⁻⁵	0,2	6·10 ⁻⁵	(6±1)·10 ⁻⁵	0,3
8·10 ⁻⁵	(7±1)·10 ⁻⁵	0,3	8·10 ⁻⁵	(7±1)·10 ⁻⁵	0,2
2·10 ⁻⁴	(2,0±0,1)·10 ⁻⁴	0,03	2·10 ⁻⁴	(2,2±0,1)·10 ⁻⁴	0,05
4·10 ⁻⁴	(4,1±0,2)·10 ⁻⁴	0,05	4·10 ⁻⁴	(4,2±0,3)·10 ⁻⁴	0,1
6·10 ⁻⁴	(6,0±0,4)·10 ⁻⁴	0,2	6·10 ⁻⁴	(7±1)·10 ⁻⁴	0,3

Фотометрическое определение

По полученным экспериментальным данным построена градуировочная зависимость. Градуировочный график представлен на рис.5. Уравнение градуировочного графика: $A = 9,5 \cdot 10^{-4} \cdot C_{\text{Hg}^{2+}}$. Коэффициент корреляции $r = 0,995$.

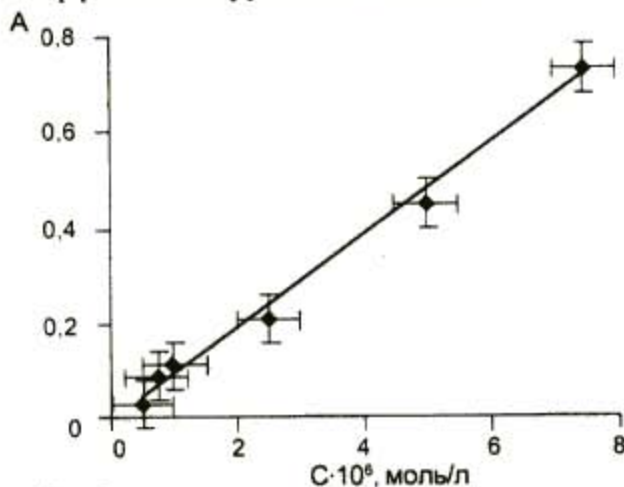


Рис.5. Градуировочная зависимость для определения ртути(II) фотометрическим методом (C – концентрация катионов ртути, моль/л)

Для проверки правильности предлагаемой методики, использовались растворы соли ртути, приготовленные из стандарт-титра ртути (Hg(NO₃)₂ с концентрацией 1,00мг/мл. фон – 1н HNO₃). Экспериментальные результаты представлены в табл.2.

Предлагаемая методика позволяет получать хорошо воспроизводимые результаты. Систематическая погрешность близка к нулю.

Сравнение метрологических характеристик методик биологического и фотометрического определения катионов ртути(II) показывает, что при определении ртути чувствительность фотометрической методики выше биологической. Это обусловлено объективной причиной: гетерогенностью популяции индикаторных организмов, а также, вероятно, частичным связыванием определяемых катионов питательной средой. Фотометрическая методика определения ртути позволяет определять ртуть при концентрации примерно в 100 раз меньше, чем биологическая.

Таблица 2

Результаты определения катионов ртути (II) фотометрическим методом

Введено, моль/л	Исследуемый раствор		Введено, моль/л	Стандартный раствор	
	Определено, моль/л	S_r		Определено, моль/л	S_r
$2 \cdot 10^{-6}$	$(2,00 \pm 0,03) \cdot 10^{-6}$	0,01	$2 \cdot 10^{-6}$	$(2,2 \pm 0,03) \cdot 10^{-6}$	0,01
$4 \cdot 10^{-6}$	$(4,00 \pm 0,05) \cdot 10^{-6}$	0,02	$4 \cdot 10^{-6}$	$(4,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$	0,08
$6 \cdot 10^{-6}$	$(6,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-6}$	0,04	$6 \cdot 10^{-6}$	$(6,10 \pm 0,1) \cdot 10^{-6}$	0,04
$8 \cdot 10^{-6}$	$(8,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-6}$	0,07	$8 \cdot 10^{-6}$	$(8,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$	0,1
10^{-5}	$(1,00 \pm 0,07) \cdot 10^{-5}$	0,03	10^{-5}	$(9,8 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$	0,1

Используемые в работе методики не позволяют определять содержание нитрата ртути(II) на уровне ниже предельно допустимой концентрации ($ПДК_{\text{в}} = 1.5 \cdot 10^{-5}$ моль/л). Одной из задач

нашего дальнейшего исследования будет рассмотрение возможностей понижения предела определения нитрата ртути(II) в водных растворах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мур Дж. Тяжелые металлы в природных водах: контроль и оценка влияния / Дж.Мур, С.Рамамурти: Пер. с англ. М.: Мир, 1987. С.142 – 143.
2. Некоторые вопросы токсичности ионов металлов / Под ред. Х.Зигель и А.М.Зигель. М.: Мир, 1993. С.29; 56 – 57; 144 – 145.
3. Фелленберг Г. Загрязнение природной среды. Введение в экологическую химию: Пер. с нем. М.: Мир, 1997. С.116-117, 142-143.
4. Экологическая химия: Пер с нем./Под ред. Ф.Корте. М.: Мир, 1997. С.13, 256-258, 306.
5. Туманов А.А. Биологические методы определения физиологически активных веществ в объектах окружающей среды / А.А.Туманов, И.А.Китаева, О.В.Барина // Журн. аналит. химии. 1993. Т.48, №1. С.6.
6. Туманов А.А. Биологический метод анализа вещества // Анализ окружающей природной среды: Межвузовский сборник. Горький: ГГУ, 1980. С.3–4.
7. Туманов А.А. Определение микроколичеств некоторых элементов с помощью биологических индикаторов / А.А.Туманов, Н.И.Осипова // Промышленность химических реактивов и особо чистых веществ. М.: ИРЕА, 1964. С.150 – 157.
8. Туманов А.А. Биологический метод анализа: проблемы избирательности и чувствительности определения биологически активных веществ / А.А.Туманов, И.Е.Постнов // Журн. аналит. химии. 2000. Т.55, № 2. С.208-211.
9. Туманов А.А. Ответные реакции микроорганизмов на изменение химического состава среды и трансформация их в аналитический сигнал / А.А.Туманов, М.Н.Глухова, Г.М.Субботина // Журн. аналит. химии. 1998. Т.53, №12. С.1252-1260.
10. Филимонова И.А. Плесневые грибы рода *Aspergillus* как аналитические индикаторы / И.А.Филимонова, А.А.Туманов. Горький, 1973. Вып.3. С.50 – 51.
11. Некоторые культуры тканей как аналитические индикаторы / А.А.Туманов, Л.С.Носова, Л.А.Малкина, Н.И.Осипова // Тр. по химии и химической технологии. Горький, 1968. Вып. 1. С.156 – 160.
12. Туманов А.А. *Lebistes Reticulatus* как тест-объект для целей анализа / А.А.Туманов, Б.Н.Орлов // Труды по химии и химической технологии. Горький, 1974. Вып. 3. С.39 – 40.
13. Актиномицеты как аналитические индикаторы на неорганические ионы / А.А.Туманов, И.Е.Постнов, Н.И.Осипова, И.А.Филимонова // Тр. по химии и химической технологии. Горький, 1974. Вып.3(38). С.37 – 38.

* * * * *

DEFINITION OF MERCURY (II) BY BIOLOGICAL AND PHOTOMETRIC METHODS
 M.V.Koroleva, A.A.Kalugin, A.A.Tumanov, A.D.Zorin

*The technique of biological definition mercury (II) in water solutions is developed. The opportunity of definition biologically active form of mercury (CATHIONS) is shown with application bacteria *Bacillus subtilis niger* as analytical indicators, with using small volume test (0.3 ml). The received results are compared to results of definition mercury (II) by the classical chemical method – PHOTOMETRYA.*