



На правах рукописи

Ермакова Яна Станиславовна

**ОЦЕНКА НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДНОЙ ЭКОСИСТЕМЫ
АЗОВСКОГО МОРЯ С УЧЕТОМ ПРОЦЕССОВ ЕГО ТРАНСФОРМАЦИИ И
БИОГЕННОГО ФОНА**

03.02.08 – Экология (химические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

**Краснодар
2019**

Работа выполнена на кафедре аналитической химии факультета химии и высоких технологий ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет» и Азово-Черноморском филиале ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии»

Научный руководитель: **Корпакова Ирина Григорьевна** –
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Сафарова Валентина Исаевна** – доктор химических наук, профессор, директор управления государственного аналитического контроля Министерства природных ресурсов Республики Башкортостан, г. Уфа;

Сабылина Альбина Васильевна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории гидрохимии и гидрогеологии Института водных проблем Севера Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск

Ведущая организация: **Гидрохимический институт**
Федеральной службы по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды, г. Ростов-на-Дону

Защита диссертации состоится 05 декабря 2019 г. в 16-00 на заседании диссертационного совета Д 212.101.16 при ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет» по адресу: 350040, Краснодар, ул. Ставропольская д. 149, ауд. 3030 Л.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», на сайтах ВАК Минобрнауки РФ <http://vak.ed.gov.ru> и ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет» <http://www.kubsu.ru>.

Автореферат разослан «__» октября 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Киселева
Наталья Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Углеводородное загрязнение пресных и морских водных объектов при проведении мониторинга относят преимущественно к нефтяным загрязнениям антропогенного характера. Экосистема Азовского моря из-за значительной площади водосбора и большого объема водного стока намного быстрее реагирует на колебания антропогенных нагрузок и изменения экологической ситуации, чем другие водные объекты бассейна. Накопление устойчивых компонентов нефтяного загрязнения в воде и донных отложениях изучаемой водной экосистемы представляет серьезную опасность для ее обитателей.

В силу ограниченности понятия «нефтепродукты» суммой неполярных и малополярных соединений, растворимых в гексане, подавляющее число методик определения «нефтепродуктов» в объектах природной среды основано на измерении оптических характеристик углеводородов, таких как поглощение в инфракрасной области спектра или интенсивность люминесценции после их отделения от остальных нефтяных компонентов и мешающих веществ. Следует отметить, что такая оценка фактически не нефтяного, а углеводородного загрязнения исследуемого водного объекта может значительно расходиться в зависимости от использования для регистрации той или иной оптической характеристики. Основными проблемами оценки нефтяного загрязнения являются сложность, неопределенность и постоянная изменчивость его состава при поступлении в воду, а также присутствие в природных водах углеводородов (УВ), продуцируемых водными организмами. Эти углеводороды, называемые биогенными или природными УВ, относятся к постоянным компонентам органического вещества всех геосфер, поскольку входят в состав липидных фракций подавляющего большинства водных организмов. Поэтому адекватная оценка уровня нефтяного загрязнения водной экосистемы возможна только с учетом биогенного (природного) углеводородного фона воды исследуемого объекта, что требует комплексного подхода к регистрации и дифференциации нефтяных и биогенных углеводородов в исследуемой водной экосистеме.

Исследования проводились в рамках выполнения проекта № 4.2612.2017/ПЧ Минобрнауки РФ и гранта РФФИ (№ 16-43-230302p_a) с использованием научного оборудования ЦКП “Эколого-аналитический центр” Кубанского государственного университета.

Цель диссертационной работы - оценка загрязнения водной экосистемы Азовского моря углеводородами различного происхождения с учетом трансформации состава нефти и нефтепродуктов, а также наличия биогенного (природного) углеводородного фона.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

- анализ методических особенностей определения углеводородов в воде;
- изучение генезиса углеводородов в водных объектах Азовского моря;
- изучение качественного и количественного состава углеводородов в липидных фракциях фитопланктона;
- обоснование и разработка методики определения хлорофилла "а" в воде пресных и морских объектов для расчета биомассы фитопланктона;
- оценка загрязненности углеводородами водной экосистемы Азовского моря и их дифференциация.

Научная новизна. В диссертационной работе рассмотрены методологические аспекты оценки нефтяного загрязнения водных экосистем, обусловленные многокомпонентностью и непостоянством состава нефти и нефтепродуктов после поступления в водный объект. Предложен алгоритм оценки нефтяного загрязнения водных экосистем по соотношению углеводородов с различной устойчивостью к процессам трансформации. Выявлены основные типы распределения углеводородов в процессе генезиса парафиновых углеводородов в воде Азовского моря.

Изучен качественный и количественный состав углеводородов, содержащихся в липидных фракциях массовых видов фитопланктона исследуемой водной экосистемы, на основании которого обоснован методический подход по оценке вклада биогенных УВ в загрязнение исследуемой экосистемы по биомассе фитопланктона, рассчитываемой по концентрации в нем хлорофилла "а".

Практическая значимость. Рассмотрены области применимости различных методик определения нефтепродуктов, допущенных для государственного экологического контроля и мониторинга, на примере полученных экспериментальных данных мониторинга нефтяного загрязнения водной среды Азовского моря.

Для оценки вклада биогенных УВ в загрязнение исследуемой экосистемы разработана экстракционно-флуоресцентная методика определения хлорофилла "а" в воде, позволяющая регистрировать концентрации пигмента в диапазоне от 0.1

мкг/дм³ до максимальных значений, встречающихся в природных водах различной тропности. Разработанная методика включена в реестр Федерального информационного фонда по обеспечению единства измерений - ФР.1.31.2019.33562.

Положения, выносимые на защиту:

1. Методическое обеспечение мониторинга нефтяного загрязнения водных экосистем;
2. Генезис углеводов в водной экосистеме Азовского моря;
3. Качественный и количественный состав биогенных углеводов в липидных фракциях фитопланктона;
4. Методика экстракционно-флуориметрического определения хлорофилла "а" в природных (пресных и морских) водах. Результаты апробации разработанной методики определения хлорофилла "а".
5. Схема установления оценки нефтяного загрязнения природных вод с учетом процессов трансформации и происхождения углеводов. Результаты расчета доли биогенных УВ в воде пресных и морских водных объектов, по биомассе фитопланктона, определяемой по концентрации хлорофилла "а".

Апробация работы. Результаты диссертационной работы обсуждались на III Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» с международным участием (г. Краснодар, 2017 г.), 22-й международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века» (г. Пущино, 2018 г.), V Всероссийском симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием (г. Краснодар, 2018 г.), 23-й международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология-наука XXI века» (г. Пущино, 2019 г.), XXI Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (г. Санкт – Петербург, 2019 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК, и 4 тезисов докладов в материалах конференций.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 139 листах машинописного текста, содержит 18 таблиц и 38 рисунков, состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, выводов, списка сокращений, списка цитируемой литературы, состоящего из 177 наименований и приложения.

Личный вклад автора состоял в постановке и выполнении экспериментальных исследований, интерпретации данных, написании статей, подготовке докладов и выступлении на конференциях, практической апробации полученных результатов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснована актуальность работы, сформулированы ее цели и задачи, научная новизна и практическая значимость диссертационного исследования. В **литературном обзоре** анализируются источники углеводородного загрязнения и особенности определения суммарного содержания углеводородов исследуемой водной экосистемы. Показано, что среди многочисленных вредных веществ антропогенного происхождения, попадающих в Азовское море, нефть и нефтепродукты относятся к массивованным источникам загрязнения. Поставщиками углеводородного загрязнения являются речной сток, сточные воды предприятий, сбросы буровых растворов и шламов при бурении нефтегазовых скважин, дампинг загрязненных донных отложений портовых акваторий, атмосферные осадки и эоловые выпадения. Отмечен также вклад грязевых вулканов, расположенных в Темрюкском заливе, которые, при функционировании, неоднократно являлись причиной локального загрязнения моря нефтепродуктами.

Обсуждены проблемы формирования и определения суммарного содержания углеводородного загрязнения с учетом трансформации состава нефти и нефтепродуктов, а также наличия биогенного (природного) углеводородного фона.

В **экспериментальной части** описаны объекты исследования, методики их анализа, обсуждены методические особенности определения углеводородов в воде. Представлены результаты исследования генезиса углеводородов, обнаруженных в воде водных объектов Азовского бассейна и состава углеводородов в липидных фракциях культивированных видов фитопланктона.

В качестве объектов исследования использованы пробы воды, отобранные в акватории Азовского моря в различные сезоны 2015 – 2018 гг. и Курчанском лимане в весенний и осенний периоды 2017 – 2018 гг.

Для определения состава углеводородов в липидных фракциях фитопланктона в качестве исходного материала проанализированы динофитовые, диатомовые, зеленые и сине-зеленые водоросли – *Prorocentrum cordatum* (Ostenf.) Dodge,

Chaetoceros curvisetus Cleve, *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis F. Stain* и *Spirulina platensis*. Для накопления необходимой для анализа биомассы культуры водорослей выращивали на специальных средах и в соответствующих условиях, экспериментально подобранных для каждого вида.

Исследования проводили с использованием стандартных образцов: хлорофилл "a" (SIGMA-ALDRICH «C5753-1мг», США), смесь парафиновых углеводородов в гексане с массовой концентрацией каждого компонента 1000 мкг/см³, («SUPELCO», США).

Хроматографические исследования выполняли на газовом хроматографе «Кристалл 2000М» с пламенно-ионизационным детектором, (ООО «Хроматэк», Россия) и капиллярной хроматографической колонкой размером 30 м x 0.25 мм (фаза NB 1701). Измерения оптических характеристик проводили на спектрофотометре IR-Prestige-21 (Shimadzu, Япония), спектрофлуориметре RF-5301 (Shimadzu, Япония), спектрофотометре UV-2450 (Shimadzu, Япония).

Методические особенности определения углеводородного загрязнения водных объектов

Оценка углеводородного загрязнения водных объектов связана с наличием в них УВ различных классов – парафиновых, нафтеновых, моно- и полициклических ароматических, гибридного строения. Каждый их перечисленных классов УВ обладает различными физико-химическими свойствами – летучестью, растворимостью, интенсивностью химической и биологической деградации и оптическими свойствами.

Многие результаты аналитических определений нефтепродуктов при использовании различных методик не имеют удовлетворительной сходимости, особенно в случаях проведения работ по экологическому мониторингу водных экосистем. Анализ действующих методик определения нефтепродуктов в воде, включенных в Государственный реестр методик и допущенных для государственного экологического контроля и мониторинга, показал, что выбор методики должен зависеть от цели исследования и конкретной ситуации на водном объекте. Преимуществом ИК-спектрометрического детектирования УВ является довольно узкий разброс градуировочных графиков ($\pm 12\%$), но результаты, получаемые этим методом, могут быть завышены при анализе высокопродуктивных водных объектов с

низким уровнем нефтяного загрязнения. Люминесцентный метод, несмотря на существенные погрешности, допускаемые за счет значительного разброса градуировочных графиков, построенных для различных образцов нефти и нефтепродуктов, широко используется в гидрохимической практике, так как фиксирует содержание нефтепродуктов и, что очень важно, наиболее опасных люминесцирующих полициклических ароматических углеводородов, многие из которых обладают мутагенными и канцерогенными свойствами. Метод тонкослойной хроматографии, как стадию подготовки проб к анализу можно использовать как с люминесцентными, так и спектрофотометрическими методиками.

Показано, что при свежих нефтяных разливах целесообразно использовать метод колоночной хроматографии в сочетании с ИК-спектрометрическим детектированием УВ. При анализе хронически загрязненных природных вод предпочтительно использовать хроматографию в тонком слое, так как она позволяет определять не только углеводороды, но и смолисто-асфальтеновые вещества, идентифицировать источник загрязнения по интенсивности и цвету свечения хроматографической зоны углеводородов, фиксировать присутствие биогенных углеводородов по цвету люминесценции хроматографической зоны смолистых веществ.

Значительное превышение результатов ИК - спектрометрического метода, по сравнению с данными люминесцентного метода, позволяет предположить присутствие в исследуемой пробе высоких содержаний фитопланктона – основного продуцента биогенных УВ. В составе биогенных УВ отсутствуют люминесцирующие УВ, но в большом количестве содержатся парафиновые УВ, обеспечивающие интенсивность поглощения в ИК-области спектра.

Существенное превышение результатов люминесцентного метода по сравнению с данными ИК-спектрофотометрического метода характеризует загрязнение как хроническое. Такой вывод связан с более высокой стойкостью к процессам деградации полициклических ароматических УВ, от концентрации которых зависит интенсивность люминесценции полученных элюатов, по сравнению с парафино-нафтеновыми УВ, содержащими в своем составе метиленовые и метильные группы $-CH_2-$ и $-CH_3$, поглощающие в инфракрасной области спектра.

Для сравнительной оценки углеводородного загрязнения, получаемой наиболее распространенными методами анализа, анализировали пробы воды, отобранные в различные сезоны 2016 – 2018 гг. при проведении мониторинга загрязнения Азовского моря. В 2016 г. в большинстве проанализированных проб концентрации УВ, определенные ИК-спектрофотометрическим и люминесцентным методами были сопоставимы и находились на низком уровне, не превышающем предельно-допустимую норму нефтепродуктов – 0,05 мг/дм³, установленную для воды водных объектов рыбохозяйственного значения. В летний период 2017 и 2018 гг. практически во всех проанализированных пробах концентрации УВ, определенные ИК-спектрометрическим методом, были существенно выше результатов, полученных люминесцентным методом. По данным ИК-спектрометрического метода превышение ПДК нефтепродуктов обнаружено в 19 из 32 проанализированных проб (рис. 1, 2).

В осенний период количество таких проб уменьшилось, что может свидетельствовать о снижении количества биогенных УВ, связанного с уменьшением биомассы фитопланктона, особенно в Таганрогском заливе.

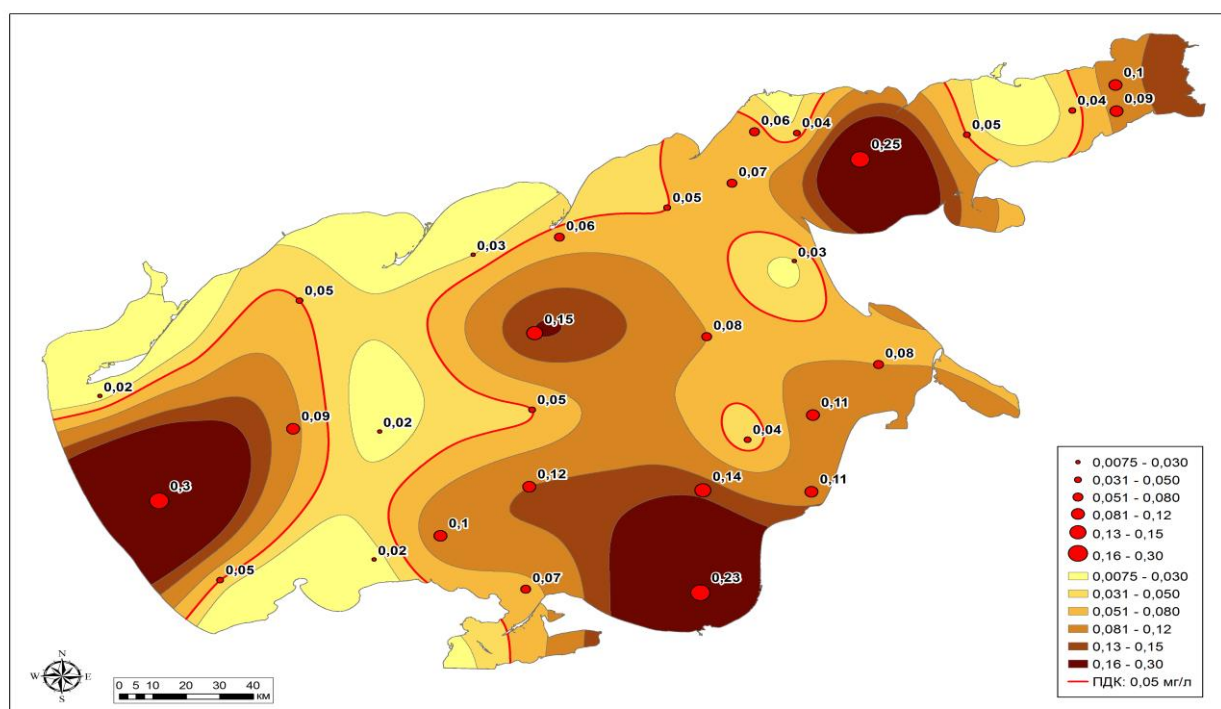


Рисунок 1–Концентрации УВ в воде Азовского моря, полученные летом 2017 г. ИК-спектрометрическим методом, мг/дм³

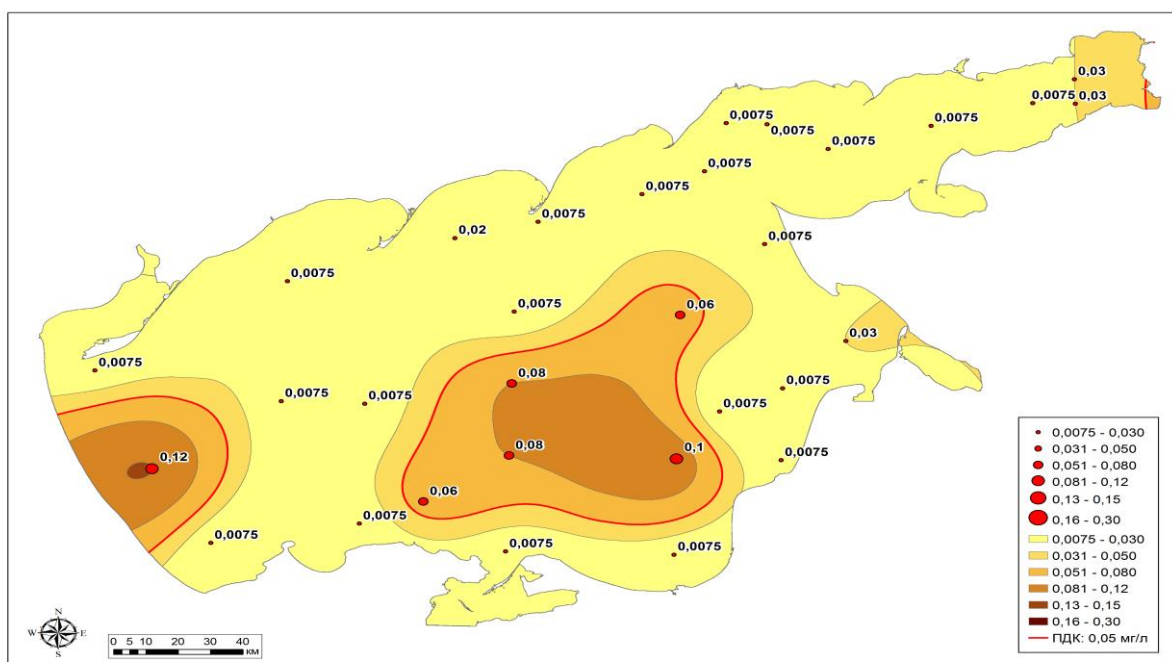


Рисунок 2 – Концентрации УВ в воде Азовского моря, полученные летом 2017 г. люминесцентным методом, мг/дм³

В летний период 2018 г. на всей акватории Азовского моря отмечено преобладание биогенных УВ. В 8-ми из 31-ой проанализированной пробы воды ИК-методом зафиксировано превышение ПДК в 1.2 – 2.8 раза. Люминесцентным методом превышение ПДК в 2.4 раза обнаружено только в одной пробе воды, отобранной летом в восточном районе Таганрогского залива. При этом результаты люминесцентного метода были в 1.5 раза выше данных ИК-спектрометрического метода, что подтверждает хронический характер нефтяного загрязнения, отмеченный в этом районе осенью 2017 г.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о необходимости одновременного измерения двух оптических характеристик углеводородов, выделенных из исследуемых проб воды. Соотношения интенсивностей поглощения в инфракрасной области спектра и люминесценции углеводородов, исходя из их различной устойчивости к процессам трансформации, позволяют использовать полученные данные для оценки характеристики загрязнения.

Генезис углеводородов в водных объектах Азовского бассейна

Поскольку n-алканы являются биологическими маркерами, исследование их состава позволяет получать информацию не только о количестве, но и о генезисе УВ в исследуемом водном объекте. Для идентификации УВ использованы данные

хроматографического анализа *n*-алканов, полученные при анализе проб воды Азовского моря в 2015 – 2018 гг.

Для нефтяных УВ из антропогенных источников при свежем загрязнении характерно монотонное распределение гомологов *n*-алканов в области C₁₄ – C₃₅, при хроническом – наличие «горба» неразделенных нафтено-ароматических соединений. Анализ хроматограмм *n*-алканов, обнаруженных в исследуемых пробах воды, показал, что их условно можно разделить на 4 типа. На рисунках 3, 4 приведены хроматограммы углеводородов, выделенных из воды Азовского моря в различные периоды наблюдений. Отличительными особенностями хроматограмм разных типов являются:

Тип I – Преобладание автохтонных низкомолекулярных *n*-алканов C₁₅ – C₁₈. Присутствие нечетных *n*-алканов, особенно C₁₇, обусловлено преобладанием их в липидных фракциях фитопланктона. Высокое содержание *n*-алканов с четным числом углеродных атомов – C₁₆ и C₁₈ связано с процессами бактериальной трансформации автохтонных УВ.

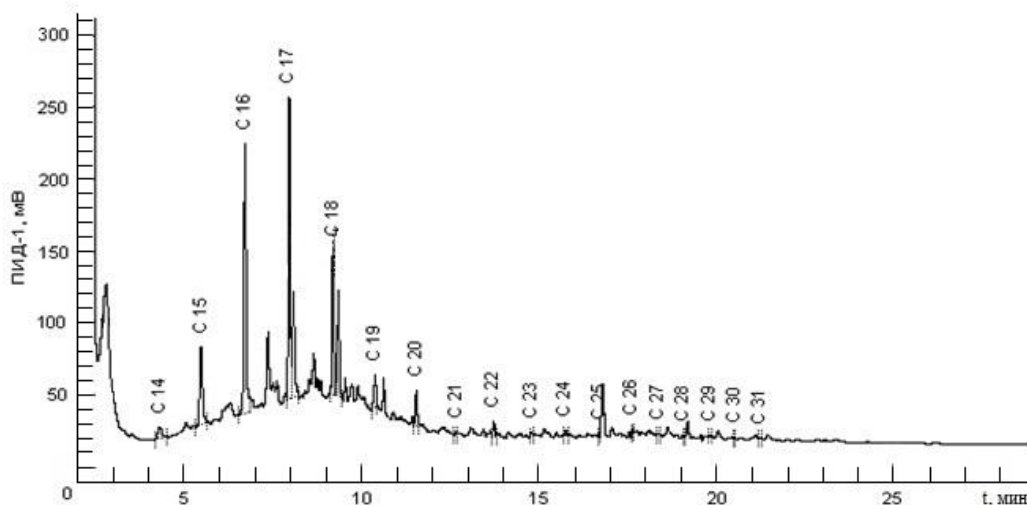


Рисунок 3 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из поверхностного слоя воды Азовского моря в осенний период 2016 г.

Тип II – Преобладание низкомолекулярных и высокомолекулярных четных *n*-алканов – C₁₆ – C₂₈. Хроматограммы такого типа в водной толще Азовского моря фиксируются в довольно большом количестве проб, особенно в летний период. Преобладание углеводородов с четным числом углеродных атомов нехарактерно, как для нефтяных углеводородов, так и для углеводородов, входящих в состав

фитопланктона. Четные *n*-алканы могут быть продуктами бактериальной трансформации органического вещества, а отношение нечетных и четных гомологов в низкомолекулярной области < C₂₂ может служить индикатором интенсивности трансформации УВ микроорганизмами.

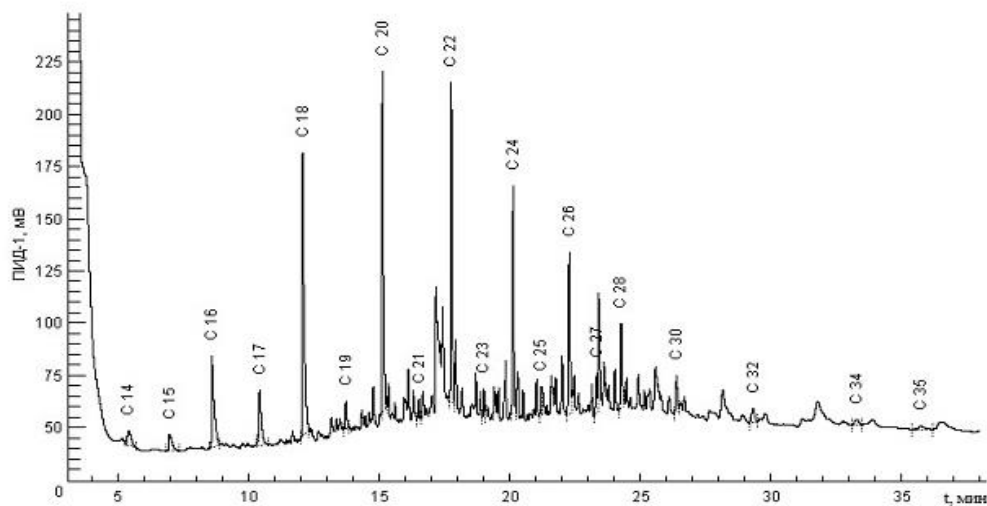


Рисунок 4 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из придонного слоя воды Азовского моря в летний период 2017 г.

Тип III – Наличие гомологического ряда с максимумом C₂₃ – C₂₇ при отсутствии легких УВ и “горба” неразделенных нафтено-ароматических соединений. Поскольку такие составы по критериям не соответствуют ни одному из известных источников, существует предположение, что источником этих УВ, названных “петрогенными УВ”, может быть природное высачивание нефти на дне моря. Петрогенные нефтяные алканы отличаются от антропогенных практически полным отсутствием гомологов до *n*-C₂₃ и нафтено-ароматического «горба».

Тип IV – Высокое содержание *n*-алканов в низкомолекулярной области C₁₆ – C₁₈, а в высокомолекулярной области – монотонное распределение C₂₃ – C₃₁ на фоне “горбов” неразделенных соединений.

Такое распределение связано с одновременным присутствием в пробах воды в сопоставимых концентрациях планктоногенных УВ и трансформированных остатков УВ, источниками которых предположительно могут быть утечки или сливы промывочных и балластных вод из танков нефтеналивных судов, а также аварийные разливы. Следует отметить, что нефтяные УВ способствуют интенсификации

биохимических процессов, в результате которых образуются автохтонные УВ вторичного происхождения, формирующие их современный биогенный фон.

Определение углеводов в липидных фракциях культивируемых видов фитопланктона

При изучении состава УВ в липидных фракциях фитопланктона использовали культуры массовых видов фитопланктона Азовского моря. Определение УВ в липидных фракциях фитопланктона, культивируемых в лабораторных условиях, осуществляли по методикам ФР.1.31.2005.01511 и ФР.1.31.2013.16638 (табл. 1).

Таблица 1– Содержание биогенных УВ в липидных фракциях фитопланктона

Виды фитопланктона	Количество фитопланктона, мг	Содержание липидов, мг	Содержание УВ в липидной фракции, мг	Содержание УВ (мг) в 1 мг фитопланктона
<i>Synechococcus</i> (сине-зеленые)	131	7.26	0.76	0.006
<i>Pr. micans</i> (динофитовые)	187	10.37	0.87	0.005
<i>Ch. curvisetus</i> (диатомовые)	158	7.12	0.61	0.004
<i>Ph. tricornutum</i> (диатомовые)	190	9.45	0.75	0.004
<i>Spirulina platensis</i> (зеленые)	109	6.55	0.72	0.007
<i>Tetraselmis viridis</i> (зеленые)	160	9.91	0.88	0.006

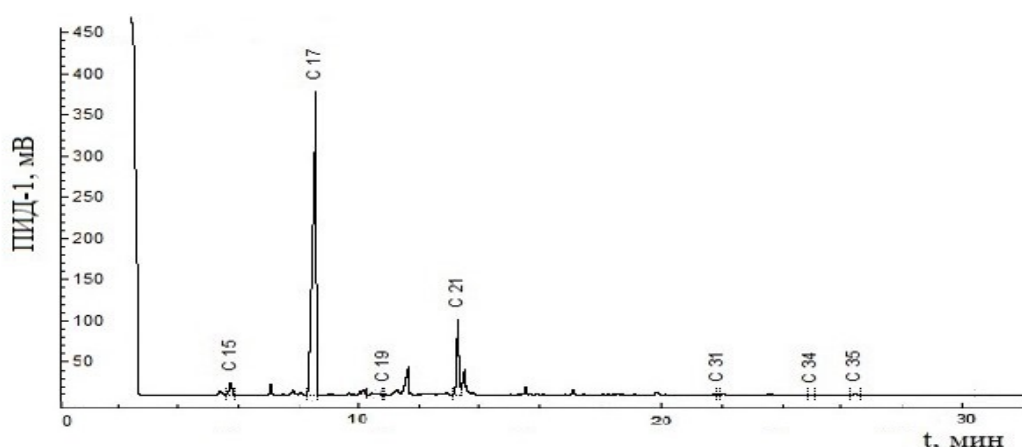


Рисунок 5 – Хроматограмма углеводов, выделенных из культуры сине-зеленой водоросли (*Spirulina platensis*)

Полученные результаты показали, что в 1 мг культивируемых в лабораторных условиях видах фитопланктона содержится от 0.004 до 0.007 мг

биогенных углеводородов. Хроматограммы углеводородов, выделенных из сине-зеленых водорослей *Spirulina platensis* и *Synechococcus* sp., характеризуются преобладанием гептадекана (рис. 5).

В культуре зеленой водоросли *Tetraselmis* F.Stein преобладают нечетные н-алканы C_{17} , C_{21} , C_{25} (рис. 6). Хроматограммы углеводородов, выделенных из культуры диатомовой водоросли *Phaeodactylum tricornutum*, характеризуются преобладанием н-алкана C_{21} , а из диатомовых водорослей *Chaetoceros curvisetus* Cleve - наличием гомологического ряда с максимумом C_{31} . В динофитовых водорослях отмечено монотонное распределение н-алканов в высокомолекулярной области – C_{26} – C_{31} с максимумом при C_{29} .

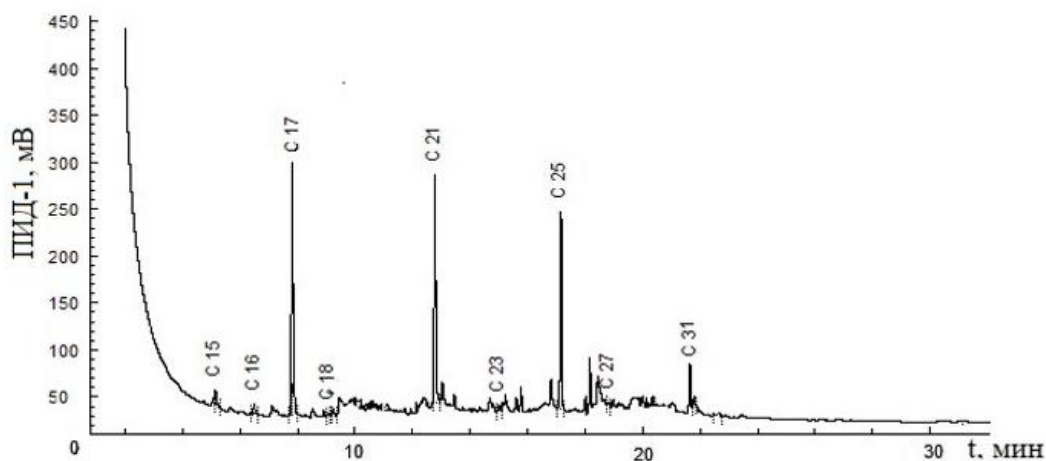


Рисунок 6 – Хроматограмма углеводородов, выделенных из зеленых водорослей (*Tetraselmis*), культивируемых в лабораторных условиях

Определение хлорофилла "а" в морских и пресных водных объектах

Поскольку основными продуцентами биогенных УВ в водной экосистеме Азовского моря являются планктонные организмы, то для количественной оценки содержания биогенных УВ представлялось логичным использовать данные о биомассе фитопланктона и содержании в нем УВ. Основным показателем фотосинтетической активности фитопланктона является концентрация хлорофилла "а".

Выбор условий определения хлорофилла "а" в воде

При анализе природных вод с низким содержанием хлорофилла "а" существующие методы требуют фильтрации больших объемов проб воды. Важным аспектом выбора условий детектирования является обоснование условий

детектирования аналита. Для уменьшения объема проб воды, трудозатрат и повышения чувствительности определения хлорофилла "a" в природных водах была разработана методика, в основу которой положен экстракционно-флуориметрический метод.

Хлорофиллы "b", "c", "d", естественно, в условиях экстракции хлорофилла "a" также извлекаются в органическую фазу. Однако мешающее влияние этих пигментов достаточно мало, поскольку хлорофиллы "c" и "d" в незначительных количествах встречаются в немногочисленных наименованиях водорослей, содержание хлорофилла "d" в водорослях водных экосистем не превышает 3 – 4 % от концентрации хлорофилла "a", а хлорофилла "c" еще ниже. В некоторых видах водорослей, наряду с хлорофиллом "a", присутствует хлорофилл "b", но максимум спектра его флуоресценции сдвинут примерно на 20 нм в более короткую область по сравнению с хлорофиллом "a", поэтому детектированию аналита он не мешает. Важным этапом разрабатываемой методики является выбор растворителя, так как интенсивность флуоресценции, помимо природы аналита и его концентрации, зависит от свойств растворителя, в котором находится флуоресцирующее вещество. Спектры флуоресценции растворов хлорофилла "a" в гексане, четыреххлористом углероде и хлороформе с концентрацией 6 нг/см³, зарегистрированные на спектрофлуориметре RF-5301 PC, при $\lambda_{\text{возб}} = 418$ нм, показали, что наибольшая интенсивность флуоресценции для раствора хлорофилла "a" наблюдается в хлороформе (рис. 7).

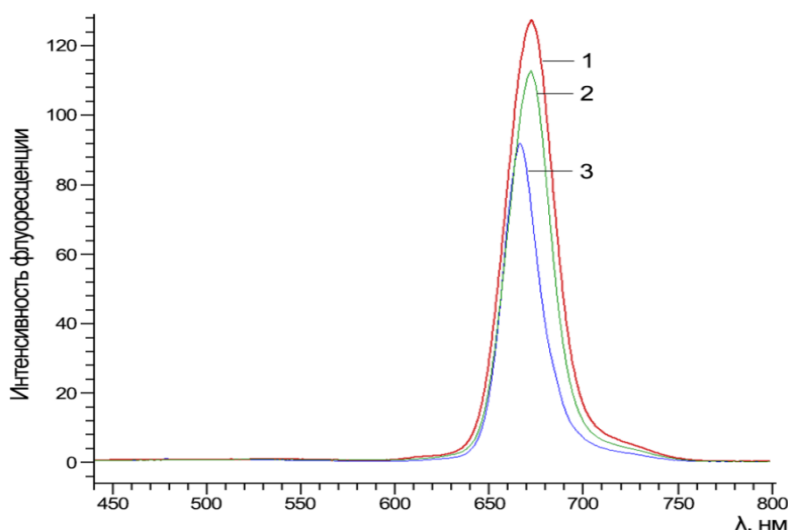


Рисунок 7 – Спектры флуоресценции растворов хлорофилла "a" (концентрация 6 нг/см³) в хлороформе (1), четыреххлористом углероде (2) и гексане (3)

Оптимизацию условий экстракции аналита проводили на модельных пробах, приготовленных на дистиллированной воде с известными добавками хлорофилла "а". После первой экстракции степень извлечения хлорофилла "а" из воды хлороформом варьировала от 55 % до 61 %, второй – от 20 % до 23 %, третьей – от 3 % до 7 %, четвертой – от 2 % до 3 %. При трехкратной десятиминутной экстракции хлороформом объемом по 10 см³ извлекается до 85 % хлорофилла "а", содержащегося в исследуемой пробе.

Таблица 2 – Результаты определения хлорофилла "а" в модельных пробах воды

Введено хлорофилла "а", мкг	Флуориметрический метод		Спектрофотометрический метод (ГОСТ 17.1.4.02-90)	
	Найдено		Найдено	
	С, мкг/дм ³	%	С, мкг/ дм ³	%
0.050	0.042	84	н/обн	-
	0.040	80	н/обн	-
	0.043	86	н/обн	-
0.200	0.210	105	0.330	165
	0.190	95	0.300	150
	0.200	100	0.310	155
0.400	0.400	100	0.560	140
	0.420	105	0.590	148
	0.400	100	0.570	143

Сравнение разработанной экстракционно-флуориметрической и наиболее распространенной стандартной (ГОСТ 17.1.4.02-90) методик определения хлорофилла "а" в пробах воды с известными добавками аналита показало, что добавка 0.05 мкг аналита в 1000 см³ воды обнаруживается только флуориметрическим методом (обнаружено 80-86 % хлорофилла "а"), а спектрофотометрическим методом аналитический сигнал не регистрируется (табл. 2).

При концентрациях хлорофилла "а" выше 0,200 мкг спектрофотометрическим методом регистрируются завышенные значения (142.5 – 165 %), а предлагаемой экстракционно-флуориметрической методикой отмечается удовлетворительная сходимость данных (95 – 105 %).

Сравнение результатов определения хлорофилла "а" по ГОСТ 17.1.4.02-90 и предлагаемой экстракционно-флуориметрической методике проводилось на реальных пробах воды, отобранных в р. Дон, Таганрогском заливе в осенний период 2017 г. и Курчанском лимане весной 2018 г. Расхождения между концентрациями хлорофилла

"a", полученными спектрофотометрическим и флуоресцентным методами в воде Таганрогского залива составили 8 – 13 %, в р. Дон – 21 – 42 %, Курчанском лимане – 11 – 25 % (табл. 3).

Таблица 3 – Результаты определения хлорофилла "a" в воде Таганрогского залива, р. Дон и Курчанском лимане

Место отбора проб	Станция отбора пробы	Концентрация хлорофилла "a", мкг/дм ³		Расхождение результатов %
		Флуоресцентный метод	Спектрофотометрический метод	
Таганрогский залив	1	9.7	10.5	8
	2	7.9	7.3	8
	3	12.2	10.6	13
р. Дон	1	1.1	1.4	21
	2	1.2	1.8	33
	3	1.5	2.6	42
Курчанский лиман	1	9.0	11.3	20
	2	14.3	16.9	15
	3	28.2	31.7	11
	4	19.1	25.2	24
	5	26.8	22.8	15
	6	15.3	11.5	25
	7	51.2	58.1	12

Метрологическая характеристика экстракционно-флуориметрического определения хлорофилла "a" в водах

По результатам проведенных исследований проведена метрологическая аттестация разработанной методики. Предел определения хлорофилла "a" в пресных и морских водах составляет 0.1 мкг/дм³, предел обнаружения – 0.05 мкг/дм³. Методика предусматривает поправочные коэффициенты, учитывающие потери хлорофилла "a" при экстракции анализируемой пробы и последующих стадиях анализа, установленные экспериментально добавлением известных количеств хлорофилла "a" к пробам воды. Поправочный коэффициент при концентрации 0.1 мкг/дм³ равен 1.6, свыше 0.1 до 0.5 мкг/дм³ – 1.5, свыше 0.5 мкг/дм³ – 1.3.

При использовании экстракционно-флуориметрической методики определения хлорофилла "a" объем отбираемой пробы воды может варьировать от 100 до 1000 см³, в зависимости от трофности водоема. При высокой интенсивности флуоресценции экстрактов хлорофилла "a" необходимо проводить его предварительное разбавление для исключения явления концентрационного тушения. Методика экстракционно-флуориметрического определения хлорофилла "a" в природных водах (пресных и

морских) включена в реестр Федерального информационного фонда по обеспечению единства измерений под шифром ФР.1.31.2019.33562.

Определение углеводов с учетом их трансформации и происхождения

С учетом сложности и непостоянства состава компонентов нефти и нефтепродуктов, поступающих в водные объекты, и присутствия природного (биогенного) углеводородного фона, разработана схема анализа нефтяного загрязнения природных вод при проведении экологического мониторинга с учетом процессов трансформации и происхождения углеводов (рис. 8).

Предлагаемая схема анализа позволяет определять по содержанию хлорофилла "а" долю биогенных УВ и по отношению интенсивности поглощения (Е) в ИК-области спектра к интенсивности люминесценции (I) - степень трансформации нефтяного загрязнения. При значениях отношения $E/I < 0,7$ загрязнение характеризуется как хроническое, в интервале 0.7–1.3 – как свежее, а при > 1.3 – свидетельствует о преобладании УВ биогенного происхождения. При свежем загрязнении результаты люминесцентного и ИК-методов различаются в пределах погрешности используемых методик ($\pm 30\%$).

Расчет биогенных УВ (мг/дм^3) рассчитывается по формуле (1):

$$\text{УВ}_{\text{био}} = (\text{Б}_{\text{ф}} \times \text{C}_{\text{ув в фито}}) / 1000 \quad (1)$$

где $\text{C}_{\text{ув в фито}}$ – содержание углеводов в 1 мг липидных фракций фитопланктона (мг);

$\text{Б}_{\text{ф}}$ – биомасса фитопланктона (мг/м^3).

При определении биомассы фитопланктона используется стандартный микроскопический анализ либо ориентировочный расчёт биомассы фитопланктона по формуле Г.Г. Винберга, по которой содержание хлорофилла "а" составляет 2.5 % сухой биомассы фитопланктона, тогда как сухая биомасса составляет примерно 0.1 сырой массы фитопланктона. Исходя из этих данных, расчет биомассы фитопланктона (мг/м^3) проводится по формуле (2):

$$\text{Б}_{\text{ф}} = ((\text{C}_{\text{хл. «а»}} \times 1000) / 2.5) \quad (2)$$

Для расчета биогенных углеводов в полученной биомассе фитопланктона, использовали данные по содержанию УВ в фитопланктоне, представленные в таблице 1.

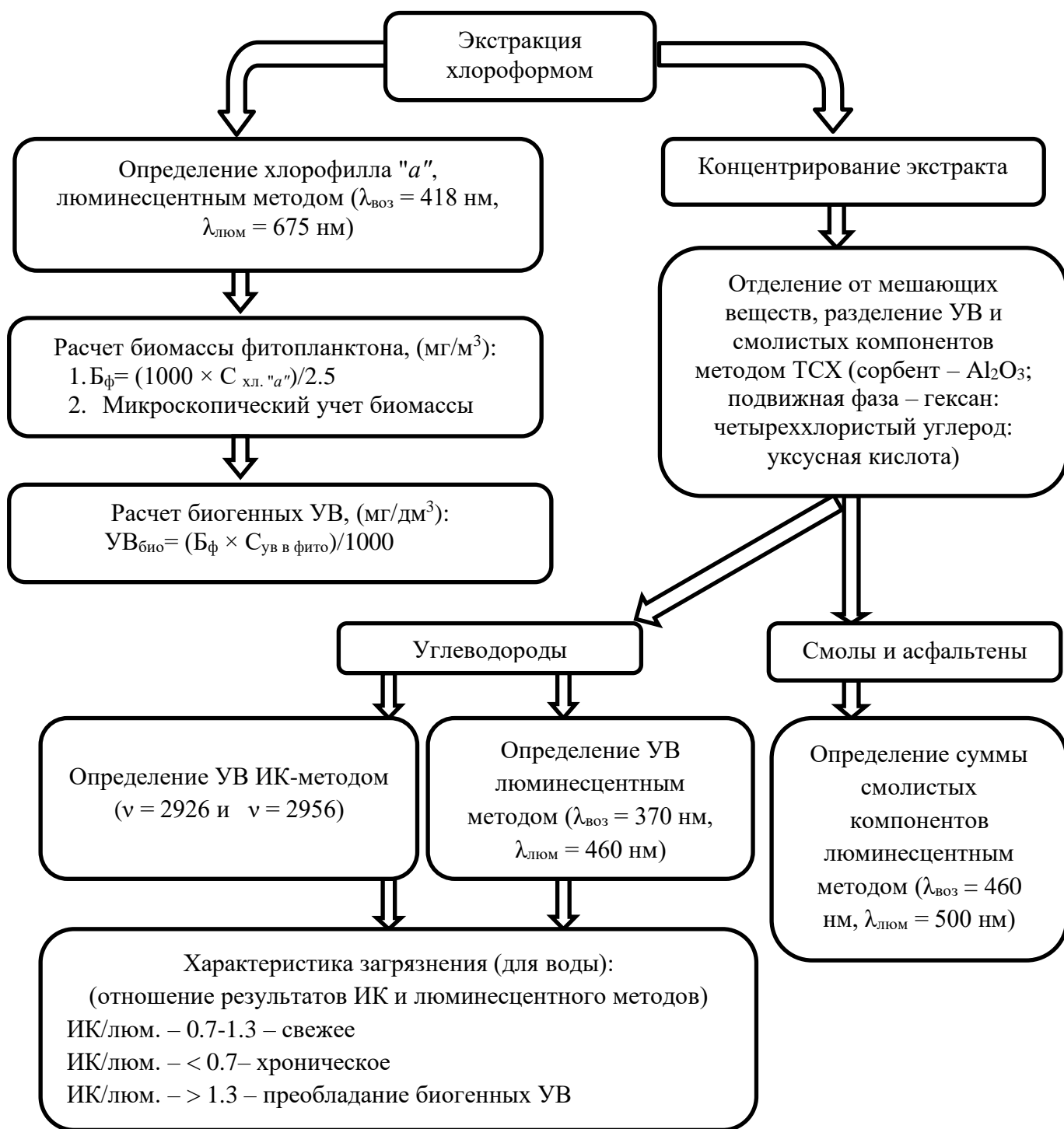


Рисунок 8 – Схема анализа нефтяного загрязнения природных вод с учетом процессов трансформации и происхождения углеводородов

Апробация схемы оценки содержания биогенных углеводородов в пресных и морских водных объектах

В качестве объектов исследования использованы пробы воды, отобранные в Азовском море и Курчанском лимане весной и летом 2017-2018 гг. Проведенные нами исследования показали, что основную массу морского фитопланктона

составляли диатомовые и динофитовые водоросли. Развитие сине-зеленых водорослей было отмечено по всему Таганрогскому заливу, что, в свою очередь, обусловило высокое содержание хлорофилла "а".

В восточной и западной части Таганрогского залива, а также в центральной и западной части собственно моря в летний период 2018 г., было отмечено превышение ПДК, соответственно в 1.2 – 2.2 раза и в 1.2 – 2.8 раза. С учетом биогенного фона максимальные концентрации УВ в воде Таганрогского залива были ниже – 1.8 ПДК, в собственно море – 2.6 ПДК (рис. 9, 10). Вклад биогенных УВ в отдельных пробах воды в общую оценку загрязнения в 2017 г. менялся от 2 % до 38.6 %, в 2018 г. – от 4.5 % до 65.4 %. В Таганрогском заливе доля биогенных углеводородов варьировала от 20 % до 74 % в 2017 г. и от 14 % до 89.2 % в 2018 г. от общей суммы углеводородов.

В акватории Курчанского лимана весной 2017 – 2018 гг. было выявлено преобладание сине-зеленых водорослей (*Snowella lacustris* (Chodat) Komárek & Hindák). Их процентное содержание в общей биомассе фитопланктона варьировало от 69 % до 92 %. Хроматограммы н-алканов, характеризовались доминированием в низкомолекулярной области C₁₇. Содержание гептадекана от общей концентрации н-алканов составляло от 41 % до 64 %.

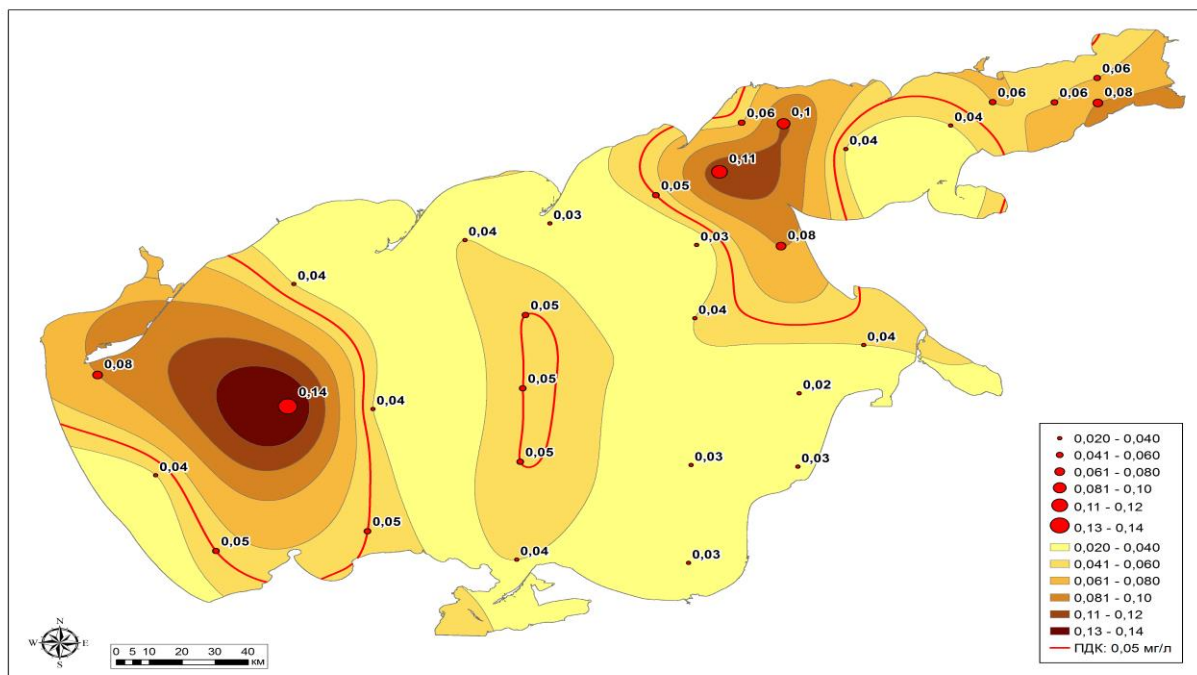


Рисунок 9 – Общая концентрация УВ в акватории Азовского моря, лето 2018 г.

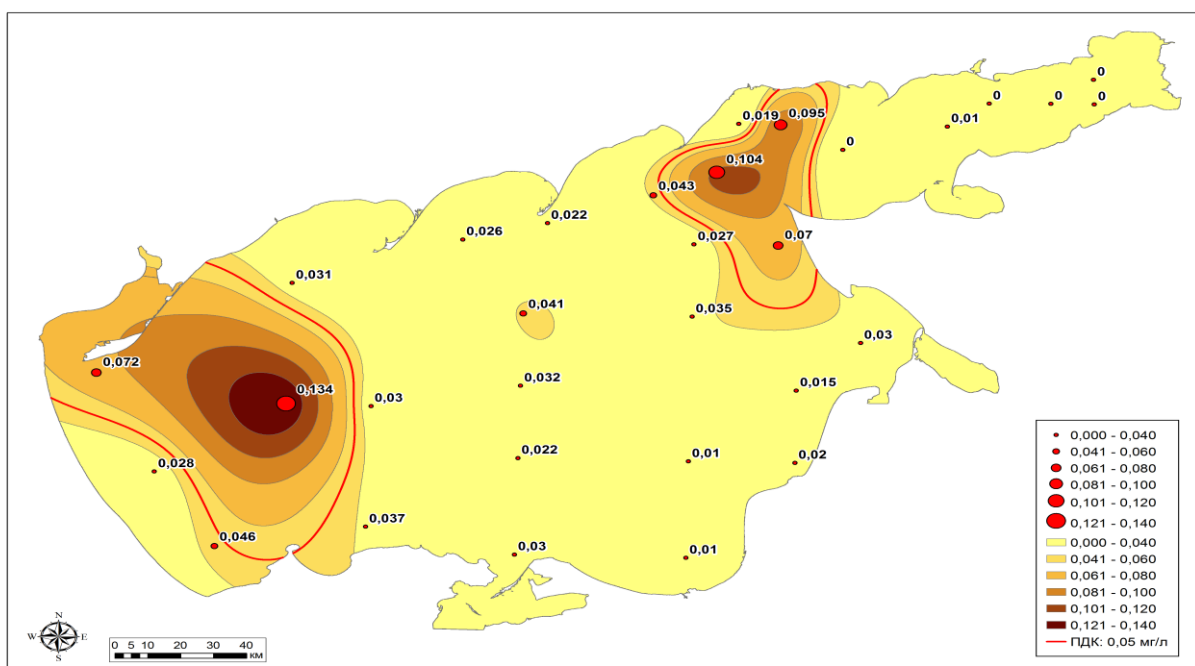


Рисунок 10 – Концентрация УВ за вычетом биогенного фона в акватории Азовского моря, лето 2018 г.

Установлено, что с увеличением биомассы сине-зеленых водорослей возрастает содержание гептадекана. При общей биомассе фитопланктона 20740 мг/м^3 , сине-зеленые водоросли составляли 19132 мг/м^3 , при этом концентрация n-алкана C_{17} составила 22.36 мг/дм^3 , суммарная концентрация углеводородов – 34.74 мг/дм^3 . С уменьшением биомассы сине-зеленых водорослей до 833 мг/м^3 при общей биомассе фитопланктона - 1042 мг/м^3 отмечено снижение концентрации гептадекана до 12.98 мг/дм^3 , при суммарной концентрации углеводородов – 31.65 мг/дм^3 .

Таким образом, для учета биогенных УВ возможно использовать данные о биомассе фитопланктона в исследуемых водных объектах. В период интенсивного цветения водорослей доля биогенных УВ в общей массе углеводородов может достигать 95 %.

Выводы

1. Рассмотрены основные методические особенности оценки нефтяного загрязнения водных экосистем, обусловленные сложностью состава нефти и нефтепродуктов и их трансформацией после поступления в водную среду. На примере анализа методик определения нефтепродуктов, допущенных для государственного экологического контроля и мониторинга, и полученных

экспериментальных данных проб воды Азовского моря рассмотрены области применимости различных методик определения нефтепродуктов в воде. Показано, что оценка уровня загрязнения водной экосистемы может значительно различаться в зависимости от используемой для регистрации оптической характеристики выделенных углеводов и для получения более корректных данных предложено использовать комбинированный метод, включающий одновременное измерение интенсивностей люминесценции и поглощения в ИК-области спектра.

2. Проведена оценка уровня нефтяного загрязнения воды с учетом биогенного (природного) углеводородного фона исследуемых водных объектов. Анализ молекулярного состава парафиновых углеводов в воде Азовского моря позволил выявить четыре основных типа распределения углеводов в водной толще. Для количественного учета биогенных УВ в исследуемой водной экосистеме предложено использовать данные о биомассе фитопланктона и содержании в нем углеводов, так как основными их продуцентами являются планктонные организмы.

3. Изучен качественный и количественный состав углеводов, содержащихся в липидных фракциях массовых видов фитопланктона исследуемой водной экосистемы. Состав УВ, выделенных из разных видов фитопланктона, характеризуется для диатомовых (*Chaetoceros curvisetus* Cleve, *Phaeodactylum tricornutum*) и динофитовых (*Prorocentrum cordatum* (Ostenf.)) водорослей преобладанием C_{21} и наличием гомологического ряда с максимумами C_{29} и C_{31} , для зеленых (*Tetraselmis*) и сине-зеленых (*Synechococcus* sp. (BS 9001), *Spirulina platensis*) водорослей - преобладанием нечетных n-алканов C_{17} , C_{21} , C_{25} . В 1 мг фитопланктона концентрация УВ варьирует от 0.004 мг до 0.007 мг. Обоснован методический подход по оценке вклада биогенных УВ в загрязнение исследуемой экосистемы по биомассе фитопланктона, рассчитываемой по концентрации в нем хлорофилла "a".

4. Для оценки вклада биогенных УВ в загрязнение исследуемой экосистемы разработана экстракционно-флуоресцентная методика определения хлорофилла "a" в воде, позволяющая регистрировать концентрации пигмента в диапазоне от 0.1 мкг/дм³ до максимальных значений, встречающихся в природных водах различной трофности. Разработанная методика (МИ 02067847.09-2018 «Массовая концентрация хлорофилла "a" в природных (пресных и морских) водах») включена в реестр

Федерального информационного фонда по обеспечению единства измерений - ФР.1.31.2019.33562.

5. Предложена унифицированная схема анализа вод для оценки уровня нефтяного загрязнения водных экосистем с учетом трансформации нефтяных компонентов и происхождения углеводородов различного генезиса, которая предусматривает дифференциацию нефтяных и биогенных углеводородов. Предлагаемая схема оценки содержания биогенных углеводородов в пресных и морских водных объектах апробирована на водных объектах Азовского бассейна.

Основное содержание диссертационной работы изложено в публикациях:

1. Темердашев З.А. Методическое обеспечение мониторинга нефтяного загрязнения донных отложений / З.А. Темердашев, Л.Ф. Павленко, Т.Л. Клименко, Я.С. Ермакова, Б.Д. Елецкий // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2016. – № 11. – С. 43 – 46.

2. Темердашев З.А. О некоторых методических аспектах оценки нефтяного загрязнения водных объектов с учетом деградации нефтепродуктов во времени/ З.А. Темердашев, Л.Ф. Павленко, И.Г. Корпакова, Я.С. Ермакова, В.С. Экилик // Аналитика и контроль. – 2016. – Т. 20. – № 3. – С. 225 – 235.

3. Темердашев З.А. Генезис углеводородов в воде и донных отложениях Азовского и Черного морей /З.А. Темердашев, Л.Ф. Павленко, И.Г. Корпакова, Я.С. Ермакова, В.С. Экилик // Экологическая химия. – 2017. – Т. 26. – № 2. – С. 101 – 108.

4. Темердашев З.А. Об ограниченности термина “нефтепродукты” при определении нефтяного загрязнения донных отложений / З.А. Темердашев, Л.Ф. Павленко, И.Г. Корпакова, Г.В. Скрыпник, Т.Л. Клименко, Т.В. Вотина, Я.С. Ермакова // Журнал аналитической химии. – 2017. – Т. 72. – № 10. – С. 952 – 958.

5. Темердашев З.А. Аналитические аспекты определения суммарного содержания и дифференциации антропогенных и биогенных углеводородов в водных экосистемах / З.А. Темердашев, Л.Ф. Павленко, И.Г. Корпакова, Я.С. Ермакова // Журнал аналитической химии. – 2018. – Т. 73. – № 12. – С. 1 – 10.

6. Темердашев З.А. Определение концентраций хлорофилла "а" в природных водах / З.А. Темердашев, Л.Ф. Павленко, Я.С. Ермакова, И.Г. Корпакова, Б.Д. Елецкий // Аналитика и контроль. – 2019. –Т. 23. –№ 3. – С. 323 – 333.

7. Корпакова И.Г. Определение хлорофилла "а" в фитопланктоне и донных отложениях / И.Г. Корпакова, Я.С. Ермакова// Материалы III Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез». – Краснодар, 2017. – С. 84.

8. Ермакова Я.С. Определение концентраций хлорофилла "а" в воде / Я.С. Ермакова, В.С. Экилик // 22-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология-наука XXI века». – Пущино, 2018. – С. 388.

9. Ермакова Я.С. Экстракционно-люминесцентный метод определения хлорофилла "а" в природных водах / Я.С. Ермакова, И.Г. Корпакова // V Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием. – Краснодар, 2018. – С. 247.

10. Ермакова Я.С. Новый метод определения хлорофилла "а" в воде /Я.С. Ермакова, И.Г. Корпакова // XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии. – Санкт – Петербург, 2019. – Т. 4. – С. 267.

Автореферат

Ермакова Яна Станиславовна

**ОЦЕНКА НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДНОЙ ЭКОСИСТЕМЫ
АЗОВСКОГО МОРЯ С УЧЕТОМ ПРОЦЕССОВ ЕГО ТРАНСФОРМАЦИИ И
БИОГЕННОГО ФОНА**

Подписано в печать г. Формат 60x84¹/₁₆.

Бум. тип. № 1. Усл. печ. л. 1,0.

Тираж 100 экз. Заказ №

Издательско-полиграфический центр
Кубанского государственного университета
350040, г. Краснодар, ул. Ставропольская, 149.