

Л. А. Скрбнева, Ф. С. Билалов, И. С. Григорьева

## БИОГЕОХИМИЧЕСКАЯ ИНДИКАЦИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ МЕТОДОМ АПИМОНИТОРИНГА

*Ключевые слова: загрязнение окружающей среды, атомно-абсорбционная спектрометрия, медоносные пчелы, тяжелые металлы.*

*Проанализированы уровни содержания микроэлементов (Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, Cr, Co, Pb, Cd) в 16 образцах медоносных пчел методом атомно-абсорбционной спектрометрии. Целью работы являлось исследование аккумуляции тяжелых металлов в организме пчел различных функционально-возрастных групп. Обнаружены статистически значимые отличия в содержании тяжелых металлов в образцах пчел в зависимости от возраста и принадлежности к функциональной группе. Максимальные концентрации содержали образцы летных пчел. Предложен универсальный показатель для оценки уровня загрязнения территорий тяжелыми металлами.*

*Key words: environmental pollution, atomic absorption spectroscopy, honey bees, heavy metals.*

*The microelements content levels (Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, Cr, Co, Pb, Cd) are studied in 16 samples of honey bees by atomic absorption spectroscopy. The purpose of the work was study of heavy metals accumulation in bee organism of functional-age group. There were found out the statistically significant differences in content of heavy metals in bee samples depending on age and belonging to the functional group. The forager bee samples contained the maximum concentration. The universal index for estimation of territories pollution level by heavy metals was suggested.*

### Введение

На основании анализа литературных публикаций и результатов собственных исследований можно сделать вывод о том, что использование показателей накопления загрязняющих веществ в организме пчел (*Apis mellifera* L.) и продуктах пчеловодства для оценки степени загрязнения окружающей среды (апимониторинг) имеет целый ряд преимуществ перед другими методами, используемыми для контроля загрязнения наземных экосистем (I. Höffel, P. Müller (1983, 1985) [1,2]; Leita et al.(1996) [3]; M. Conti, F. Botre (2001) [4]; C. Porrini et al. (2003) [5]; В. Лебедев, Е. Мурашова (2003) [6]; Е. Еськов и др.(2008) [7]; Ф. Билалов и др. (1992, 2010) [8,9].

Несмотря на то, что показатели накопления тяжелых металлов в организме пчел в мониторинге загрязнения экосистем используются уже порядка двадцати лет, до сих пор не разработано приемлемых критериев для разграничения территорий по классам загрязненности данным способом. Проблема заключается в том, что степень загрязненности территорий с использованием аккумулятивной биоиндикации вообще, и апимониторинга в частности, оценивается на основе сравнения концентраций элементов в пробах из контрольных точек с фоновым значением. В настоящее время отсутствует достаточное количество данных, полученных с использованием унифицированных методик, по фоновым содержаниям микроэлементов в организме пчел.

Аккумуляция тяжелых металлов в медоносных пчелах зависит от многих факторов. Кроме локального загрязнения, на концентрации микроэлементов существенно влияют геохимические особенности региона, ботаническое происхождение потребляемого пчелами корма (нектара и пыльцы), а также породная (расовая) принадлежность медоносных пчел. Кроме этого, содержание микроэлементов в организме рабочих пчел зависит

от возраста и принадлежности к определенной функциональной группе (ульевые пчелы и летные пчелы), что определяется различиями в питании и в степени контакта с атмосферным воздухом. Эти обстоятельства затрудняют интерпретацию результатов мониторинга на основе показателей накопления данных элементов. В предыдущих исследованиях [10] нами была показана зависимость содержания микроэлементов в организме пчел различных временных генераций от сезона отбора проб (зима, лето, осень) и необходимость учета этого фактора. В настоящее время практически отсутствует информация о накоплении тяжелых металлов особями различных категорий рабочих пчел. В связи с этим, целью нашей работы было исследование возможности использования показателей накопления тяжелых металлов в организме пчел различных функционально-возрастных групп для оценки степени загрязнения территорий тяжелыми металлами.

### Материалы и методы исследования

Образцы пчел отбирались на пасеке, расположенной в окрестностях с. Рудник Верхнеуслонского района Республики Татарстан. Расстояние до г. Казань около 20 км, до автомобильной магистрали федерального значения (М7) - 5 км.

Всего было отобрано 16 образцов пчел. Образцы медоносных пчел отбирались два раза в месяц в период с начала июня до начала сентября. Живые летные пчелы собирались у летка во время интенсивного взятка с 12 до 15 часов дня при помощи специального устройства из ПЭТ-пластика. Живые ульевые пчелы стряхивались с рамки, вынутой из улья, в пластиковые пакеты. До анализа пчелы хранились в морозильной камере при температуре -18°C.

Непосредственно перед анализом пчелы, помещенные в чашки Петри, высушивались до постоянного веса в сушильном шкафу при температуре + 60°C в течение 12 часов и до анализа хранились в пакетиках из кальки. Подготовку проб для анализа проводили методом мокрой минерализации по методике А. М. Никанорова и А. В. Жулидова [11], разработанной для беспозвоночных организмов. Для этого в колбу вместимостью 50 мл брали навеску высушенной пробы пчел массой 1 г, приливали 5 мл азотной кислоты (HNO<sub>3</sub>) и 10 мл хлорной кислоты (HClO<sub>4</sub>). Медленно нагревали до завершения спокойного протекания реакции. После прекращения выделения оксидов азота избыток азотной кислоты удаляли повышением температуры раствора. Раствор осторожно выпаривали до начала выделения паров хлорной кислоты. После завершения раствор охлаждали, добавляли 10 мл дистиллированной воды, фильтровали через крупнопористый фильтр в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили дистиллированной водой до метки.

Количественное определение содержания микроэлементов в пробах проводилось методом атомно-абсорбционной спектроскопии на приборе Analyst 400 фирмы Perkin Elmer с пламенной атомизацией. В пробах анализировалось содержание девяти микроэлементов, относящихся к группе тяжелых металлов: Fe, Mn, Zn, Cu, Ni, Cr, Co, Pb, Cd. Статистический анализ результатов проводился с использованием программ Microsoft Excel 2010 и язык R.

### Результаты и обсуждение

В таблице 1 представлены результаты анализа содержания девяти микроэлементов в организме пчел двух функционально-возрастных групп рабочих пчел: ульевых и летных. Эти группы отличаются друг от друга по возрасту, видам выполняемых работ в соответствии с разделением функций внутри пчелиной семьи, составу потребляемого корма и контакту с атмосферным воздухом. Возраст ульевых пчел не превышает 19 дней. В это период своей жизни они выполняют цикл работ внутри улья: прием нектара от летных пчел и переработка его в мед, строительство восковых сотов и выкармливание личинок. Они практически не покидают улья, вылетают на короткое время, в утренние часы на расстояние не более 3-5 метров. Питаются преимущественно пыльцой (источник белка), а также нектаром и медом (источник углеводов). Пыльца в их питании является необходимым компонентом для нормального функционирования восковых желез, а также желез, секретирующих пчелиное молочко (мандибулярных и гипофарингеальных), которым они выкармливают личинок. Начиная примерно с 20-го дня своей жизни, пчелы приступают к сбору нектара и пыльцы, а также прополиса с территории в радиусе 2-3 км от пасеки, хотя иногда могут летать и на большие расстояния, но редко далее 5 км. Летные пчелы в

возрасте старше 19 дней питаются нектаром и медом.

**Таблица 1 - Содержание микроэлементов в пчелах, мг/кг сухого вещества (n – число проб; M – среднее арифметическое, Me – медиана, σ – стандартное отклонение, V – коэффициент вариации)**

| Элемент            | M                   | σ     | Me     | V    |
|--------------------|---------------------|-------|--------|------|
|                    | Ульевые пчелы (n=8) |       |        |      |
| Fe                 | 116,04              | 54,30 | 98,10  | 0,47 |
| Mn                 | 143,41              | 60,68 | 172,06 | 0,42 |
| Zn                 | 82,10               | 10,10 | 79,22  | 0,12 |
| Cu                 | 15,74               | 2,55  | 15,89  | 0,16 |
| Ni                 | 0,48                | 0,30  | 0,42   | 0,63 |
| Co                 | 0,14                | 0,13  | 0,10   | 0,94 |
| Cr                 | 0,85                | 0,59  | 0,78   | 0,69 |
| Cd                 | 0,32                | 0,09  | 0,33   | 0,29 |
| Pb                 | 1,36                | 0,68  | 1,48   | 0,50 |
| Летные пчелы (n=8) |                     |       |        |      |
| Fe                 | 221,55              | 90,73 | 200,74 | 0,41 |
| Mn                 | 240,74              | 61,57 | 250,39 | 0,26 |
| Zn                 | 108,15              | 12,57 | 105,62 | 0,12 |
| Cu                 | 19,05               | 2,56  | 18,37  | 0,13 |
| Ni                 | 0,99                | 0,65  | 0,70   | 0,65 |
| Co                 | 0,50                | 0,55  | 0,28   | 1,10 |
| Cr                 | 1,74                | 0,99  | 1,63   | 0,57 |
| Cd                 | 0,82                | 0,27  | 0,73   | 0,33 |
| Pb                 | 2,55                | 1,23  | 2,68   | 0,48 |

Общая продолжительность жизни рабочих пчел весенне-летней генерации составляет 35-42 дня.

Как было показано в наших работах [12] и исследованиях других авторов [6,13], пыльца по сравнению с нектаром содержит значительно более высокие концентрации микроэлементов, что связано как с естественными факторами (различиями их биохимического состава, а также механизмов образования, сбора и переработки их пчелами), так и со способом и временем контакта с загрязняющими веществами. Загрязняющие вещества могут поступать в организм пчел не только с кормом, но и попадать внутрь организма при вдыхании загрязненного воздуха во время фуражирования, а также адсорбироваться на поверхности тела. Способность к адсорбции загрязняющих веществ, содержащихся в аэрозолях воздуха, в значительной степени связана с тем, что тело пчел, покрытое ответвленными волосками, несет на себе слабый отрицательный заряд электричества. Благодаря высокой летной активности, пчелы, собирающие корм, контактируют с большой территорией вокруг улья и интенсивно накапливают поллютанты из

окружающей среды. Оказавшись в теле пчелы, они частично удаляются с экскрементами и частично аккумулируются в жировом теле и других структурах тела насекомого.

Мы исходили из предположения, что вследствие разницы в питании и степени контакта с атмосферным воздухом эти две группы пчел будут отличаться по содержанию в их организме микроэлементов. Результаты проверки данного предположения с использованием непараметрического критерия Вилкоксона (W) представлены в Таблице 2. Данный критерий применяется для сравнения двух независимых (несвязанных) выборок по своим средним тенденциям и позволяет оценить интенсивность сдвигов значений концентраций в типичном направлении по сравнению с интенсивностью сдвигов в нетипичном направлении. Он непараметрический, т.е. не предполагает нормальности этих выборок. Нулевая гипотеза состоит в том, что распределения двух выборок совпадают. Альтернативная гипотеза - одно из распределений смещено от другого в ту или иную сторону. По данным выборок вычисляется значение критерия W, а также критический уровень значимости  $p$ . Если он принимает малые значения (меньше выбранного уровня значимости), нулевая гипотеза отвергается [14].

**Таблица 2 - Проверка достоверности различий между содержанием микроэлементов в организме пчел различных функционально-возрастных групп по критерию Вилкоксона ( $p$  - критический уровень значимости)**

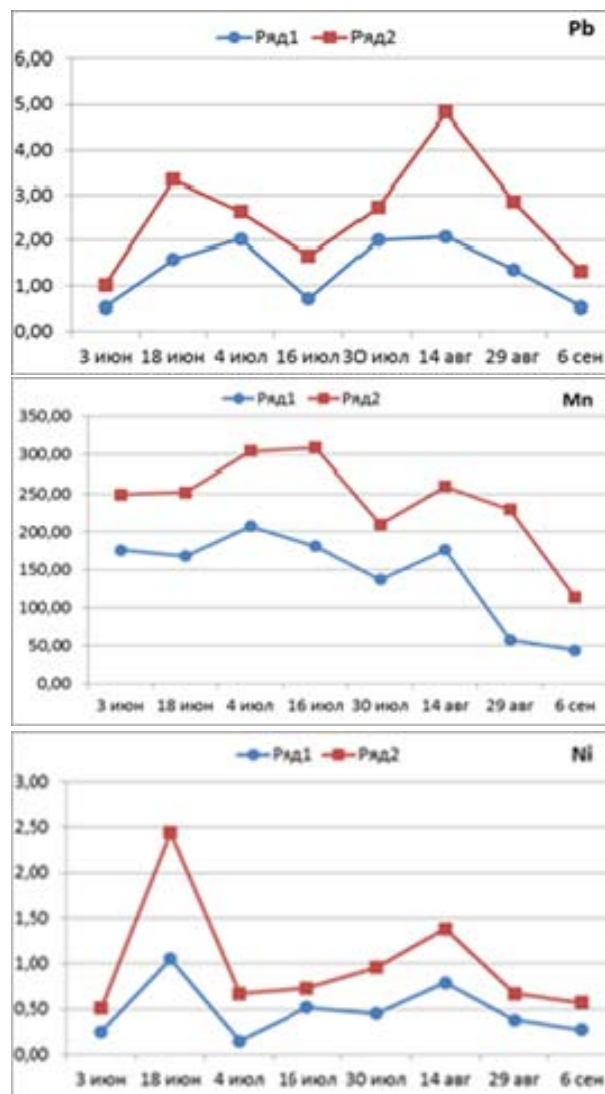
| Элемент | $p$   | Элемент | $p$   |
|---------|-------|---------|-------|
| Cd      | 0,001 | Zn      | 0,001 |
| Pb      | 0,05  | Cr      | 0,07  |
| Co      | 0,02  | Mn      | 0,005 |
| Cu      | 0,02  | Fe      | 0,01  |
| Ni      | 0,04  |         |       |

В результате анализа обнаружилось статистически значимые отличия в содержании большинства микроэлементов в организме пчел, относящихся к разным группам. Концентрации в летных пчелах были выше, чем в ульевых. Наиболее сильно эта закономерность проявляется для кадмия, цинка, марганца и железа ( $p \leq 0,01$ ), в меньшей степени для свинца, кобальта, меди и никеля ( $p \leq 0,05$ ). Наименьшие различия обнаруживаются для хрома ( $p = 0,07$ ). Однако разница в концентрациях варьирует в зависимости от даты отбора проб.

Динамика содержания микроэлементов в течение сезона летной активности представлена на рисунке 1.

Содержание меди в течение сезона в обеих группах пчел колеблется в незначительных пределах. Коэффициент вариации составляет 16% и 13% соответственно для ульевых и летных пчел, то есть не превышает диапазона колебаний для беспозвоночных организмов, отобранных из однотипного местообитания при условии отсутствия техногенных и природных аномалий [15]. Аналогично динамике меди происходит динамика цинка, в этом случае коэффициент вариации еще

ниже: 12% в обеих группах. Содержание марганца колеблется в значительно больших пределах, коэффициент вариации составляет для этих групп 42% и 26%, причем содержание элемента в летных пчелах возрастает пропорционально его содержанию в ульевых. Для всех трех элементов среднее арифметическое значение не превышает медианы, что также указывает на отсутствие каких-либо аномалий.



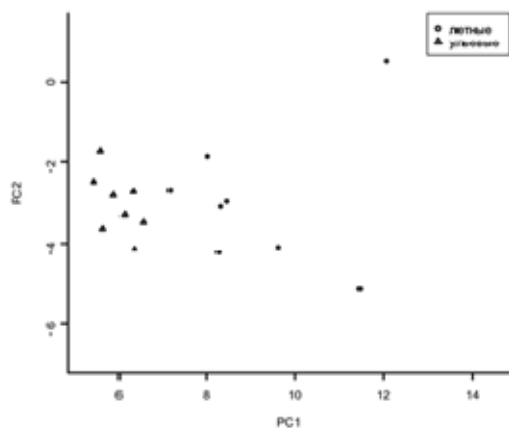
**Рис. 1 – Динамика содержания свинца, марганца и никеля в ульевых пчелах (ряд 1) и в летных пчелах (ряд 2) в зависимости от времени отбора проб (по оси абсцисс – дата отбора, по оси ординат – концентрация, мг/кг сухого вещества)**

Графики остальных элементов можно охарактеризовать следующим образом. Для никеля, кобальта и отчасти хрома характерным является аномальное содержание элемента (более  $M+3\sigma$ ) в летных пчелах в одной и той же точке (18 июня). Для графиков никеля и кобальта в летных пчелах характерно наличие одного большого пика при сглаженной траектории в течение остального сезона с небольшой, но стабильной разницей концентрации у пчел разных групп. В этой же точке фиксируется значительное увеличение в организме

летных пчел железа (график не показан) и свинца. Этот факт свидетельствует о наличии техногенных выбросов в период с 3 по 18 июня.

Особенностью графиков железа и хрома (не показаны на рисунке) являются отсутствие корреляции в содержании микроэлементов в двух изучаемых группах пчел при сохранении общей тенденции более высоких концентраций в организме летных пчел. График свинца отличается от других наличием двух пиков в летных пчелах (18 июня и 14 августа) при наличии четкой взаимозависимости в концентрациях разных групп. График кадмия (не показан) характеризуется двумя пиками 14 и 29 августа в летных пчелах в сочетании с относительно ровной траекторией концентраций в ульевых пчелах. Для графика свинца и кадмия характерен пик концентрации в летных пчелах 14 августа (более  $M+2\sigma$ ), что также свидетельствует о наличии загрязнения этими элементами в данный период.

Для визуализации результатов анализа содержания микроэлементов в образцах мы использовали метод главных компонент (РСА). Метод позволяет уменьшить размерность данных, потеряв наименьшее количество информации, то есть многомерную матрицу представить на плоскости (в нашем случае каждая точка расположена в девятимерном пространстве). Неизбежные при этом искажения данных при проекции на плоскость минимизируются путем подбора оптимального расположения координатных осей. На плоскости первых двух компонент можно выделить два кластера, которые занимают компактные части плоскости (Рисунок 2).



**Рис. 2 – Расположение образцов медоносных пчел на графике двух первых главных компонент (нормировка данных по параметру - стандартное отклонение). Треугольниками обозначены ульевые пчелы, кружками - летные пчелы**

Можно сделать вывод, что кластеризация отражает определенную общность внутри двух функциональных групп медоносных пчел. Причем кластер ульевых пчел в левой части графика более компактен, а, следовательно, более однороден по сравнению с кластером летных пчел. Интересным

представляется обособленное положение двух образцов летных пчел. Это пробы 18 июня и 14 августа. На рисунке 1 можно видеть, что в это время отмечались пики в концентрации свинца и никеля (а также пики хрома, кобальта и кадмия, не представленные на рисунке).

Анализ доступных публикаций по теме показал, что данные по содержанию микроэлементов в медоносных пчелах различных категорий крайне ограничены и касаются в основном четырех элементов: цинка, меди, свинца и кадмия. В. Лебедев и Е. Мурашова (2003) [6] исследовали зависимость содержания тяжелых металлов в теле пчел от возраста и способа питания. По их данным, содержание тяжелых металлов в организме пчел резко возрастает в первые две недели жизни, то есть когда они выполняют цикл внутриульевых работ. Концентрация цинка и меди возрастает соответственно в 9,1 и 11,6 раза по сравнению с молодыми (3-дневными) особями. Переход пчел к сбору нектара и пыльцы приводит к дальнейшему увеличению содержания элементов, но не столь резко. Среднее содержание элементов в организме пчел из контрольной семьи составляло (мг/кг) (первая цифра – ульевые пчелы, вторая – летные): цинка - 103,9/169,36; меди – 39,7/55,98; свинца – 1,01/1,9; кадмия – 0,27/0,73. Наши цифры по содержанию цинка и меди ниже, кадмия – аналогичны, а свинца – несколько выше обнаруженных. У летных пчел из рассматриваемого эксперимента концентрация цинка и меди увеличилась соответственно на 63% и 41% по сравнению с ульевыми пчелами. В нашем исследовании среднее содержание цинка и меди в пчелах этих двух функциональных групп увеличилось соответственно на 32% и 21%.

Теми же авторами в результате 10-дневного эксперимента было обнаружено, что содержание свинца в летных пчелах из улья, расположенного на расстоянии 150 м от автомагистрали, составляло 3,22 мг/кг, а на расстоянии около 1000 м – 0,21 мг/кг. В нашей работе минимальная обнаруженная концентрация свинца в летных пчелах составила 2,09 мг/кг, максимальная - 4,83 мг/кг.

V. Liakos et al., (2002) [16] изучали влияние атмосферного загрязнения свинцом на популяционную динамику и развитие пчелиных семей. Содержание свинца в меде и пыльце было значительно выше в промышленной зоне по сравнению с сельской. Та же самая зависимость отмечалась для пчел разного возраста. В промышленной зоне концентрация свинца в 6-дневных личинках составляла 4,05 мг/кг, в молодых, выходящих из ячеек пчелах – 5,9 мг/кг, в ульевых пчелах – 8,8 мг/кг и в летных пчелах – 6,8 мг/кг. В пчелах из сельских районов концентрации свинца составляли соответственно 1,0; 1,9; 1,9 и 0,7 мг/кг. Содержание свинца в ульевых пчелах было выше, чем в летных. Это не соответствует результатам наших исследований и результатам авторов предыдущей рассмотренной работы в части соотношения содержания микроэлементов в этих функциональных группах. Тем не менее,

минимальная концентрация в сельской зоне составляла 0,7; максимальная 1,9; в то время как в нашей работе 0,53 и 4,83.

Таким образом, сравнение с имеющими данными других авторов подтверждает отсутствие в нашем эксперименте техногенного привноса цинка и меди и факт повышенного содержания в пробах свинца.

Результаты наших исследований позволяют выделить достаточно надежный и информативный показатель для разграничения территорий по степени загрязнения атмосферного воздуха. Таким показателем (коэффициентом) является  $KC = C1/C2$ , где  $C1$  – концентрация элемента в пробе летных пчел;  $C2$  – концентрация элемента в пробе ульевых пчел. Этот показатель не зависит от геохимических особенностей региона, ботанического происхождения потребляемого пчелами корма (нектара и пыльцы), а также породной (расовой) принадлежности медоносных пчел. Его величина зависит только от степени загрязнения атмосферного воздуха. Кроме атмосферного пути поступления контаминантов в пыльцу и нектар может иметь место и почвенное загрязнение [3,17]. Наряду с атмосферными выпадениями, длительное применение удобрений и мелиорантов может приводить к изменению микроэлементного состава почв и формированию относительно устойчивых биогеохимических аномалий. Поскольку кроме аэрозолей атмосферного воздуха, тяжелые металлы могут поступать в организм пчел при питании загрязненным нектаром и прежде всего пыльцой, ульевые пчелы из зон техногенного загрязнения также могут содержать эти элементы в повышенных концентрациях. Однако при вычислении предложенного коэффициента этот фактор нивелируется, поскольку для пчел, отобранных из одного улья, это влияние будет равнозначным.

### Заключение

Результаты исследований обнаружили наличие статистически значимых отличий в степени аккумуляции микроэлементов медоносными пчелами двух различных функционально-возрастных групп. Концентрации элементов в образцах летных пчел были выше, чем в ульевых.

Содержание большинства проанализированных элементов в образцах этой категории пчел характеризовалось значительно более высокой степенью вариабельности и наличием аномально высоких значений. Это отличие связано с различиями в степени контакта с атмосферным воздухом.

Результаты исследований позволяют выделить достаточно надежный и информативный показатель для разграничения территорий по степени загрязнения атмосферного воздуха тяжелыми металлами. Таким показателем является отношение содержания элемента в пробе летных

пчел к его содержанию в пробе ульевых пчел. Этот показатель не зависит от геохимических особенностей региона, ботанического происхождения потребляемого пчелами корма (нектара и пыльцы), а также расовой принадлежности медоносных пчел.

Для конкретного местообитания наличие техногенного загрязнения было выявлено для никеля, хрома и кобальта и в меньшей степени для железа, свинца и кадмия. Содержание марганца, цинка и меди находилось в пределах их естественных колебаний. Для разработки градации территорий по классам загрязнения с использованием предложенного показателя требуются дополнительные исследования на основе анализа большего количества образцов пчел, отобранных из различных местообитаний.

### Литература

1. I. Höffel, P. Muller, *Forums Stadte – Hygiene*, **34**, Juli/August, 191 – 193 (1983)
2. I. Höffel, *Apidologie*, **16**, 3, 196 – 197 (1985)
3. L. Leita, G. Muhlbachova, S. Cesco, R. Barbattini, *Environmental Monitoring and Assessment*, **43**, 1, 1 – 9 (1996)
4. M. Conti, F. Botre, *Environmental Monitoring and Assessment*, **69**, 267 – 282 (2001)
5. C. Porrini, A. Sabatini, S. Girotti, S. Ghini, P. Medrzycki, F. Grillenzoni, L. Bortolotti, E. Gattavecchia, G. Celli, *Apiacta*, № 38, 63 – 70 (2003)
6. В. И. Лебедев, Е. А. Мурашова, *Пчеловодство*, № 4, 42 – 44 (2003).
7. Е. К. Еськов, Г. С. Ярошевич, М. Д. Еськова, Г. А. Кострова, Г. М. Ракипова, *Пчеловодство*, № 2, 14 – 16 (2008)
8. Ф. С. Билалов, Б. И. Колупаев, Ю. С. Котов, С. С. Мухарамова, Л. А. Скребнева, *Пчеловодство*, № 9/12, 4 – 6 (1992).
9. Ф. С. Билалов, Л. А. Скребнева, В. З. Латыпова, М. Н. Мукминов, О. Р. Бадрутдинов, *Апимониторинг в системе контроля загрязнения окружающей среды*. Изд-во КГУ, Казань, 2010. 264 с.
10. Л. А. Скребнева, Ф. С. Билалов, М. Н. Мукминов, В. З. Латыпова, И. С. Григорьева, *Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки*, **154**, кн. 1, С. 133-145.
11. А. М. Никаноров, А. В. Жулидов. *Биомониторинг металлов в пресноводных экосистемах*, Гидрометеоздат, Москва, 1991. 312 с.
12. Ф. С. Билалов, Б. И. Колупаев, Л. А. Скребнева. В сб. *Эколого-токсикологическая характеристика г. Казани и пригородной зоны*, Изд-во КГУ, Казань, 1991. С. 78 – 86.
13. Л. А. Осинцева, *Пчеловодство*, № 3, 10 – 11 (2004)
14. Е. В. Гублер, А. А. Генкин. *Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях*, Медицина, Ленинград, 1973. 142 с.
15. А. Д. Покаржевский. *Геохимическая экология наземных животных*. Наука, Москва, 1985. 230 с.
16. V. Liakos, Z. Polyzopoulou, N. Roumpies, *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, **53**, 3, 219-227 (2002)
17. B. Raeymaekers, *Environmental Monitoring and Assessment*, **116**, 233 – 243 (2006)