

## Комплексное биотестирование нефтезагрязнённых почв

Н.А. Киреева, Т.Р. Кабиров, И.Е. Дубовик  
Башкирский государственный университет

Предпринята попытка разработать комплексную тест-систему для многофакторной оценки состояния почв, подвергшихся нефтяному загрязнению. Используются различные группы организмов и изменения в активности почвенных ферментов для диагностики токсикометрических показателей нефтезагрязнённых почв.

Investigation was held to maintain a complex biotest system for indication of oil polluted soils toxicity levels for different groups of organisms. Soil enzymes, plants, soil animals, bacteria and algae were tested for there co-operative response for oil pollution. A pattern was observed, allowing approximate evaluation of oil polluted soil condition based on this biotests.

Нефть является одним из наиболее распространённых загрязнителей окружающей среды. Большие объёмы нефти попадают в экосистему в результате аварий при транспортировке, незаконных врезок в нефтепроводы, нарушений при добыче и т. д. Не являясь ксенобиотиком, нефть при извлечении из недр на поверхность земли, способна, тем не менее, проявлять сильные загрязняющие свойства. Попадая в почву, нефть оказывает токсическое воздействие на растения и животных, подавляет активность почвенной микробиоты и нарушает баланс почвенных ферментов [1]. В этой связи остро стоит проблема диагностики токсического влияния нефтяных углеводородов на многоуровневую экосистему почв.

На сегодняшний день одним из важнейших инструментов предупреждения и оценки антропогенного воздействия на экосистему является биомониторинг. Биотестирование, биоиндикация и экотоксикология, наряду с методами аналитической химии, позволяют построить наиболее полную картину деградации почв, загрязнённых нефтяными углеводородами. Принцип биоиндикации строится на том, что каждый организм в отношении любого действующего фактора обладает уникальным физиологическим диапазоном реакции. В то же время на каждую конкретную группу организмов будет влиять множество факторов, помимо исследуемого, которые не всегда возможно учесть. Наиболее рациональным является использование комплексного биотестирования, учитывающего изменения в балансе почвенных экзоферментов, микроорганизмов и водорослей, а также токсиметрии высших растений и животных.

При построении комплексной тест-системы для оценки токсичности почвенного покрова мы руководствовались следующими принципами: тест-система должна иметь представителей двух трофических уровней – автотрофов и гетеротрофов; кроме того, в её составе должны быть представители из основных царств живого – бактерий, грибов, растений, животных; тест-система должна включать тест-организмы, хорошо растущие в лабораторных условиях; организмы, обладающие высокой чувствительностью к исследуемым загрязнителям природной среды и такие тест-реакции тест-объектов, регистрация которых не требует использования сложной и дорогостоящей аппаратуры, но в то же время несущих достаточный объём информации [2].

Основываясь на перечисленных принципах и лабораторных исследованиях, нами были отобраны следующие факторы и тест-объекты, достоверно отзывающиеся на внесение загрязнителя – почвенные ферменты (каталаза и липаза), активности которых определяются по методам, описанным Ф.Х. Хазиевым [3], и легко диагностируются и дополняют друг друга. Водоросли являются важным компонентом автотрофного звена комплекса почвенных микроорганизмов [4]. Критерием степени нарушения почвенных ценозов является показатель изменения их видового разнообразия [5], определённый по принятым в альгологии методам [6, 7]. Высшие растения – овёс посевной (*Avena sativa L.*) и редис (*Raphanus sativa L.*) относятся к эукариотам, автотрофам, продуцентам. Овёс наряду с редисом и кресс-салатом является одним из наиболее часто используемых для биотестирования организмов с хорошо изученной биологией и экологией [8].

Влияние нефтяного загрязнения на высшие растения определялось с использованием стандартных методик [9]. Степень зоотоксичности нефтезагрязнённой почвы определяли с использованием ногохвосток (*Collembola*) – одной из наиболее многочисленных и широко распространённых групп педобионтов, используемых, в последнее время для оценки степени антропогенной нагрузки [10]. Два вида коллембол: 1 – *Folsomia candida* – неприхотливый, быстро размножающийся вид, удобный для быстрой оценки степени зоотоксичности; 2 – *Onychiurus stachianus* – вид характеризуется менее подвижными и более крупными особями, которыми легко манипулировать и вести подсчёт. Соответствующими тест-реакциями явились: для ферментов – относительная активность, для цианобактерий и микроскопических водорослей – видовое разнообразие, для высших растений – всхожесть семян и морфометрические характеристики растений, выращенных на исследуемых почвах. Для коллембол – процент выживаемости, значения  $LC_{50}$  и  $LC_{100}$ , способность к размножению.

Несмотря на то что каждый из перечисленных объектов достаточно стабильно реагировал на изменение концентрации поллютанта и теоретически позволял достаточно точно определить степень загрязнения, часто реакции разных тест-объектов противоречили друг другу. Вероятно, это связано с тем, что в процессе биodeградации различные промежуточные продукты распада углеводов могут быть более токсичны для одних организмов и менее или нетоксичны для других; также возможны ситуации, когда вещества А и В не токсичны по отдельности, но, присутствуя в среде одновременно, они могут оказать

остро токсическое действие на живые организмы. В наших исследованиях довольно стабильными оказывались реакции ферментов для разных концентраций нефти в пределах одного типа почвы, но значительно изменялись для другого из-за различий в контрольной активности, температуре и влажности, и наоборот, ногохвостки стабильно реагировали на наличие поллютанта, независимо от типа почвы. При проведении экспериментов по фитотоксичности у высших растений энергия прорастания семян и морфометрические характеристики зависели от величины эндосперма. Количество углеводородоокисляющих микроорганизмов зависело от наличия аборигенных видов и видов, внесённых в процессе биоремедиации. Нами выявлены некоторые закономерности по согласованной реакции тест-объектов на загрязнитель и ведётся дальнейшая работа по поиску тест-комплексов для быстрого и достоверного биотестирования нефтезагрязнённых почв.

Предполагается пошаговая диагностика почв с возможным нефтяным загрязнением. Сначала целесообразно провести экспресс-оценку *in situ* на изменение каталазной активности, фито- и зоотоксичности. Эти тесты просты и дают быстрые результаты. Если наблюдается значительное отклонение каталазной активности от контрольного или от фонового значения для данного типа почв, или если в течение 24 часов появились мертвые особи, или нарушение жизнедеятельности коллембол, или недостаточная всхожесть семян, почву следует признать условно загрязнённой и направить в лабораторию для проведения более полного и длительного биотестирования. Также всегда целесообразно направить образцы в лабораторию аналитической химии для определения компонентного состава загрязнителя.

В лабораторных и полевых условиях была сделана попытка выявить в достаточной мере достоверные закономерности реакций почвы и её обитателей на загрязнение нефтью, которые можно было бы экстраполировать на другие зоны с аналогичными условиями и ожидать там похожих тенденций в изменении токсической активности.

Использование коллембол оказалось одним из наиболее простых и в то же время результативных способов оценки почвенной токсичности. В отличие от некоторых других оценочных факторов между зоотоксичностью и концентрацией нефти наблюдалась практически линейная зависимость. По результатам нескольких исследований была построена

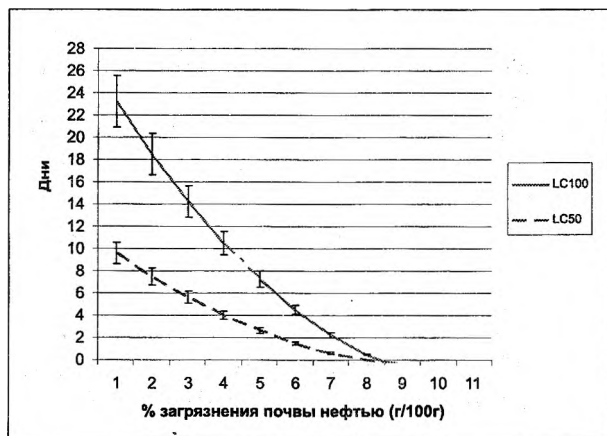


Рис. 1. Зависимость величин летальной и полулетальной дозы для коллембол *Onychiurus stachianus* от концентрации загрязнителя (1 мес. после загрязнения нефтью, чернозем)

кривая, характеризующая зависимость концентрации нефти от сроков наступления  $LC_{50}$  и  $LC_{100}$  (летальная концентрация, при которой гибнет 50 и 100% особей соответственно). В данном случае эти величины использовались как накопительные, например, если за 4 дня в колонии в результате жизнедеятельности накапливалось количество поллютанта, летального для половины особей, а за 10 дней – для 100%, то количество нефти в почве составляло 3-4% (рис. 1).

Наиболее достоверная зависимость между концентрацией загрязнения и наступлением гибели 50 и 100% особей достигалась примерно через месяц после загрязнения, так как в это время токсический эффект наблюдался в течение длительного периода времени и диагностируемые величины достигали наибольшего разброса по временной шкале. В то время как в первые недели после загрязнения отравление и гибель коллембол наступали уже на 1-2 суток, а по прошествию 2-3 месяцев величины  $LC_{50}$  и  $LC_{100}$  обычно вообще не достигались. Как и многие биотесты, приведённые значения применимы для концентрации загрязнителя до 10%. Нами также предпринята попытка создания единого коэффициента для определения концентрации и давности загрязнения по показаниям зоотоксичности, но ввиду невозможности учёта большого количества факторов и недостаточного объема выборки на данный момент достоверный вариант не был найден.

Исследования фитотоксического влияния нефти показали, что нефтяное загрязнение в значительной мере ингибирует рост и развитие растений. Выявлена зависимость от концентрации нефти в почве таких параметров, как всхожесть семян, вес и длина проростков, развитие корневых волосков. Отмечено, что при массовой доле нефти 1% фитотоксический эффект практически незаметен. В то же время при более высоких концентрациях на-

блюдалось значительное отставание всхожести семян и развития растений от контрольных параметров. Наиболее выраженный фитотоксический эффект наблюдался при использовании почвы, недавно подвергшейся нефтяному загрязнению.

В диагностических целях были выбраны почвенные ферменты – каталаза и липаза, так как ферментативная активность почв – это один из показателей её биологической активности, характеризующий потенциальную способность экосистемы сохранять гомеостаз. Выбор ферментов был обусловлен различной их реакцией на нефтяное загрязнение и довольно простым способом регистрации результатов. Выявлено, что попадание в почву нефти даже в концентрации 1% существенно ингибировало каталазную активность. Чем выше количество поллютанта, тем значительнее снижалась активность этого фермента. При концентрациях средних и выше среднего (4-10%) активность каталазы восстанавливалась медленно и возвращалась к контрольному уровню только спустя 1,5-2 года. В то же время при малых концентрациях активность каталазы восстанавливалась уже через 6 месяцев и продолжала нарастать, опережая контрольные значения и оставаясь повышенной в течение длительного времени (рис. 2А).

Динамика изменения липолитической активности нефтезагрязнённых почв имела иной характер. Активность почвенной липазы при нефтяном загрязнении сначала резко падала, но уже через 2-3 месяца достигала контрольного значения и длительное время оставалась на высоком уровне, причем стимуляция активности липазы происходила пропорционально концентрации загрязнителя (в диапазоне до 15%), так же как и её ингибирование сразу после контаминации. Таким образом, при мониторинге величин активности этих двух ферментов в почвах с возможным загрязнением можно получить следующие

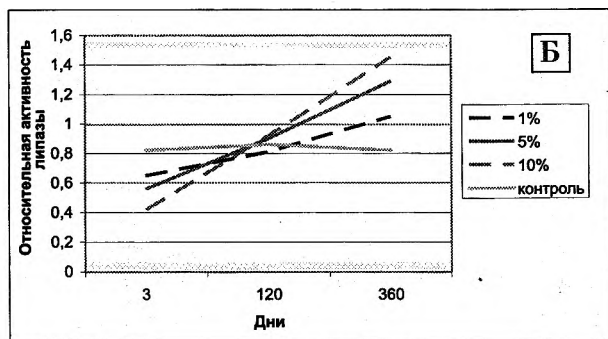
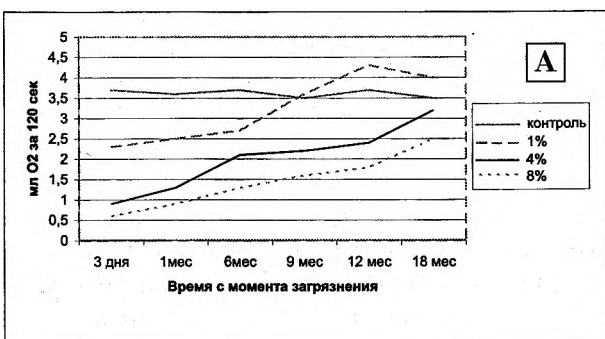
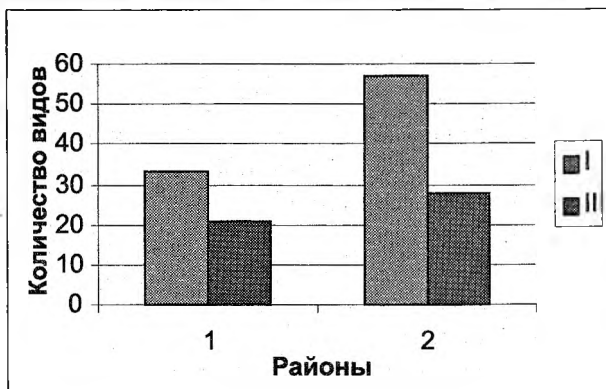


Рис. 2. Динамика изменения каталазной (А) и липазной (Б) активности со временем в почвах с разными дозами нефтяного загрязнения.



**Рис. 3.** Число видов водорослей в почвенных пробах нефтяных месторождений (I – ненарушенный участок – контроль/ II – техногенно-нарушенный участок): 1 – Уфимский район; 2 – Краснокамский район)

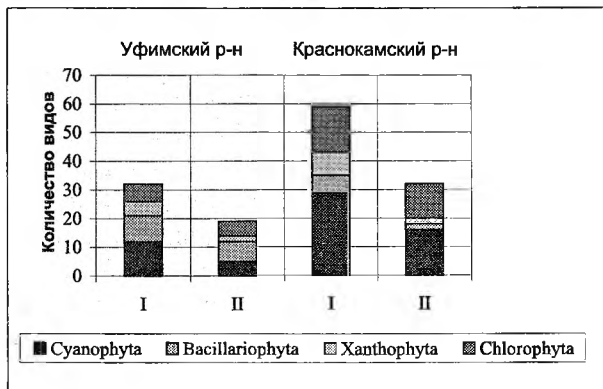
результаты: 1 – активности обоих ферментов ниже нормы. Это говорит о том, что загрязнение произошло не раньше, чем несколько месяцев назад, и чем ниже показатели, тем оно интенсивнее. 2 – уровень каталазы ниже, а липазы выше контрольного. С начала загрязнения прошло больше 3-4 месяцев, и в зависимости от соотношения активностей двух ферментов можно сделать предварительную оценку концентрации и сроков загрязнения. 3 – активности обоих ферментов слегка выше контрольных. Скорее всего, с момента загрязнения прошло больше шести месяцев, и концентрация поллютанта не превышала 2-3%.

Весьма интересные данные были получены при изучении видового разнообразия водорослей и цианобактерий в почвах нефтяных месторождений.

За весь период исследований на территории нефтяных месторождений Уфимского и Краснокамского районов обнаружено 82 вида водорослей из четырех отделов: синезелёные – 32 (39%), зелёные – 25 (30,5%), желто-зелёные – 11 (13,5%), диатомовые – 14 (17%), относящиеся к 8 классам, 13 порядкам, 25 семействам, 46 родам. Основная часть разнообразия почвенной альгофлоры выявлена на контрольных участках (74 вида, или 88%). Общими с нефтезагрязнёнными территориями являются 37 видов, или 44% выявленной на месторождениях альгофлоры.

Видовое разнообразие водорослей в контроле всегда превышало этот показатель на нарушенном участке. В Уфимском районе эта разница составляет 39,4%, а в Краснокамском – 50% (рис. 3).

В альгоценозах нефтезагрязнённых почв выявлено меньше видов водорослей (на 43%), чем в контроле, из них синезелёных –



**Рис. 4.** Число видов в отделах водорослей альгоценозов (на оси ординат) на контрольных (I) и техногенно-нарушенных (II) участках

на 23 %, зеленых – на 15%, диатомовых – на 57% и желто-зелёных – на 77% (рис. 4).

Среднее число видов в пробе ненарушенных альгоценозах в 2,7 раза выше (на 37 %), чем в нарушенных. Коэффициент сходства флористического состава Серенсена-Чекановского изученных альгоценозов нефтяных месторождений составляет 37%.

Биотестирование позволяет выявить распределение участков почвенного покрова с различной токсичностью, обусловленной как воздействием промышленных предприятий за длительный отрезок времени, так и одновременными попаданиями поллютанта в экосистему в результате аварий или утечек. По результатам биотестирования составляется карта токсичности почвенного покрова обследованной территории. Второй этап предусматривает ежегодную оценку токсичности почвы в ключевых точках. Биотестирование почвенного покрова позволит контролировать динамику накопления и разрушения токсических веществ. В конечном итоге это характеризует процессы самоочищения почвы.

Следует отметить, что биоиндикация и биотестирование нефтезагрязнённых почв рационально могут быть использованы при малых и средних концентрациях загрязнителя, до 10-15%, выше которых для большинства тест-объектов наступают абсолютно летальные концентрации. Это вполне оправдано, т. к. сильнозагрязнённые территории легко выявляются органолептически, в то время как биотестирование позволяет провести экспресс-оценку природной среды и выявить наличие загрязнения там, где это не так очевидно, но, тем не менее, губительно для экосистемы и требует рекультивационных мероприятий.

**Литература**

1. Киреева Н.А., Водопоьянов В.В., Мифтахова А.М. Биологическая активность нефтезагрязнённых почв. Уфа: Гилем, 2001. 376 с.

2. Кабиров Р.Р., Киреева Н.А., Кабиров Т.Р. Принципы составления модельных тест-систем для оценки качества окружающей среды // Актуальные проблемы регионального экологического мониторинга: научный и образовательный аспекты: Мат-лы Всеросс. научной школы, Киров, 2006. – С. 173-174.

3. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. М.: Наука, 2005. 252 с.

4. Штина Э.А. Почвенные водоросли как компонент биогеоценоза // Почвенные организмы как компоненты биогеоценоза. М.: Наука, 1984. С. 66-81.

5. Ашихмина Т.Я., Домрачева Л.И., Кондакова Л.В., Дабах Е.В., Кантор Г.Я., Калинин А.А., Вараксина А.И., Огородникова С.Ю. Эколого-аналитический

мониторинг антропогенно-нарушенных почв // Вестник ВятГГУ. 2006. №14. С. 153-169

6. Кузяхметов Г.Г., Дубовик И.Е. Методы изучения почвенных водорослей: учебное пособие. Уфа: Изд-во БашГУ, 2001. 56 с.

7. Кабиров Р.Р. Альготестирование и альгоиндикация (методические аспекты, практическое использование). Уфа: БашПИ, 1985. 112 с.

8. Кабиров Р.Р., Сагитова А.Р., Суханова Н.В. Разработка и исследование многокомпонентной тест-системы для оценки токсичности почвенного покрова городской территории // Экология. 1997. №6. С. 408-411.

9. Бабьева И.П., Зенова Г.М., Биология почв М.: МГУ, 1989. 336 с.

10. Ханисламова Г.М. Использование коллембол для лабораторной оценки токсичности загрязняющих почву соединений // Проблемы охраны окружающей среды на Урале. Межвуз. сб. научн. трудов. Уфа, 1995. С. 152-157.

УДК 577.4+576.809

## **Чувствительность к арсениту натрия тест-организмов, используемых в многокомпонентной системе биотестирования качества природных сред**

**В.Н. Чупис, Е.А. Луцкай, И.Н. Ларин, А.А. Загреков, Е.В. Ильина, Д.Е. Иванов**  
ФГУ Государственный научно-исследовательский институт промышленной экологии

Приведены результаты оценки влияния арсенита натрия в растворах различных концентраций на интенсивность биолуминесценции бактерий, смертность дафний и цериодафний, хемотаксическую реакцию инфузорий, двигательную активность дафний, рост хлореллы и флюоресценцию хлорофилла водоросли сценедесмус. Наибольшая чувствительность к арсениту натрия отмечена у дафний и цериодафний. Сделан вывод о целесообразности использования низших ракообразных при проведении экологического мониторинга предприятий по переработке арсенита натрия.

The results of an estimation of influence of natrium arsenite in solutions of various concentration on intensity of bioluminocity of bacteria, mortality of daphnia and ceriodaphnia, chemotaxic reaction of infusoria, impellent activity of daphnia, growth of chlorella and scenedesmus alga chlorophyll fluorescence are given. The greatest sensitivity to natrium arsenite is found for daphnia and ceriodaphnia. The conclusion about expediency of use lowest crayfishes in ecological monitoring of the enterprises on natrium arsenite processing is made.

**Введение**

Арсенит натрия образуется в процессе уничтожения боевого отравляющего вещества люизита на специальных заводах по уничтожению химического оружия (Белов и др., 2006). Для проведения эффективного биомониторинга зоны влияния опасных химических предприятий, занимающихся переработкой солей мышьяка, принципиальное значение имеет выбор тест-объек-

тов, имеющих выраженные реакции на эти вещества.

В настоящее время для проведения экотоксикологического анализа природных сред применяется система биотестов, как правило, включающая тест-организмы различных систематических групп (Кабиров и др., 1997). Достоверность оценки обеспечивается первоочередным использованием методик биотестирования, допущенных для целей государственного экологического контроля.