

УДК 574

ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ТОКСИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВЫ НЕФТЕПРОДУКТАМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Васильев А.В.¹, Заболотских В.В.

Тольяттинский государственный университет, г. Тольятти
e-mail: ¹avassil62@mail.ru

Тупицына О.В.², Штеренберг А.М.

Самарский государственный технический университет, г. Самара
e-mail: ²olgatupicyna@yandex.ru

Аннотация. Рассматриваются методы экологического мониторинга токсического загрязнения почв нефтепродуктами на основе использования различных тест-объектов. Авторами были проведены экспериментальные исследования по определению степени токсичности почв, загрязнённых нефтепродуктами, с использованием биологических тест-объектов: семян растений-индикаторов, зеленой протококковой водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) и рачков *Daphnia magna* Straus. В результате опытов была установлена степень токсичности почв. Проведенные исследования подтверждают эффективность использования методов биотестирования для определения токсического загрязнения почв нефтепродуктами.

Ключевые слова: токсическое загрязнение, почва, нефтепродукты, мониторинг, биотестирование, тест-объекты

Введение

Нефтепродукты обладают высокой степенью токсичности и представляют большую опасность как для человека, так и для биосферы в целом [1, 2, 4, 6].

Загрязнение почвы нефтепродуктами может привести к целому ряду негативных последствий:

- нарушению экологического равновесия в почвенном биоценозе;
- негативному воздействию на живые организмы в почве;
- угнетению или деградации растительного покрова;
- изменению структуры почвы, уменьшению аэрируемости и дренажа;
- снижению продуктивности сельскохозяйственных земель и др.

Для эффективного устранения последствий загрязнения почвы нефтепродуктами необходимо проводить оценку и контроль загрязнений. При этом можно выделить группы нефтепродуктов, различающиеся:

- степенью токсичности по отношению к живым организмам;
- скоростью разложения в окружающей среде;
- особенностями наступивших изменений в биосфере.

При загрязнении почвы нефтепродуктами необходимо учитывать, что почва как среда обитания составляет единую систему с населяющими ее популяциями.

ми разных организмов. Загрязнение почвы вызывается различными по масштабу и территориальному распространению поллютантами, влияющими на почву, почвенную биоту, совокупное состояние почвенной экосистемы.

В настоящее время существует ряд подходов к проведению экологического мониторинга токсического загрязнения почв, при этом в силу высокой стоимости и технологической сложности и стоимости применение ряда из них оказывается ограниченным. Эффективным подходом для определения степени токсичности почв, загрязнённых продуктами переработки нефти, является использование методов биотестирования.

Биологический мониторинг, предполагающий использование организмов-индикаторов или целых сообществ для оценки экологических условий (чаще загрязнений среды человеком) является одной из разновидностей мониторинга состояния биосферы и ее отдельных компонентов.

В настоящее время существует ряд современных подходов к проведению биотестирования токсичности почв (например, молекулярно-биологические тесты качества среды), но в силу высокой технологической сложности и стоимости их применение оказывается ограниченным. Эффективным и сравнительно недорогим подходом для определения токсичности почв, загрязнённых продуктами переработки нефти, является использование методов биотестирования.

Биотестирование может эффективно использоваться для оценки токсичности тех или иных компонентов, вносимых в биосферу. Токсичность среды обитания устанавливается с использованием биологических объектов (тест-организмов) для выявления степени токсичности тех или иных веществ или их суммарного воздействия.

Биотестирование основано на исследовании эффективности гомеостатических механизмов живых организмов, которые способны уловить присутствие стрессорного воздействия раньше, чем многие обычно используемые методы. В оптимальных условиях организм реагирует на воздействие среды посредством сложной физиологической системы буферных гомеостатических механизмов. Эти механизмы поддерживают оптимальное протекание процессов развития. Под воздействием неблагоприятных условий механизмы поддержания гомеостаза могут быть нарушены, что приводит к состоянию стресса. Такие нарушения можно определить при оценке факторов воздействия, что и составляет основу метода биотестирования.

В основе экологического мониторинга токсического загрязнения почвы с использованием биологических тест-объектов лежит представление о том, что почва как среда обитания составляет единую систему с населяющими ее популяциями разных организмов. Загрязнение почвы вызывается различными по масштабу и территориальному распространению поллютантами, влияющими на почву, почвенную биоту, совокупное состояние почвенной экосистемы. Загрязнение поч-

вы может повлиять на ее структуру, на порозность и плотность горизонтов, что может привести к уменьшению аэрируемости и дренажа. Это приводит к затруднению прорастания семян и проникновения корней в почву, замедлению роста корней и побегов. Для определения этих изменений используется широкий набор биологических методов [1 - 4, 6].

В настоящей статье авторы описывают особенности и результаты мониторинга токсического загрязнения почвы нефтепродуктами методами биотестирования на основе собственных подходов.

1. Биотестирование токсического загрязнения почв нефтепродуктами на основе прорастания семян растений-индикаторов

Биологические тесты на прорастание семян успешно применяются для установления воздействия различных физиологически активных веществ. Биологические пробы применимы и для токсикологической оценки различных компонентов окружающей среды, особенно почв. Обычно в качестве тест-объектов используют мелкие семена (льна, кресс-салата, мака, рыжика, укропа и др.). Для достоверной оценки применяют не менее трех тестов с разными видами семян. Лучше использовать свежесобранные семена, так как на лежалых семенах развивается сапрофитная микрофлора и при прорастании в условиях влажных камер (колбы, чашки Петри, пробирки) они могут загнивать и выбывают из опыта.

С целью профилактики семена протравливают. Сухие семена погружают в 1 %-й раствор марганцовокислого калия на 0,5 часа, а затем промывают дистиллированной водой, используя два слоя марли, обсушивают на фильтровальной бумаге на воздухе.

Предлагаемый нами метод биотестирования токсичности субстратов по проросткам различных растений-индикаторов имеет три варианта:

I. Выращивание растений на субстратах, токсичность которых надо оценить (почва, вода).

II. Полив проростков испытываемыми растворами (вытяжка из почвы или сточные воды различных предприятий) с той или иной степенью их концентрации и очистки.

III. Накалывание испытываемого раствора между семядолями двудольных растений.

В первых двух вариантах применяют самые различные тест-растения (в зависимости от поставленной задачи): пшеница, овес, ячмень, проростки древесных пород.

В качестве тест-растений в третьем варианте используют только проростки двудольных: кресс-салата, салата майского, редиса и др.

В наших исследованиях мы провели биотестирование различных образцов почв, определяя их фитотоксичность методом проростков. Метод основан на

реакции тест-культуры на наличие в почве загрязняющих веществ. Позволяет выявить токсичное (ингибирующее) действие тех или иных веществ или стимулирующее влияние, активизирующее развитие тест-культур. В ходе опыта фиксируются всхожесть, энергия прорастания, длина надземной и корневой систем, масса сухого вещества надземной и подземной части.

На основании данной методики нами были проведены экспериментальные опыты по определению фитотоксичности почвы, загрязнённой нефтепродуктами. Мы определяли влияние продуктов переработки нефти (бензин «Калоша») на рост семян растения индикатора кресс-салата. Определялась токсичность почвы, загрязнённой нефтепродуктами по комплексу морфологических и физиологических признаков кресс-салата.

Было взято три равных по массе образца почвы: серая лесная, почва около заправочной станции и почва, загрязнённая нефтепродуктами (бензин). Высаживали по 16 семян кресс салата *Lepidium sativum* L.. Опыты проводили в трехкратной повторности. Периодически производился полив равными количествами отстоянной водопроводной воды. Через семь суток растения были извлечены из почвы. В течение опыта велись наблюдения по следующим показателям:

1. время появления всходов и их число на каждые сутки;
2. общая всхожесть (к концу опыта);
3. измерение длины надземной части (высота растений);
4. измерение длины корней.

В результате опытов была выявлена фитотоксичность почвенных образцов № 2 и № 3, загрязнённых нефтепродуктами (рис. 1 и 2). Образец № 2 показывает, что почва, взятая у заправочной станции более токсична, вероятнее всего загрязнена не только нефтепродуктами, но и солями тяжёлых металлов, что требует дополнительных исследований.

Ранняя диагностика степени загрязнения почв, использующая в качестве тест-системы проростки кресс-салата, может успешно применяться для оперативной оценки влияния нефтепродуктов, солей и других загрязняющих веществ на активность прорастания и развития тест-растений. В нашем примере, при повышении концентрации нефтепродуктов в почве замедляется прорастание семян и снижается их всхожесть.

Этот метод можно также успешно применяться и для диагностики загрязнения почв агрохимикатами в сельском хозяйстве. Сравнение загрязнённой гербицидами почвы со стандартными субстратами, на которых производят выращивание тест-растений позволяет оценить воздействие на почвенные организмы не только гербицидов, но и других средств защиты растений (фунгицидов, инсектицидов и др.) и оценить влияние комбинированного применения средств защиты растений.

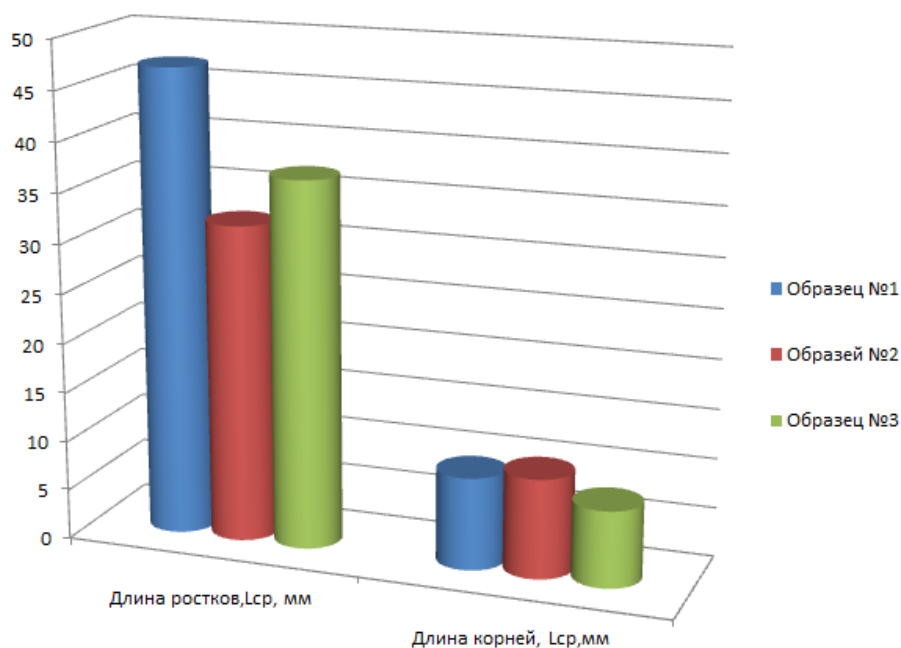


Рис. 1. Морфологические показатели средней длины ростков и корней тест-растений, выращенных на различных образцах почвы в опыте № 1:

образец № 1 – серая лесная почва;
образец № 2 – почва возле заправочной станции;
образец № 3 – почва, загрязнённая нефтепродуктами

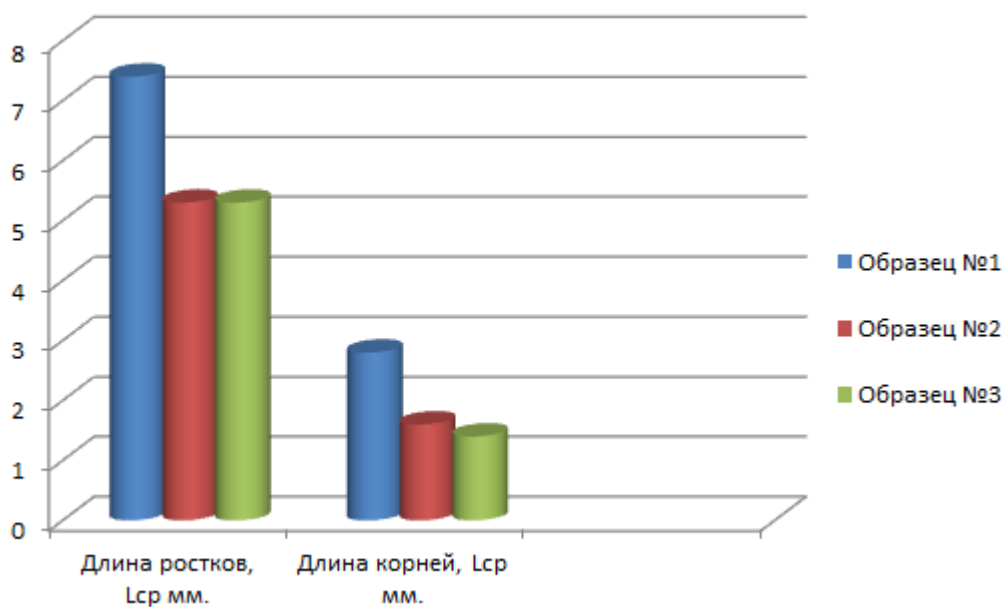


Рис. 2. Морфологические показатели средней длины ростков и корней тест-растений, выращенных на различных образцах почвы в опыте № 2:

образец № 1 – серая лесная почва; образец № 2 – почва возле заправочной станции;
образец № 3 – почва, загрязнённая нефтепродуктами

3. Биотестирование токсического загрязнения почвы с использованием в качестве тест-объектов зеленой протококковой водоросли хлорелла и рачков *Daphnia magna Straus*

В качестве тест-объектов для проведения исследований по токсическому загрязнению почвы нефтепродуктами также целесообразно использовать зеленую протококковую водоросль хлорелла (*Chlorella vulgaris Beijer*), ПНД Ф 14.1:2:4.10-04, 16.1:2:3:3.7-04, и рачки *Daphnia magna Straus*, ПНД Ф Т 14.1:2:4.12-06, 16.1:2:3:3.9-06.

Методика определения острой токсичности проб по изменению оптической плотности тест-культуры зеленой протококковой водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris Beijer*) основана на регистрации различий в оптической плотности тест-культуры водоросли хлорелла, выращенной на среде, не содержащей токсических веществ (контроль) и тестируемых проб поверхностных пресных, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных вытяжек из почвы, осадков сточных вод и отходов (опыт), в которых эти вещества могут присутствовать. Измерение оптической плотности суспензии водоросли позволяет оперативно контролировать изменение численности клеток в контрольном и опытном вариантах острого токсикологического эксперимента, проводимого в специализированном многоцветном культиваторе. Критерием токсичности воды является снижение на 20 % и более (подавление роста) или увеличение на 30 % и более (стимуляция роста) величины оптической плотности культуры водоросли, выращиваемой в течение 22 часов на тестируемой воде по сравнению с ее ростом на контрольной среде, приготовленной на дистиллированной воде.

Методика ПНД Ф Т 14.1:2:4.12-06, 16.1:2:3:3.9-06 основана на определении смертности дафний (*Daphnia magna Straus*) при воздействии токсических веществ, присутствующих в исследуемой среде, по сравнению с контрольной культурой в пробах, не содержащих токсических веществ (контроль).

Острое токсическое действие исследуемой на дафний определяется по их смертности (летальности) за определенный период экспозиции. Критерием острой токсичности служит гибель 50 % и более дафний за 48 часов в исследуемой пробе при условии, что в контрольном эксперименте все рачки сохраняют свою жизнеспособность.

Было проведено биотестирование проб почвы, взятых на территории бывшего ОАО "Фосфор"(г.о. Тольятти). Использовались вышеуказанные методики выполнения измерений: ПНД Ф 14.1:2:4.12-06 16.1:2:3.3.9-06 и ПНД Ф 14.1:2:3:4:10-04 16.1:2:3:3.7-04. Рассмотрим результаты биотестирования трех проб.

1. Проба 1.

1.1. Исследованная проба оказывает гипертоксическое действие на тест-объект *Daphnia magna Straus*. Действие испытано в диапазоне концентраций 0,011 %-1 %. Смертность тест-объекта 100 % наблюдается в течение нескольких минут после начала биотестирования при любой концентрации из диапазона.

1.2. Исследованная проба оказывает гипертоксическое действие на тест-объект водоросли хлорелла. Критерий токсичности превышен при всех кратностях разбавления, в том числе при максимальной в 400 раз (концентрация - 0,25 %). При концентрации исследуемой пробы 0,25 % наблюдается подавление роста водоросли хлорелла на 77 % по сравнению с контрольной пробой. При более высоких концентрациях рост водоросли полностью подавляется.

2. Проба 2.

2.1. Исследованная проба оказывает гипертоксическое действие на тест-объект *Daphnia magna Straus*. Действие испытано в диапазоне концентраций 0,12 % - 10 %. При концентрации 10 % наблюдается 100 % смертность тест-объекта в течение нескольких минут после начала биотестирования. При концентрации 0,12 % наблюдается 100 % смертность тест-объекта через 3-4 часа после начала биотестирования.

2.2. Исследованная проба оказывает гипертоксическое действие на тест-объект водоросли хлорелла. Наблюдается стимулирующее воздействие на рост тест-культуры. Уже при концентрации пробы 0,11 % (разбавление в 900 раз) стимулирующее воздействие превышает критерий токсичности и составляет 45 % по сравнению с контролем. Таким образом, пробу можно считать гипертоксичной. Величина токсической кратности разбавления для данной пробы составляет 2 100 раз.

3. Проба 3.

3.1. Исследованная проба оказывает гипертоксическое действие на тест-объект *Daphnia magna Straus*. Действие испытано в диапазоне концентраций 0,011 % - 1 %. Смертность тест-объекта 100 % наблюдается в течение нескольких минут после начала биотестирования при любой концентрации из диапазона.

3.2. Исследованная проба оказывает гипертоксическое действие на тест-объект водоросли хлорелла. Данная проба полностью подавляет рост водоросли при всех кратностях разбавления, в том числе при максимальной в 900 раз (концентрация – 0,11 %). Таким образом, проба является гипертоксичной.

Заключение

На основании полученных опытных данных биотестирования токсического загрязнения почвы нефтепродуктами с использованием в качестве тест-объекта семян растений-индикаторов можно сделать вывод, что содержание в почве нефтяных загрязнений оказывает влияние на морфологические признаки тест-культуры и на количество хлорофилла в листьях кресс-салата. Выбранный авторами тест-объект – растения кресс-салата позволяет относительно быстро провести биотест и получить достаточно точные и воспроизводимые результаты. Кроме того, в лабораторных условиях кресс-салат легко культивируется и семена его доступны.

Таким образом, методы проростков и определения хлорофилла можно успешно использовать для определения фитотоксичности почвы.

Результаты биотестирования проб водной вытяжки почвы, взятых на территории бывшего ОАО "Фосфор" (г.о. Тольятти), с использованием в качестве тест-объектов зеленой протококковой водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris Beijer*) и рачков *Daphnia magna Straus*, позволяют сделать следующие выводы:

1. Наблюдается полное соответствие результатов биотестирования и степени токсичности проб почвы по обоим тест-объектам (водоросли хлорелла и рачки *Daphnia magna Straus*).

2. Пробы почвы, взятой на территории бывшего ОАО "Фосфор", г. Тольятти, являются гипертоксичными по результатам биотестирования на двух тест-объектах.

Таким образом, проведенные исследования подтверждают эффективность использования методов биотестирования для определения токсического загрязнения почв нефтепродуктами.

Литература

1. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование. Под ред. Мелеховой О.П., Егоровой Е.И. М.: Издательский центр «Академия», 2010. 288 с.
2. Дмитриев А.И. Биоиндикация. Н. Новгород, 1996. 33 с.
3. Другов Ю.С., Родин А.А. Мониторинг органических загрязнений природной среды. 500 методик. Практическое руководство. 2-е изд. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 893 с.
4. Евгеньев М.И. Тест-методы и экология // Соросовский образовательный журнал. 1999. № 11. С. 29 - 34.
5. Егоров Ю.Е. Экспериментальное изучение экологических систем: проблемы и перспективы // Экспериментальное изучение искусственных и естественных экосистем. Ч. 1. Казань, АН СССР, 1985. С. 5 - 32.
6. Почвенно-экологический мониторинг и охрана почв / под ред. Д. С. Орлова. М.: Изд-во МГУ, 1994. 271 с.

**ECOLOGICAL MONITORING OF TOXICITY POLLUTION
OF THE SOILS BY OIL PRODUCTS
BY USING OF BIOLOGICAL TESTING METHODS**

A.V. Vasilyev¹, V.V. Zabolotskikh
Togliatti State University, Togliatti, Russia
e-mail: ¹avassil62@mail.ru

O.V. Tupitsyna², A.M. Shterenberg
Samara State Technical University, Samara, Russia
²olgatupicyna@yandex.ru

Abstract. In article methods of ecological monitoring of toxicity pollution of soils by oil products are considered. Authors of article had been carried out experimental researches by definition of degree of toxicity of the soils polluted by oil products by using of biological test-objects: seeds of plants-indicators, *Chlorella vulgaris* Beijer and *Daphnia magna* Straus. As a result of experiences it has been established the degree of toxicity of soils. Results of researches are proving high efficiency of using of methods of biological testing for estimation of toxicity pollution of soils by oil products.

Keywords: toxicity pollution, soil, oil products, monitoring, biological testing, test-objects

References

1. Biologicheskii kontrol' okruzhayushchei sredy: bioindikatsiya i biotestirovanie (Biological control of the environment: bioindication and biotesting). Edited by Melekhova O.P., Egorova E.I. Moscow: Publishing Center "Akademiya", 2010. 288 p.
2. Dmitriev A.I. Bioindikatsiya (Bioindication). N. Novgorod, 1996. 33 p.
3. Drugov Yu.S., Rodin A.A. Monitoring organicheskikh zagryazneniy prirodnoy sredy. 500 metodik. Prakticheskoe rukovodstvo (Monitoring of organic pollution of the environment. 500 techniques. Practical guide.). 2 ed. Moscow, BINOM. Laboratoriya znaniy, 2009. 893 p.
4. Evgen'ev M.I. Test-metody i ekologiya (Test-methods and ecology), Soro-
sovskiy obrazovatel'nyy zhurnal, 1999, Issue 11, pp. 29 - 34.
5. Egorov Yu.E. Eksperimental'noe izuchenie ekologicheskikh sistem: problemy i perspektivy (Experimental study of ecological systems: problems and prospects) in *Eksperimental'noe izuchenie iskusstvennykh i estestvennykh ekosistem* (An experimental study of natural and artificial ecosystems). Part 1. Kazan, AN SSSR, 1985. PP. 5 - 32.
6. Pochvenno-ekologicheskii monitoring i okhrana pochv (Soil and environment-
al monitoring and protection of soil). Ed.: D.S. Orlov. Moscow, MGU, 1994. 271 p.