

## ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКА ТОКСИЧНОСТИ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЁННЫХ НЕФТЕПРОДУКТАМИ

© 2012 В.В. Заболотских, А.В. Васильев, С.Н. Танких

Тольяттинский государственный университет

Поступила в редакцию 06.10.2011

В статье рассматриваются методы биологической диагностики почв как эффективные для определения степени загрязнения и токсичности почв. Авторами статьи были проведены экспериментальные исследования по определению фитотоксичности почв, загрязнённых нефтепродуктами. В результате опытов было установлено, что содержание в почве нефтяных загрязнений оказывает заметное влияние на морфологические признаки тест-культуры и на количество хлорофилла в листьях кресс – салата. Методы проростков и определения хлорофилла можно успешно использовать как экспресс-диагностику загрязнения почв.

Ключевые слова: биоиндикация, биотестирование, загрязнение почв нефтепродуктами, экспресс-диагностика, метод проростков.

В основе принципа биологической диагностики почв 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 почвы 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 биометодов [1, 2, 3, 4, 7].

В настоящее время существует ряд современных молекулярно-биологических тестов качества среды, но в силу высокой технологической сложности и стоимости их применение оказывается ограниченным. Поэтому стоит ли прибегать к таким сложным методам при решении общей задачи мониторинга состояния среды и нельзя ли получить сходную информацию более доступным способом [5, 6, 7]. Мы считаем, что в данном случае наиболее эффективным будет использование методов биотестирования для определения фитотоксичности почв, загрязнённых

продуктами переработки нефти.

Биотестирование основано на исследовании эффективности гомеостатических механизмов живых организмов, которые способны уловить присутствие стрессирующего 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.

Методы биотестирования дают возможность охарактеризовать степень воздействия изучаемого фактора на биоценозы и природные среды. Указанные методы позволяют получить достаточно надежные данные о токсичности конкретной пробы. Этим методы биотестирования приближаются к химическим методам. Но, в отличие от последних, они позволяют реально оценить токсические свойства среды, обусловленные наличием комплекса загрязняющих химических веществ. Одним из наиболее важных требований при оценке состояния среды является чувствительность применяемых методов. Потребность в таких методах особенно возрастает в настоящее время, когда становится необходимым оценивать не только уже необратимые изменения в среде, но первоначальные незначительные отклонения, когда еще возможно вернуть систему в прежнее нормальное состояние. Другое важное требование – универсальность,

*Заболотских Влада Валентиновна, кандидат биологических наук, доцент кафедры "Инженерная защита окружающей среды". E-mail: V.Zabolotskikh@tltsu.ru*

*Андрей Витальевич Васильев, доктор технических наук, профессор, директор института химии и инженерной экологии Тольяттинского государственного университета. E-mail: avassil62@mail.ru*

*Светлана Николаевна Танких, студент магистратуры кафедры "Инженерная защита окружающей среды". E-mail: tankih.svetlanka@yandex.ru*

как в отношении оцениваемого воздействия, так и типа экосистем и вида живых существ, по отношению к которым такая оценка проводится. Система должна быть относительно простой и доступной, пригодной для широкого использования [1, 4, 6].

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%-ный 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 испытуемыми растворами (вытяжка из почвы или сточные воды различных предприятий) с той или иной степенью их концентрации и очистки.

III. Накальвание испытуемого 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 фиксируется 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 (рис. 1). 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.

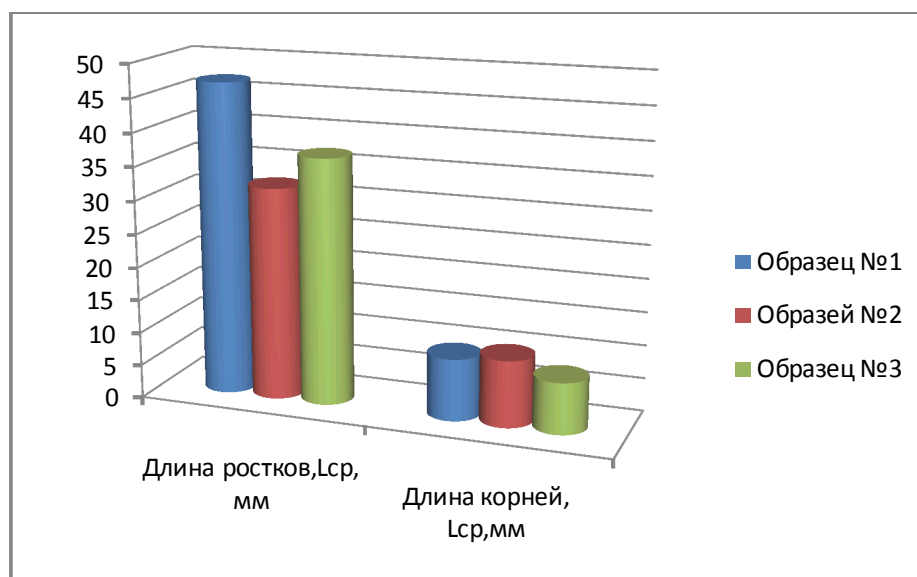
В результате опытов была выявлена фитотоксичность почвенных образцов №2 и №3, загрязнённых нефтепродуктами (рис. 2). Образец №2 показывает, что почва, взятая у заправочной станции более токсична, вероятнее всего загрязнена не только нефтепродуктами, но и солями тяжёлых металлов, что требует дополнительных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

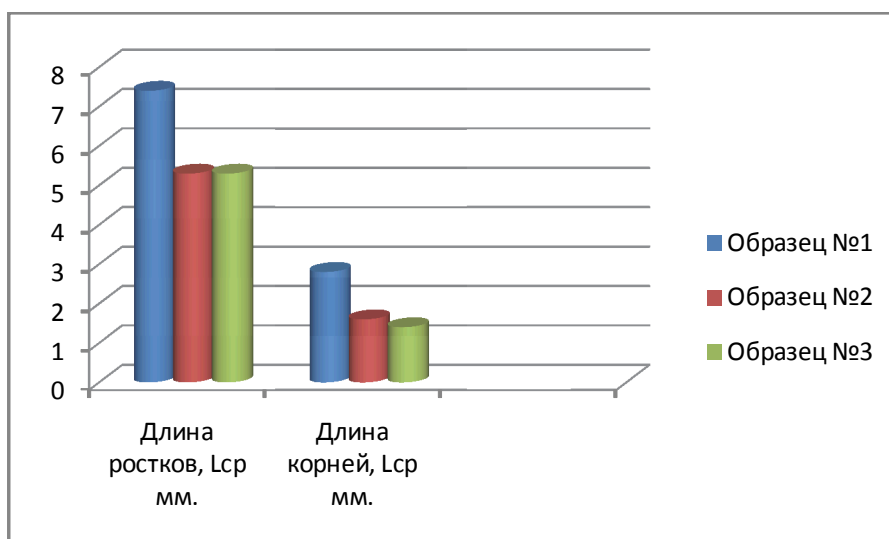
Этот метод можно также успешно применяться и для диагностики загрязнения почв аг-



Рис. 1. Измерение длины корней и надземных побегов у проростков кресс-салата



**Рис. 2.** Морфологические показатели средней длины ростков и корней тест-растений, выращенных на различных образцах почвы в опыте № 1 (образец №1 – контроль серая лесная почва; образец № 2 – почва возле заправочной станции; образец № 3 – почва, загрязнённая нефтепродуктами)



**Рис. 3.** Морфологические показатели средней длины ростков и корней тест-растений, выращенных на различных образцах почвы в опыте № 2 (образец №1 – контроль серая лесная почва; образец № 2 – почва возле заправочной станции; образец № 3 – почва, загрязнённая нефтепродуктами)

рохимикатами в сельском хозяйстве. Сравнение загрязненной 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.

Для более полной и точной диагностики почвы предлагаем после проращивания тест-культур провести дополнительные исследования опытных растений на содержание хлорофилла. Снижение содержания хлорофилла является

надежным неспецифическим биоиндикационным признаком [1, 2, 6]. Неспецифичность этого индикатора в том, что недостаток в почве азота, а также железа и других элементов, быстро сказывается на окраске листьев в результате разрушения в них хлорофилла. Этот признак очень показателен для оценки не только загрязнения, но и плодородия почв и его можно использовать при биологической диагностике почв в сочетании с другими признаками.

Определение содержания хлорофилла в листьях кресс – салата позволяет более полно оценить условия прорастания тест-растений. Данный метод основан на извлечении хлорофилла

**Таблица 1.** Содержание хлорофилла в тест - растениях кресс-салата, выращенных на разных образцах почв, загрязнённых нефтепродуктами

Номер образца	Масса навески, г	Объём вытяжки, л	Показания ФЭКа, А	Концентрация хлорофилла, мг/л	Содержание хлорофилла, мг/г
1	0,05	0,02	0,08	4,33	1,91
2	0,1	0,02	0,14	7	1,4
3	0,07	0,02	0,13	6,72	1,47

из листьев растворителями (спирт, ацетон) и определении его количества на фотоэлектродиметре или спектрофотометре. Нами была освоена оптимальная методика определения хлорофилла применительно к нашим условиям [6]. Вместо колбы Бунзена мы использовали центрифугу, что упростило процедуру выполнения работы и позволило получить более точные результаты. Определение хлорофилла в листьях проводили на свежем материале. Навеску растительного материала (1-2 г.) тщательно измельчали в фарфоровой ступке с битым стеклом, добавляя мел. Далее проводили извлечение хлорофилла из свежего материала – 96 - 98%-ным спиртом. Спирт, обогащенный хлорофиллом, отливали в отдельный химический стаканчик, отделяя раствор от листовой массы до тех пор, пока спирт не останется бесцветным. Затем жидкость из химического стаканчика, обогащенную хлорофиллом, центрифугировали, сливая отдельно в мерный цилиндр, а твердый осадок со дна пробирок растирали со спиртом еще раз, извлекая оставшийся хлорофилл.

Дальнейшие измерения проводили на фотоэлектродиметре с красным светофильтром, определяя оптическую плотность вытяжки хлорофилла при длине волны 650 нм. Пересчёт хлорофилла на стандартные величины производили, используя стандартный раствор Гетри, для изготовления которого в мерную колбу емкостью 100 мл точно отмеривали растворы ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 28,5 мл,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  ~ 50 мл,  $\text{NH}_4\text{OH}$  - 10 мл), доводя дистиллированной водой до метки и перемешивали. Раствор Гетри по окраске колориметрически эквивалентен раствору кристаллического хлорофилла по содержанию последнего 85 мг в литре. Измерения на ФЭКе производили несколько раз, затем вычисляли средние значения оптической плотности растворов. По полученным данным определяли концентрацию хлорофилла в опытных образцах по калибровочной кривой. Затем вычисляли количество хлорофилла в мг/г листа (по сырой массе) и производили расчёт содержания хлорофилла в опытных образцах тест-растений. Результаты измерений приведены в таблице 1.

Таким образом, в результате сравнительной диагностики почв по содержанию хлорофил-

ла в тест-растениях кресс-салата нами были получены следующие результаты. Наиболее низкое содержание хлорофилла 1,4 мг/л было выявлено в опытных образцах растений кресс-салата № 2, выращенных на почве, взятой около заправочной станции. В тест-растениях № 3, выращенных на загрязнённой нефтепродуктами почве также было выявлено более низкое содержание хлорофилла (1,47 мг/л) по сравнению со стандартом №1 - 1,91 мг/л. Низкое содержание хлорофилла в опытных образцах №2, и №3 показывает на загрязнение почв химическими веществами, которые разрушают хлорофилл в листьях тест-растений. Полученные нами данные опытов показали, что содержание хлорофилла является весьма показательным биоиндикационным признаком, который позволяет точно оценить токсичность, а, следовательно, и загрязнённость анализируемых почв. Наиболее загрязнёнными, токсичными почвами оказались почвы в опытах №2 (возле заправочной станции) и №3 (загрязнённые нефтепродуктами).

На основании полученных нами опытных данных 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 нами 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. Методы проростков и определения хлорофилла можно успешно использовать для определения фитотоксичности почвы, как экспресс-диагностику загрязнения почв.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учеб.пособие для вузов / *О.П.Мелехова* [и др.]. 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: практ. руководство. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. 893 с.
4. *Евгеньев М.И.* Тест-методы и экология // Соросовс-

- кий образ. журнал. 1999. Т. 5. № 11. С. 29 - 34.
5. *Егоров Ю.Е.* Экспериментальное изучение экологических систем: проблемы и перспективы // Экспериментальное изучение искусственных и естественных экосистем. Казань, 1985. 4.1. С. 5-32.
6. Биоиндикация и биотестирование: лабораторный практикум /*В.В. Заболотских, Л.В. Нюхтина, О.В. Бышина.* Тольятти: ТГУ, 2011. 135 с.
7. Почвенно-экологический мониторинг и охрана почв [под ред. Д. С. Орлова]. М.: Изд-во МГУ, 1994. 271 с.

## **EXPRESS DIAGNOSTICS OF TOXICITY OF THE SOILS POLLUTED BY OIL PRODUCTS**

© 2012 V.V. Zabolotskikh, A.V. Vasilyev, S.N. Tankikh

Togliatti State University

In article methods of biological diagnostics of soils as effective for definition of pollution degree and toxicity of soils are considered. Authors of article had been carried out experimental researches by definition of phytotoxicity of the soils polluted by oil products. As a result of experiences it has been established that the maintenance in soil of oil pollution makes appreciable impact on morphological signs of test culture and on chlorophyll quantity in leaves of pepperwort – salad. Methods of sprouts and chlorophyll definition can be used successfully as express diagnostics of soil pollution.

Key words: bioindication, biotesting, pollution of soils by oil products, express diagnostics, a method of sprouts.

---

*Vlada Zabolotskikh, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor at the Environmental Protection Engineering Department. E-mail: V.Zabolotskikh@tltsu.ru*  
*Andrey Vasilyev, Doctor of Technical Science, Professor, Director of the Institute of Chemistry and Environmental Engineering of Togliatti State University. E-mail: avassil62@mail.ru*  
*Svetlana Tankikh, Magistrate Student of Department of Environmental Protection Engineering. E-mail: tankih.svetlanka@yandex.ru*