

УДК 574.2

РЕАКЦИЯ РАЗНЫХ ТЕСТ-ОБЪЕКТОВ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ ПОЧВ НЕФТЬЮ

© 2021 г. С. А. Бузмаков^{а, *}, Д. Н. Андреев^а, А. В. Назаров^{а, б}, Е. А. Дзюба^а, И. Е. Шестаков^а, М. С. Куюкина^{а, б}, А. А. Елькин^{а, б}, Д. О. Егорова^{а, б}, Ю. В. Хотяновская^а

^аПермский государственный национальный исследовательский университет, Россия 614990 Пермь, ул. Букирева, 15

^бИнститут экологии и генетики микроорганизмов – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Россия 614081 Пермь, ул. Голева, 13

*e-mail: buzmakov2012@gmail.com

Поступила в редакцию 23.11.2020 г.

После доработки 08.12.2020 г.

Принята к публикации 11.12.2020 г.

Исследовали сравнительную реакцию организмов разных трофических уровней на экспериментальное загрязнение нефтью нескольких типов почв. Образцы дерново-подзолистой, светло-серой, дерново-карбонатной, темно-серой и пойменной почв в лабораторных условиях загрязняли нефтью (в концентрации 1–5 и 100–300 г/кг) и определяли ее воздействие на гетеротрофные почвенные бактерии и высшие растения (*Lepidium sativum*, *Triticum aestivum*, *Picea obovata* и *Pinus sylvestris*). Изучали также влияние водных вытяжек из нефтезагрязненных почв на *Chlorella vulgaris* и *Daphnia magna*. Установлено, что сельскохозяйственные *Lepidium sativum* и *Triticum aestivum* более устойчивы к низкому (1–5 г/кг почвы) уровню загрязнения нефтью, чем проростки таежного дерева *Picea obovata*. Обнаружено увеличение численности гетеротрофных бактерий при добавлении в почву нефти в концентрациях до 5 г/кг почвы и снижение при повышенном (100–300 г/кг почвы) добавлении нефти. Во всем диапазоне протестированных концентраций нефти выявлено снижение морфологического разнообразия гетеротрофных бактерий. С использованием водных вытяжек из нефтезагрязненных почв установлена низкая чувствительность теста на выживаемость *Daphnia magna* и неоднозначный ответ микроводорослей *Chlorella vulgaris* на внесение нефти в почву. Наиболее устойчивой к нефтезагрязнению оказалась пойменная, а наиболее уязвимыми – дерново-карбонатная и светло-серая почвы.

Ключевые слова: нефтяное загрязнение, почва, биотестирование, фитотоксичность, гидробионты, гетеротрофные бактерии

DOI: 10.31857/S0367059721040053

Нефтяное загрязнение почв в результате аварийных разливов нефти и ненадлежащего обращения с нефтесодержащими отходами – актуальная экологическая проблема в нефтедобывающих регионах. При оценке состояния загрязненных почв часто используются методы биотестирования, основанные на регистрации реакций тест-организмов на воздействие загрязняющих веществ в лабораторных условиях. Быстрота отклика и высокая чувствительность тест-организмов позволяют получить информацию об экотоксичности загрязнителей до появления явных признаков нарушений в загрязненной экосистеме. Корректный результат биотестирования обычно достигается при использовании нескольких тест-организмов из разных систематических групп, однако продолжается дискуссия о необходимом и достаточном наборе биотестов для определения чувствительности почвенных экосистем к нефтя-

ному загрязнению [1–4]. Наиболее информативными показательными организмами считаются сельскохозяйственные и дикорастущие высшие растения, но также широко применяется тестирование с помощью параметров состояния микроорганизмов и гидробионтов. В частности, гидробионты используются при определении токсичности водной вытяжки из нефтезагрязненной почвы для оценки ее влияния на сопредельную водную среду [5]. Сложным объектом для биотестирования, требующим особого, отличного от зональных почв, подхода из-за необходимости учета возможной миграции нефти считаются пойменные почвы [6]. Важной проблемой остается интегрирование данных биотестирования и химического анализа загрязненной почвы с учетом экологических особенностей, характерных для почв определенного типа, в частности степени сорбции нефтяных углеводородов в зависимо-

Таблица 1. Агрохимические и физико-химические показатели почв

Показатели состояния почв*	Почва				
	дерново-подзолистая	дерново-карбонатная	светло-серая	темно-серая	пойменная
Координаты отбора	57°37' 0.505" с.ш., 57°22' 15.582" в.д.	57°23' 39.559" с.ш., 57°5' 16.904" в.д.	57°24' 36.065" с.ш., 57°6' 12.834" в.д.	57°31' 40.451" с.ш., 56°56' 9.078" в.д.	57°22' 5.135" с.ш., 57°7' 56.510" в.д.
C _{орг} , %	1.2	4.0	2.8	6.0	2.0
Гумус, %	2.1	6.9	4.8	10.3	3.4
pH _{вод}	5.7	7.8	5.6	5.8	4.4
pH _{сол}	4.7	7.0	4.5	4.8	3.3
NO ₃ подв, мг/100 г	1.7	5.1	4.7	8.6	2.2
P ₂ O ₅ подв, мг/100 г	0.9	3.1	1.8	3.1	0.5
K ₂ O _{подв} , мг/100 г	7.9	—	8.5	12.1	0.5
H, мг-экв/100 г	3.4	—	5.6	14.3	11.7
ЕКО, мг-экв/100 г	10.2	42.1	26.4	45.3	23
V, %	66	—	82	68	49

* H – гидролитическая кислотность, V – степень насыщенности основаниями; ЕКО – емкость катионного обмена.

сти от содержания гумуса, состояния почвенного микробиоценоза, а также минерально-органического состава, определяющего буферную емкость и развитие растений [7].

Цель настоящей работы – сравнение реакции тест-культур на экспериментальное загрязнение нефтью разных типов почв.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Методика включала последовательное решение задач по отбору образцов почвы различного типа, их физико-химическому анализу, подбору доз загрязнения нефтью, постановке токсикологических экспериментов с гетеротрофными бактериями, одноклеточными водорослями, сосудистыми растениями и низшими ракообразными. Затем определяли интегральную чувствительность исследуемых почв к нефтяному загрязнению.

Район отбора и анализ почвенных образцов. Поскольку для Пермского края характерно большое разнообразие почв [8], образцы дерново-подзолистой, дерново-карбонатной, светло-серой, темно-серой и пойменной почв отбирали в юго-восточных районах края (табл. 1) из верхних горизонтов (U1/A1) с глубины 0–20 см. Физико-химические свойства и агрохимические показатели (C_{орг}, гумус, NPK) почв определяли с помощью общепринятых в почвоведении методов.

Внесение нефти и определение ее содержания в почве и водных вытяжках. Для экспериментального загрязнения отобранных почв в лабораторных условиях использовали нефть ($\rho = 872.0 \text{ кг/м}^3$;

концентрация хлористых солей 303.5 мг/дм^3 ; серы 2.2%) из Соловатовского месторождения, которую вносили в концентрации 1, 2, 3 и 5 г/кг почвы, а при микробиологических исследованиях ряд был продолжен повышенными концентрациями – 100 и 300 г/кг.

Содержание нефтепродуктов в почве и водных вытяжках из нее определяли гравиметрическим методом [9, 10]. Использовали методику теплой хлороформенной экстракции общего битумоида, осуществляемой с помощью лабораторной системы экстракции Buchi В-811 (Швейцария) в режиме “Soxhlet Warm – теплый Сокслет”. Остаточное содержание нефтепродуктов рассчитывали по разнице концентраций хлороформенного битумоида в нефтезагрязненной и контрольной (без внесения нефти) почвах и соответствующих водных вытяжках.

Для определения численности и морфологического разнообразия гетеротрофных почвенных бактерий использовали чашечный метод Коха. Посев серийных 10-кратных разведений водных суспензий почвенных образцов проводили согласно [12] на селективную для данной эколого-трофической группы среду LB [13] через 48 ч после загрязнения почвы нефтью. Культивирование проводили в термостате ТС-1/20 СПУ при 28°C в течение 5–14 сут. Морфологическое разнообразие бактериальных колоний описывали согласно [12].

Фитотоксичность почвы в отношении сосудистых растений. Вегетационный хронический эксперимент проводили согласно стандартной методике определения фитотоксичности почвы [11]. В качестве тест-культур для определения степени

уязвимости сельскохозяйственных почв использовали кресс-салат посевной (*Lepidium sativum* L.) и пшеницу мягкую (*Triticum aestivum* L.), а ель сибирскую (*Picea obovata* Ledeb.) и сосну обыкновенную (*Pinus sylvestris* L.) — для почв лесного фонда. Растения выращивали в течение 14 сут при стандартных условиях [11]. Всхожесть семян составляла не менее 95%.

В качестве наиболее чувствительного критерия фитотоксического действия нефтезагрязнения использовали изменение длины корней проростков на 20% и более относительно контрольных вариантов. Для этого определяли действующие концентрации (ДК) нефтепродуктов в почве, приводящие к 20%-ному (ДК₂₀) снижению измененных параметров тест-культур.

Токсичность водных вытяжек из почвы для гидробионтов. Влияние водных вытяжек из нефтезагрязненных почв на жизнеспособность гидробионтов определяли в остром токсикологическом опыте с использованием тест-культур микроводорослей *Chlorella vulgaris* Beijer [14] и низших ракообразных *Daphnia magna* Straus [15]. В качестве контролей применяли водные вытяжки из чистых почв. Выращивание хлореллы проводили на 10%-ной среде Тамия в многокюветном культиваторе водорослей, оснащенный измерителем оптической плотности (ОП) суспензии непосредственно в кюветах. Токсичность вытяжек оценивали по снижению на 20% и более (подавление роста) или увеличению на 30% и более (стимуляция роста) величины ОП культуры водоросли после 22 ч роста.

Культуру дафний выращивали в климатостатах в контролируемых условиях среды [15], биотестирование проводили с помощью устройства для экспонирования, оценивая острую токсичность водных вытяжек из почв по уровню смертности рачков. Количество живых и мертвых особей определяли методом прямого счета. Критерием острой токсичности служила гибель 50% и более дафний за 48 ч.

Статистический анализ. Статистическую обработку данных проводили с помощью свободного программного обеспечения RStudio. Для представления данных использовали средние значения и ошибки среднего ($m \pm SE$). Для оценки взаимосвязи между концентрацией нефти в почве и исследуемыми переменными применяли коэффициент линейной корреляции Пирсона (где r — коэффициент корреляции и p — статистическая значимость). Средние значения результатов параллельных измерений использовали в качестве учетных единиц.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика почв. В работе использована не насыщенная основаниями *дерново-подзолистая*

почва, которая отличалась тяжелосуглинистым гранулометрическим составом, кислой реакцией, пониженной обеспеченностью гумусом и элементами питания растений (табл. 1). *Дерново-карбонатная* почва характеризовалась повышенным содержанием гумуса, слабощелочной реакцией среды, преобладанием в поглощающем комплексе Са и Mg, высокой емкостью катионного обмена (ЕКО) и относительно низким содержанием подвижного Р₂О₅. Насыщенная основаниями *светло-серая лесная* почва отличалась средним содержанием гумуса, низким уровнем обеспеченности подвижным Р, имела среднюю обеспеченность подвижным К и слабокислую реакцию, а *темно-серая лесная* почва при слабокислой реакции среды — рекордно высоким содержанием гумуса и самыми высокими среди исследованных почв показателями содержания подвижного N, Р и К, не насыщена основаниями, имеет высокую ЕКО. *Пойменная* почва, формирующаяся в условиях регулярного затопления паводковыми водами, имела резко кислую реакцию среды, низкое содержание гумуса и сравнительно низкую обеспеченность элементами питания, а также средние показатели ЕКО.

Результаты определения остаточного содержания нефтепродуктов в исследованных почвах показали, что контрольные образцы почв (без внесения нефти) характеризовались фоновым содержанием общего битумоида на уровне 0.4–0.8 г/кг сухой почвы, при этом для пойменной почвы был зарегистрирован наиболее высокий (1.7 г/кг почвы) фоновый уровень содержания природных углеводородов (табл. 2).

Гетеротрофные почвенные бактерии. Оценка влияния нефтяного загрязнения на численность гетеротрофных почвенных бактерий свидетельствовала об усилении их развития в присутствии низких (до 5 г/кг почвы) концентраций нефти (табл. 3). При этом численность гетеротрофов в дерново-подзолистой, темно-серой и пойменной почвах повышалась в 2–10 раз по сравнению с контролем. Высокие концентрации нефти (100 и 300 г/кг почвы), характерные для аварийных нефтеразливов, напротив, угнетали почвенный бактериоценоз, что наиболее сильно (>400-кратное снижение численности бактерий) проявлялось в дерново-карбонатной и светло-серой почвах.

Анализ морфологического разнообразия показал, что нефтяное загрязнение во всем диапазоне концентраций приводило к снижению биоразнообразия гетеротрофных бактерий (см. табл. 3). Наиболее сильная обратная зависимость ($r = -0.96$) данного признака от концентрации нефти выявлена в отношении дерново-подзолистой почвы, а наиболее слабая ($r = -0.55$) — темно-серой. Таким образом, показатель биоразнообразия является, очевидно, чувствительным критерием степени

Таблица 2. Остаточное содержание нефтепродуктов в экспериментально загрязненных нефтью почвах, г/кг почвы

Доза внесенной в почвы нефти	Почва*				
	дерново-подзолистая	дерново-карбонатная	светло-серая	темно-серая	пойменная
0 (контроль)	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.2	1.7 ± 0.2
1.0	1.2 ± 0.1	1.9 ± 0.2	1.6 ± 0.1	1.2 ± 0.3	2.5 ± 0.2
2.0	2.3 ± 0.2	3.2 ± 0.4	2.7 ± 0.2	2.2 ± 0.2	3.6 ± 0.2
3.0	3.1 ± 0.4	3.9 ± 0.2	3.6 ± 0.4	3.2 ± 0.2	4.2 ± 0.1
5.0	5.1 ± 0.4	5.2 ± 0.1	5.2 ± 0.5	4.8 ± 0.4	5.8 ± 0.1

* Приведены данные ($m \pm SE$) трех параллельных определений.

Таблица 3. Влияние экспериментального загрязнения почвы нефтью на показатели гетеротрофных бактерий

Тип почвы	Концентрация нефти, г/кг почвы						Коэффициент корреляции (r)	Уровень значимости (p)	Действующая концентрация нефти (DK_{20}), г/кг
	0	1.0	3.0	5.0	100	300			
	численность*, $\times 10^6$ КОЕ/г почвы								
Дерново-подзолистая	3.5 ± 0.4	15 ± 1.7	15 ± 0.1	11 ± 1.0	6.8 ± 0.5	1.4 ± 0.1	-0.68	0.135	25.4
Дерново-карбонатная	14 ± 1.6	38 ± 2.2	19 ± 0.1	9.5 ± 1.7	1.7 ± 0.2	0.03 ± 0.005	-0.63	0.177	14.0
Светло-серая	24 ± 2.8	18 ± 1.5	14 ± 0.1	31 ± 2.9	0.2 ± 0.02	0.06 ± 0.007	-0.75	0.082	53.9
Темно-серая	3.5 ± 0.2	11 ± 0.8	10 ± 1.4	34 ± 3.7	11 ± 1.3	2.6 ± 0.2	-0.41	0.417	13.4
Пойменная	3.5 ± 0.2	3.6 ± 0.1	14 ± 1.2	7.4 ± 0.8	1.4 ± 0.1	0.1 ± 0.03	-0.59	0.218	63.8
Число морфотипов бактериальных колоний									
Дерново-подзолистая	13	12	12	12	10	8	-0.96	0.002	12.0
Дерново-карбонатная	12	10	10	10	9	8	-0.79	0.06	9.4
Светло-серая	20	12	11	11	5	5	-0.68	0.137	10.2
Темно-серая	9	8	8	6	8	6	-0.55	0.257	12.2
Пойменная	13	11	9	8	8	5	-0.79	0.063	9.3

* Приведены данные ($m \pm SE$) трех параллельных определений.

нарушенности почвенной экосистемы под воздействием нефтяного загрязнения.

Высшие сосудистые растения. Анализ результатов вегетационного хронического эксперимента выявил обратную зависимость между длиной корней высших растений и содержанием нефтепродуктов в почве (табл. 4). Самая сильная обратная корреляция установлена в отношении кресс-салата (от $r = -0.92$ до $r = -0.98$) и ели (от $r = -0.91$ до $r = -0.98$), что свидетельствует о высокой информативности результатов биотестирования с использованием данных тест-культур. При этом проростки ели отличались максимальной чувствительностью к внесению нефти в почву ($DK_{20} = 2.1-3.3$ г/кг), тогда как проростки сосны неоднозначно реагировали на нефтезагрязнение

(значения DK_{20} колебались от 3.2 до 17.3 г/кг). Более устойчивыми по сравнению с елью оказались сельскохозяйственные культуры (значения DK_{20} составляли 2.3-3.9 и 2.9-4.2 г/кг для кресс-салата и пшеницы соответственно).

Обнаружено сходство показателей фитотоксичности нефтезагрязненных почв в отношении разных тест-культур. Так, ингибирование роста корней практически всех использованных в работе видов растений было максимальным при нефтезагрязнении дерново-подзолистой почвы, что коррелировало с низким содержанием в ней органического углерода и гумуса (см. табл. 1). В то же время выявленная при фитотестировании относительная устойчивость пойменной почвы к нефтяному загрязнению (в 1.1-1.9 раз выше других

Таблица 4. Длина (см) корней проростков через 14 суток культивирования при разной концентрации нефти в почве

Тип почвы	Концентрация нефти*, г/кг почвы					Коэффициент корреляции (r)	Уровень значимости (p)	Действующая концентрация нефти (ДК ₂₀), г/кг
	0	1.0	2.0	3.0	5.0			
<i>Lepidium sativum</i> L.								
Дерново-подзолистая	2.8 ± 0.5	3.1 ± 0.5	2.4 ± 0.4	2.3 ± 0.4	0.8 ± 0.5	-0.92	0.026	2.3
Дерново-карбонатная	3.5 ± 0.7	2.9 ± 0.5	2.9 ± 0.5	2.3 ± 0.4	1.4 ± 0.5	-0.98	0.002	2.5
Светло-серая	3.3 ± 0.5	2.8 ± 0.3	2.7 ± 0.4	2.4 ± 0.3	1.3 ± 0.3	-0.98	0.004	2.4
Темно-серая	3.1 ± 0.4	3.1 ± 0.4	2.7 ± 0.2	2.3 ± 0.2	1.7 ± 0.3	-0.98	0.003	2.6
Пойменная	3.3 ± 0.4	3.2 ± 0.5	2.9 ± 0.5	2.7 ± 0.5	1.6 ± 0.4	-0.96	0.008	3.9
<i>Triticum aestivum</i> L.								
Дерново-подзолистая	13.9 ± 6.1	14.7 ± 2.5	15.5 ± 3.8	11.3 ± 2.8	5.6 ± 0.5	-0.86	0.060	2.9
Дерново-карбонатная	15.7 ± 4.6	17.9 ± 5.1	13.0 ± 1.7	12.9 ± 2.6	10.6 ± 2.9	-0.86	0.060	3.4
Светло-серая	12.9 ± 3.1	15.7 ± 2.7	12.5 ± 1.5	11.7 ± 2.1	6.6 ± 1.2	-0.86	0.060	3.7
Темно-серая	11.9 ± 3.1	12.3 ± 2.2	9.9 ± 1.4	8.5 ± 3.2	8.6 ± 3.3	-0.87	0.052	3.1
Пойменная	17.1 ± 3.2	15.9 ± 6.5	14.8 ± 4.1	12.3 ± 5.0	12.4 ± 1.8	-0.92	0.020	4.2
<i>Picea obovata</i> L.								
Дерново-подзолистая	3.1 ± 0.4	3.0 ± 0.3	—	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.3	-0.95	0.049	2.1
Дерново-карбонатная	2.7 ± 0.7	2.4 ± 0.3	2.2 ± 0.4	1.7 ± 0.2	1.7 ± 0.4	-0.93	0.020	2.4
Светло-серая	3.1 ± 0.3	2.9 ± 0.4	2.1 ± 0.3	1.6 ± 0.2	1.6 ± 0.2	-0.91	0.030	2.2
Темно-серая	3.1 ± 0.2	2.9 ± 0.2	2.1 ± 0.2	1.6 ± 0.5	1.6 ± 0.2	-0.91	0.030	2.2
Пойменная	2.7 ± 0.2	2.4 ± 0.2	2.2 ± 0.4	1.7 ± 0.2	1.4 ± 0.4	-0.98	0.002	3.3
<i>Pinus sylvestris</i> L.								
Дерново-подзолистая	2.9 ± 0.4	2.6 ± 0.6	2.6 ± 0.6	2.8 ± 0.5	2.6 ± 0.4	-0.46	0.430	17.3
Дерново-карбонатная	3.0 ± 0.5	3.8 ± 0.7	3.0 ± 0.3	3.2 ± 0.6	2.3 ± 0.5	-0.67	0.210	5.4
Светло-серая	2.9 ± 0.4	3.1 ± 0.4	2.5 ± 0.5	2.0 ± 0.6	2.2 ± 0.4	-0.80	0.210	3.2
Темно-серая	3.6 ± 0.8	4.0 ± 0.6	2.9 ± 0.5	2.5 ± 0.5	2.5 ± 0.5	-0.83	0.080	3.2
Пойменная	3.1 ± 0.4	2.9 ± 0.5	2.8 ± 0.5	2.8 ± 0.6	2.5 ± 0.4	-0.97	0.005	6.5

* Приведены данные ($m \pm SE$) четырех параллельных определений.

почв) согласуется с высоким фоновым содержанием в ней углеводородных компонентов (см. табл. 2).

Токсичность водных вытяжек из почв. Возможное влияние нефтяного загрязнения почвы на соприкасающую водную среду определяли по токсичности водных вытяжек из нефтезагрязненной почвы для гидробионтов. Как видно из табл. 5, вытяжки из образцов всех исследованных почв, включая контрольные, содержали нефтепродукты в очень низкой (0.065–0.27 мг/л) концентрации. Не выявлено строгой корреляции между количеством битумоида, выделенного хлороформной экстракцией из водной фазы, и концентрацией внесенной в почву нефти. Также не выявлено достоверных различий по содержанию битумоида в водных вытяжках из почв различного типа.

Результаты биотестирования водных вытяжек с использованием микроскопических водорослей *Chlorella vulgaris* показали (табл. 6) достоверное увеличение (в 1.4–2.6 раза) плотности культуры в присутствии неразбавленных вытяжек из чистых почв и более выраженное (в 2.0–3.5 раза) стимулирование роста клеток неразбавленными вытяжками из почв с максимальным (5 г/кг почвы) уровнем нефтяного загрязнения. Пропорциональное снижение оптической плотности культуры при разбавлении вытяжек из нефтезагрязненных почв указывало на возможный дозозависимый характер стимулирующего эффекта, поэтому расчет пороговой концентрации (ДК₃₀) выполнен по уравнениям линейной регрессии между содержанием нефти в почве и ростом культуры водорослей.

При биотестировании почвенных вытяжек, как контрольных, так и с разным уровнем нефте-

Таблица 5. Содержание битумоида в водных вытяжках почв, экспериментально загрязненных нефтью, мг/л

Доза внесенной нефти, г/кг почвы	Почва*				
	дерново-подзолистая	дерново-карбонатная	светло-серая	темно-серая	пойменная
0 (контроль)	0.110 ± 0.031	0.074 ± 0.024	0.077 ± 0.008	0.075 ± 0.024	0.126 ± 0.034
1.0	0.160 ± 0.040	0.123 ± 0.033	0.202 ± 0.048	0.066 ± 0.023	0.124 ± 0.034
2.0	0.184 ± 0.045	0.202 ± 0.048	0.070 ± 0.023	0.065 ± 0.022	0.112 ± 0.031
3.0	0.115 ± 0.032	0.272 ± 0.062	0.095 ± 0.028	0.094 ± 0.028	0.131 ± 0.035
5.0	0.153 ± 0.039	0.210 ± 0.050	0.096 ± 0.028	0.135 ± 0.036	0.203 ± 0.048

* Приведены данные ($m \pm SE$) трех параллельных определений.

Таблица 6. Реакция тест-культуры *Chlorella vulgaris* (по изменению оптической плотности) при биотестировании водных вытяжек из нефтезагрязненных почв

Тип почвы	Коэффициент разбавления водной вытяжки*					Коэффициент корреляции (r)	Уровень значимости (p)	Действующая концентрация нефти (ДК ₃₀), г/кг
	81	27	9	3	0			
Дерново-подзолистая	0.174	0.194	0.204	0.234	0.256	-0.90	0.037	3.8
	0.251	0.278	0.324	0.356	0.364			
Дерново-карбонатная	0.186	0.202	0.208	0.250	0.332	-0.81	0.099	2.7
	0.195	0.241	0.340	0.505	0.558			
Светло-серая	0.158	0.177	0.220	0.260	0.358	-0.63	0.249	2.3
	0.233	0.239	0.286	0.425	0.628			
Темно-серая	0.176	0.220	0.233	0.274	0.306	-0.78	0.119	3.2
	0.204	0.230	0.288	0.410	0.451			
Пойменная	0.190	0.203	0.259	0.327	0.460	-0.68	0.204	6.6
	0.218	0.245	0.287	0.405	0.576			

* Приведены данные четырех параллельных определений: в числителе – чистая почва (контроль), в знаменателе – почва, загрязненная нефтью в концентрации 5 г/кг. Среднее значение оптической плотности культуры микроводорослей в дистиллированной воде составляло 0.180.

загрязнения, на тест-культуре *Daphnia magna* погибших особей выявлено не было, что указывало на отсутствие острого токсического воздействия. Следовательно, дафниевый тест не пригоден для биотестирования почвы с низким уровнем нефтяного загрязнения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Влияние нефтяного загрязнения на гетеротрофные почвенные бактерии. Важным критерием экологического состояния почвы на загрязненной территории является динамика численности почвенного бактериоценоза, в частности гетеротрофной эколого-трофической группы аэробных бактерий [3, 7, 20].

Низкие (1–5 г/кг почвы) концентрации нефти оказывали нейтральное или стимулирующее воздействие на численность гетеротрофных бактерий использованных в работе почв (за исключением дерново-карбонатной). При высоком уров-

не нефтезагрязнения (100 и 300 г/кг почвы) наблюдалось подавление численности гетеротрофов в трех из пяти исследованных почвах. Многие исследователи также отмечают сложный нелинейный характер динамики общей численности почвенной микробиоты при низком уровне нефтяного загрязнения стимулирование роста углеводородокисляющих бактерий или отсутствие выраженного общетоксического эффекта [2, 3].

Наиболее чувствительным и информативным показателем неблагоприятного состояния почвенного микробиоценоза служит изменение качественного состава популяции, отражающее перераспределение доминантных форм, быстро адаптирующихся к условиям загрязнения.

С использованием простого метода учета различных по морфологии бактериальных колоний, выросших на агаризованной среде LB, нами выявлена четкая обратная корреляция между показателем разнообразия гетеротрофных бактерий и концентрацией нефти в исследованных почвах.

При этом в диапазоне концентраций нефти 1–5 г/кг почвы коэффициенты корреляции составили от –0.68 для дерново-карбонатной до –0.96 для пойменной почвы.

Первоочередной реакцией почвенного бактериоценоза в ответ на нефтяное загрязнение, очевидно, является снижение видового разнообразия и перераспределение трофических групп, в частности от фототрофов (цианобактерий) и азотфиксаторов (*Azotobacter*) к углеводородокисляющим фирмикутам, протеобактериям и азитобактериям [3, 20]. Однако в хронически загрязненных углеводородами почвах и при проведении долгосрочных работ по биоремедиации часто происходит формирование специализированных микробных сообществ нефтедеструкторов, характеризующихся даже более высоким видовым разнообразием, чем соответствующие “чистые” почвы [21]. В этом случае надежными биоиндикаторами служат представители отдельных таксонов, например актинобактерий рода *Rhodococcus* (*R. ruber*, *R. apacus*, *R. erythropolis*), количественно определяемых в нефтезагрязненной почве прямой ПЦР-детекцией [22].

Реакция тест-культуры высших растений на нефтяное загрязнение почв. Лесные экосистемы часто испытывают наиболее существенное негативное воздействие нефтяного загрязнения почвы. Наиболее чувствительны к токсичному воздействию нефти хвойные древесные растения на ранних этапах развития [16]. По нашим данным, проростки ели отличались самой высокой чувствительностью к нефтезагрязнению, о чем свидетельствовали минимальные ($DK_{20} = 2.1–3.3$ г/кг) величины действующей концентрации нефти, приводящие к 20%-ному уменьшению длины корней. Более высокая устойчивость, в зависимости от типа почвы, выявлена у сосны, что согласуется с ранее опубликованными данными [16] о влиянии нефтезагрязненной воды на прорастание семян хвойных пород. Учитывая сильную обратную корреляцию (от –0.91 до –0.98) между концентрацией нефти и длиной корней проростков, ель может быть рекомендована в качестве чувствительной и надежной тест-культуры для биотестирования почв лесных зон, загрязненных нефтью и нефтепродуктами.

Представление о том, что лесные экосистемы могут загрязняться в большей степени, чем сельскохозяйственные [17], не подтверждается экспериментальными данными. Так, исследованные нами сельскохозяйственные культуры – кресс-салат и пшеница – были более устойчивы к нефтезагрязнению всех пяти типов почв, чем основная лесобразующая порода – ель.

По литературным данным, концентрация нефти, вызывающая торможение роста корней кукурузы (*Zea mays*), составляет 10–11 г/кг почвы

[4, 18], фасоли (*Phaseolus nipponensis* Ohwi) – 10 г/кг [18], пшеницы (*Triticum aestivum* L.) – 16 г/кг [4], маша (*Vigna radiata* L.) – 10 г/кг [19]. Следует отметить, что в работах [18, 19] отсутствуют данные о влиянии на растения нефти в концентрации ниже 10 г/кг почвы. Полученные нами более низкие (2–4 г/кг почвы) пороговые концентрации нефти в отношении сельскохозяйственных культур свидетельствуют о недооцененной потенциальной опасности “низкого” уровня нефтезагрязнения и необходимости дальнейшего исследования фитотоксичности нефти в данном диапазоне концентраций с расширением спектра фитокультур и исследуемых почв.

Реакция гидробионтов на нефтяное загрязнение почв. Культуры гидробионтов – зеленой протокковой водоросли *Chlorella vulgaris* и ветвистых пресноводных рачков *Daphnia magna* – обычно сходным образом реагируют на наличие в воде экотоксиканта [23]. Однако наши результаты определения токсичности водных вытяжек из нефтезагрязненных почв выявили различную реакцию – стимулирование роста водорослей и отсутствие изменений числа жизнеспособных особей дафний при воздействии низких концентраций нефти (1–5 г/кг почвы). Возможно, это связано с пониженной растворимостью нефтяных углеводородов в воде, потерями во время фильтрации, а также их прочной сорбцией органическим веществом почвы. На последнее, в частности, указывают наиболее низкие (0.065–0.135 мг/л) концентрации битумоида в вытяжках из темносерой лесной почвы, характеризующейся самым высоким содержанием гумуса из исследованных почв (см. табл. 1 и 5).

В литературе встречается чрезвычайно широкий диапазон (от 0.002 до 10 000 мг/л) токсичных концентраций нефти и нефтепродуктов для водорослей и водных растений, включая стимулирующие эффекты нефти при низких концентрациях [24]. В работе [25] сообщается о способности *Chlorella vulgaris* очищать воду от нефти, при этом доза нефти 20 г/л оказывала стимулирующее воздействие на рост водоросли. Аналогичные результаты получены Romero et al. [26] при исследовании процесса биодеградации нефти в воде культурой *Chlorella* sp. Наши результаты и данные литературы указывают на ограниченную возможность использования дозозависимого стимулирования культуры хлореллы для определения нижнего порогового уровня нефтезагрязнения почвы.

При оценке острой токсичности нефти в отношении *Daphnia magna* достоверный токсический эффект отмечен при дозах выше 100 мг/л, а при концентрации 400 мг/л и выше дафнии гибли через 96 ч [27]. В работе [5] при действии на дафний водорастворимых нефтяных фракций гибель 50% особей в течение 48 ч зарегистрирована лишь при

Таблица 7. Результаты определения пороговых концентраций нефти (г/кг почвы) с использованием выбранных биотических критериев

Тип почв	Используемые тест-организмы			
	кресс-салат	ель	гетеротрофные бактерии	хлорелла
Дерново-подзолистая	2.3	2.1	12.0	3.8
Дерново-карбонатная	2.5	2.4	9.4	2.7
Светло-серая лесная	2.4	2.2	10.2	2.3
Темно-серая лесная	2.6	1.9	12.2	3.2
Пойменная	3.9	3.3	9.3	6.6

уровне загрязнения от 254 до 640 мг/л. Таким образом, результаты наших исследований подтверждают данные о том, что низкие концентрации нефтяных углеводородов безопасны для дафний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментально определенные и рассчитанные на основании полученных результатов показатели чувствительности использованных тест-организмов к воздействию нефтезагрязненных почв сведены в табл. 7 для сравнения и выбора критических параметров при определении максимально допустимых уровней нефтяного загрязнения почв различного типа.

Как видно из табл. 7, фитотоксичность в отношении высших растений – наиболее чувствительный к нефтезагрязнению параметр для всех исследованных почв. В частности, тесты на прорастание кресс-салата посевного и ели сибирской, характеризующиеся высокой чувствительностью результатов, могут использоваться при оценке уязвимости для нефтяного загрязнения почв сельскохозяйственного назначения и лесного фонда соответственно. Показатели разнообразия почвенного бактериоценоза оказались в 2.4–6.4 раза менее чувствительными по сравнению с фитотестом. Однако, учитывая относительную простоту постановки опыта и информативность результатов, используемый нами метод биотестирования, основанный на подсчете морфологически различающихся бактериальных колоний, может быть полезен для экспрессной оценки состояния почвы, свежезагрязненной в результате небольших проливов нефти и нефтепродуктов. Полученные результаты биотестирования с использованием различных гидробионтов свидетельствуют о существенных ограничениях применения данного метода при низком уровне нефтезагрязнения почвы, которые могут частично преодолеваться использованием большего объема взятой для анализа почвы или более чувствительных культур гидробионтов и их физиологических характеристик [28]. При этом установленные по стимулированию роста хло-

реллы водными вытяжками пороговые уровни концентрации нефти в почве были сопоставимы с данными, полученными при тестировании на высших растениях.

Таким образом, в результате проведенного биотестирования установлена различная реакция использованных тест-культур на воздействие сравнительно низких концентраций нефти в экспериментально загрязненной почве. Выявленные различия определяются не только разным порогом чувствительности организмов к воздействию экотоксиканта, но и такими физико-химическими свойствами почв, как содержание органического углерода и гумуса, фоновый уровень углеводородных компонентов и поглощающая способность почвы в отношении нефтяных углеводородов.

Публикация подготовлена в рамках реализации Программы деятельности научно-образовательного центра мирового уровня “Рациональное недропользование” на 2019–2024 годы (распоряжение Правительства РФ от 30 апреля 2019 г. № 537) и при финансовой поддержке РФ (грант № 18-14-00140).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ахметзянова Л.Г., Селивановская С.Ю., Латыпова В.З.* Лабораторное моделирование рекультивации нефтезагрязненных почв для определения допустимого остаточного содержания нефтепродуктов // Учен. зап. Казанского ун-та. Естественные науки. 2010. Т. 152. Кн. 4. С. 68–77.
2. *Лифшиц С.Х., Чалая О.Н.* Разработка критериев для определения допустимого остаточного содержания нефтезагрязнений в почвах // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2013. № 8-2. С. 228–230.
3. *Колесников С.И., Жаркова М.Г., Казеев К.Ш.* и др. Оценка экотоксичности тяжелых металлов и нефти по биологическим показателям чернозема // Экология. 2014. № 3. С. 163–173.
4. *Tang J.C., Wang M., Wang F.* et al. Eco-toxicity of petroleum hydrocarbon contaminated soil // J. of Environmental Sciences. 2011. V. 23. № 5. P. 845–851.
5. *Martinez-Jeronimo F., Villasenor R., Rios G.F., Espinosa-Chavez F.* Toxicity of the crude oil water-soluble frac-

- tion and kaolin-adsorbed crude oil on *Daphnia magna* (Crustacea: Anomopoda) // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 2005. V. 49. № 3. P. 343–352.
6. Мотузова Г.В. Загрязнение почв и сопредельных сред. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2000. 71 с.
 7. Терехова В.А., Пукальчик М.А., Яковлев А.С. “Триадный” подход к экологической оценке городских почв // Почвоведение. 2014. № 9. С. 1145–1152. <https://doi.org/10.7868/S0032180X14090123>
 8. Национальный атлас почв Российской Федерации. М.: Астрель, АСТ, 2001. 632 с.
 9. ПНД Ф 16.1.41-04. Количественный химический анализ почв. Методика выполнения измерений массовой концентрации нефтепродуктов в пробах почв гравиметрическим методом. М.: Министерство природных ресурсов РФ, 2004. 12 с.
 10. Другов Ю.С. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов: Практическое руководство / Другов Ю.С., Родин А.А. 2-е изд., перераб. и доп. М.: БИНОМ. ЛЗ, 2017. 270 с.
 11. ГОСТ Р ИСО 22030-2009. Качество почвы. Биологические методы. Хроническая фитотоксичность в отношении высших растений. М.: Стандартинформ, 2019.
 12. Герхардт Ф. (ред.). Методы общей бактериологии. М.: Мир, 1983. Т. 1–3.
 13. Ausbel F.M., Brent R., Kingston R.E. et al. Short Protocols in Molecular Biology. Third ed. N.Y.: John Wiley and Sons, 1995. 450 p.
 14. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04, Т 16.1:2:2.3:3.7-04. Методика измерений оптической плотности культуры водоросли хлореллы (*Chlorella vulgaris* Beijer) для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления. М.: Федеральная служба по надзору в сфере природопользования, 2014. 37 с.
 15. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.12-06, Т 16.1:2:2.3:3.9-06. Методика измерений количества *Daphnia magna* Straus для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления методом прямого счета. М.: Федеральная служба по надзору в сфере природопользования, 2014. 39 с.
 16. Донец Е.В., Григорьев А.И. Влияние нефтяного загрязнения на прорастание семян хвойных пород // Лесоведение. 2008. Т. 5. С. 18–21.
 17. Яковлев А.С., Евдокимова М.В. Экологическое нормирование почв и управление их качеством // Почвоведение. 2011. № 5. С. 582–596.
 18. Baek K.H., Kim H.S., Oh H.M. et al. Effect of crude oil, oil components and bioremediation on plant growth // J. of Environmental Science and Health. Part A. 2004. V. 39. № 9. P. 2465–2472.
 19. Masakorala K., Yao J., Chandankere R. et al. Effects of petroleum hydrocarbon contaminated soil on germination, metabolism and early growth of green gram, *Vigna radiata* L. // Bull. of Environmental Contamination and Toxicology. 2013. V. 91. P. 224–230.
 20. Abed R.M.M., Al-Kindi S. Effect of disturbance by oil pollution on the diversity and activity of bacterial communities in biological soil crusts from the Sultanate of Oman // Applied Soil Ecology. 2017. V. 110. P. 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.10.009>
 21. Bergsveinson J., Perry B.J., Simpson G.L. et al. Spatial analysis of a hydrocarbon waste-remediating landfarm demonstrates influence of management practices on bacterial and fungal community structure // Microbial Biotechnology. 2019. V. 12(6). P. 1199–1209. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13397>
 22. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Kamenskikh T.N. et al. Survival of cryogel-immobilized *Rhodococcus* cells in crude oil-contaminated soil and their impact on biodegradation efficiency // International Biodeterioration & Biodegradation. 2013. V. 84. P. 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.05.035>
 23. Zhang C., Zhang S., Zhu L. et al. The acute toxic effects of 1-alkyl-3-methylimidazolium nitrate ionic liquids on *Chlorella vulgaris* and *Daphnia magna* // Environmental Pollution. 2017. V. 229. P. 887–895. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.055>
 24. Lewis M., Pryor R. Toxicities of oils, dispersants and dispersed oils to algae and aquatic plants: Review and database value to resource sustainability // Environmental Pollution. 2013. V. 180. P. 345–367. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.05.001>
 25. Kalhor A.X., Movafeghi A., Mohammadi-Nassab A.D. et al. Potential of the green alga *Chlorella vulgaris* for biodegradation of crude oil hydrocarbons // Marine Pollution Bull. 2017. V. 123. P. 286–290. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.08.045>
 26. Romero D.V., Cordero A.P., Garizado Y.O. Biodegradation activity of crude oil by *Chlorella* sp. under mixotrophic conditions // Indian J. of Science and Technology. 2018. V. 11. № 29. P. 1–8. <https://doi.org/10.17485/ijst/2018/v11i29/127832>
 27. Lennuk L., Kotta J., Taits K., Teeveer K. The short-term effects of crude oil on the survival of different size-classes of cladoceran *Daphnia magna* (Straus, 1820) // Oceanologia. 2015. V. 57. P. 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.oceano.2014.10.003>
 28. Bownik A. Physiological endpoints in daphnid acute toxicity tests // Science of the Total Environment. 2019. V. 700. 134400. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134400>