

На правах рукописи

**ЛОЗОВОЙ ДМИТРИЙ ВИКТОРОВИЧ**

**БИОЛОГИЧЕСКИЙ СПОСОБ ОБНАРУЖЕНИЯ НЕФТЯНОГО  
ЗАГРЯЗНЕНИЯ В ВОДНЫХ СРЕДАХ**

**03.00.16 – экология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Иркутск-2003**

Работа выполнена в Иркутском государственном университете

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор Стом Д.И.

кандидат биологических наук, с.н.с. Саксонов М.Н.

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, чл.-корр. РАМН, профессор Савченков М.Ф.

кандидат биологических наук, доцент, Осипова Е.В.

Ведущее учреждение:

Красноярский государственный университет

Защита состоится «19» июня 2003 г. в 17 часов на заседании диссертационного совета Д 212.074.07 при Иркутском государственном университете по адресу: 664003 г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5, Байкальский музей им. профессора М.М. Кожова (ауд. 219).

Почтовый адрес: 664003, г. Иркутск, ул. Ленина, 3, а/я 24, НИИ биологии при ИГУ.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Иркутского государственного университета.

Автореферат разослан «19» мая 2003 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета, к.б.н.



Купчинская Е.С.

Актуальность проблемы. На сегодняшний день загрязнение окружающей среды токсикантами становится таким же экологическим фактором как свет, температура и т.д. Нефть и получаемые из нее продукты относятся к числу наиболее распространенных и опасных загрязнителей (Beswick, 1996). Сегодня оценка загрязнения окружающей среды нефтепродуктами, как, впрочем, и другими токсическими веществами, производится, преимущественно, на основе результатов экоаналитических анализов (Жмур, 1997). Однако, учитывая, что загрязняющие вещества многокомпонентны, и сочетанное действие всех компонентов на живые системы не представляет собой простой суммы, аналитический контроль не позволяет судить о качестве воды в целом, и ориентация только на ПДК весьма опасна и ненадежна (Брагинский, 1998). Переход к более надежному экологическому контролю состояния окружающей среды возможен только при обязательном использовании методов биотестирования (Mancha, Diaz, Arese, 1997; Barton et al., 1999). Оперативная интегральная оценка качества воды, почвы и атмосферы методами биотестирования не заменяет химический анализ, но дополняет и предваряет его, благодаря экспрессности, простоте и невысокой стоимости методов биотестирования.

Метод биотестирования, основанный на выживаемости рачков рода *Daphnia*, является одним из наиболее широко применяемых в водной токсикологии и рекомендован в качестве первоочередного для контроля сточных вод и выявления потенциально опасных источников загрязнения водных объектов (РД 118-02-90; ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.5-2000). Вместе с тем, в острых опытах чувствительность дафний к нефтегенным загрязнителям при использовании гибели как тест-реакции явно недостаточна для оперативного контроля. В связи с этим, поиски перспективных биологических методов обнаружения нефтегенного загрязнения являются весьма актуальными.

**Цель и задачи исследований.** Основная цель настоящей работы – разработать на основе дафний новый экспрессный и высокочувствительный метод обнару-



жения нефтяного загрязнения в водных средах. Исходя из этого, были поставлены следующие задачи:

1. Предложить экспрессный, надежный и информативный метод обнаружения нефтепродуктов и их ингредиентов с использованием дафний.
2. Сопоставить чувствительность предложенного биотеста на различных видах ракообразных и разновозрастных *Cladocera* к нефтепродуктам.
3. Провести сравнительную оценку чувствительности к нефтепродуктам известных методов и предлагаемого биотеста.
4. Выявить вероятную взаимосвязь между строением нефтепродуктов и их свойствами и чувствительностью биотеста. Выяснить степень специфичности найденного теста для нефтепродуктов.
5. Изучить возможность использования предлагаемой тест-реакции для биологического контроля сред, содержащих нефтепродукты в присутствии загрязнителей других классов.
6. Исследовать возможные механизмы предлагаемой тест-реакции.
7. Оценить перспективы, ограничения и выдать рекомендации по использованию разработанного метода для биотестирования нефтезагрязненных субстратов.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. В присутствии нефти, нефтепродуктов, ароматических и алифатических углеводородов происходит всплытие ракообразных отр. *Cladocera* на границу раздела водная среда-воздух. На основе этой реакции разработан новый биологический способ обнаружения нефтяного загрязнения по тест-реакции перехода ракообразных отр. *Cladocera* в поверхностную пленку. Предлагаемый способ на несколько порядков чувствительнее к нефтепродуктам, чем известные биотесты, основанные на выживаемости и регистрации сердечного и дыхательного ритма рачков.

2. Реакция перехода в поверхностный слой специфична для нефтепродуктов. Она характерна для ракообразных отр. Cladocera и не свойственна для представителей отр. Copepoda, отр. Anostraca, отр. Podocoripida.
3. Чувствительность реакции перехода рачков на поверхность, также как и теста по выживаемости, возростала с увеличением температуры кипения фракций нефти и нефтепродуктов, а для ароматических и алифатических углеводородов - и по мере увеличения их молекулярных масс.
4. Всплытие Cladocera на поверхность обусловлено хемотаксическим эффектом углеводородов нефтей, а невозможность их последующего ухода в толщу сред связана с гидрофобизацией покровных тканей рачков углеводородами нефтяной пленки.

**Научная новизна и теоретическое значение.** Обнаружена и изучена новая поведенческая реакция Cladocera – всплытие рачков на поверхность раздела водная среда-воздух в присутствии нефти и нефтепродуктов. Установлено, что данная реакция характерна для ракообразных отр. Cladocera (*Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, *Ceriodaphnia pulchella*, *Bosmina longirostris*, *Simocephalus vetulus*, *Chydorus sphaericus*). Для рачков отр. Copepoda (*Cyclops kolensis*, *Epischura baicalensis*, *Harpacticella inopinata*), отр. Anostraca (*Artemia salina*) и отр. Podocoripida (*Heterocypris reptans*) всплытия в поверхностный слой не зафиксировано. Найденная реакция специфична для нефтепродуктов, всплытие в поверхностный слой не инициировали фенолы, соли тяжелых металлов, спирты, эфиры, поверхностно-активные вещества и биологические депрессанты. В процессе работы сопоставлена токсичность более 30 нефтепродуктов различного строения в отсутствие и присутствие других соединений различных классов на 8 видах ракообразных. Выявлено, что токсический эффект нефтепродуктов повышался по мере увеличения их температур кипения, а у ароматических и алифатических углеводородов также и по мере нарастания молекулярных масс. Изучены возможные механизмы, обуславливающие всплытие дафний под влиянием нефтепродуктов. Установлено, что всплытие тест-объектов в поверх-

ностный слой не связано с дефицитом кислорода, наркотическим действием нефтепродуктов, реакцией фототаксиса, изменением поверхностного натяжения и аккумуляцией в организме капелек нефтепродуктов. Показана определяющая роль хемотаксиса и поверхностных явлений в возникновении исследуемой реакции.

**Практическое значение работы.** Предложена новая экспрессная и высокочувствительная тест-реакция, позволяющая выявлять низкие концентрации нефтепродуктов в водных, газообразных и твердых средах, в том числе и в присутствии других химических соединений различных классов, за исключением высоких концентраций поверхностно-активных веществ. Сравнение чувствительности предложенной тест-реакции и известных биотестов позволило предложить ее в качестве высокочувствительного биологического метода для экспрессного обнаружения нефтяного загрязнения жидких и газообразных сред. Внедрение нового биотеста в систему мониторинга дает возможность оперативного контроля нефтяного загрязнения.

Результаты работы включены в отчеты лаборатории водной токсикологии НИИ биологии при ИГУ по госбюджетной теме 1999 г.; по хоздоговору 2000 г., выполненному по заданию компании "РУСИА-Петролеум"; по грантам РФФИ (№ 99-04-49612) и Интеграция (№ 54-275-15). Разработанный метод защищен патентом № 2152612 от 10.07.2000.

**Апробация работы.** Материалы диссертации представлялись на региональном научно-техническом совещании «Решение проблем охраны окружающей среды и рационального использования ресурсов в Иркутской энергосистеме» (Иркутск, 1996); Международной научно-практической конференции «Человек – среда - вселенная» (Иркутск, 1997); Юбилейной конференции «Современные проблемы экологии, природопользования и ресурсосбережения Прибайкалья» (Иркутск, 1998); Научно-практической конференции «Водные ресурсы Байкальского региона» (Иркутск, 1998); 1 съезде токсикологов (Москва, 1998); Международной научно-практической конференции «Экология речных бас-

сейнов» (Владимир, 1999); Международной научно-практической конференции «Экология. Образование. Здоровье» (Иркутск, 2000); 4 Всероссийском научном молодежном симпозиуме «Безопасность биосферы» (Екатеринбург, 2000); Международном симпозиуме по защите окружающей среды (Корея, 2000); Международной конференции «Природные условия, история и культура Западной Монголии и сопредельных регионов» (Ховд, МР, 2001).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 20 работ.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 172 страницах и состоит из введения, 6 глав, выводов и списка литературы. Список литературы включает 254 источников, в том числе 106 иностранных. Работа иллюстрирована 44 таблицами.

### Содержание работы

**Глава 1. Литературный обзор.** Проанализирована литература по влиянию нефтепродуктов на гидробионтов и по современному состоянию методов биотестирования.

**Глава 2. Объекты и методы исследований.** Материалами для написания работы послужили данные экспериментов проведенных в лаборатории водной токсикологии и на Байкальской биостанции НИИ биологии при ИГУ в пос. Большие Коты.

Объектами исследований являлись ракообразные (кл. Crustacea) отр. Cladocera (*Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, *Simocephalus vetulus*, *Bosmina longirostris*, *Ceriodaphnia pulchella*, *Chydorus sphaericus*), отр. Copepoda (*Cyclops kolensis*, *Harpacticella inopinata*, *Epischura baicalensis*), отр. Podocopida (*Heterocypris reptans*), отр. Anostraca (*Artemia salina*).

Содержание, культивирование и эксперименты проводили в лабораторных условиях согласно общепринятым методикам (Колупаев, 1988; РД 118-02-90, 1991; ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.5, 2000). *H. inopinata* и *E. baicalensis* отлавливали в оз. Байкал в районе пос. Большие Коты. Опыты с этими рачками ставили в соответствии с (Стом, Гиль, 2000; Саксонов, Балаян, Стом, 2001).

В качестве токсикантов использовали нефть Марковского месторождения Иркутской области и ее фракции со следующими температурами кипения: до 110 °С, 110-150 °С, 150-180 °С, 180-210 °С, 210-240 °С, 240-270 °С, более 270 °С. Исходную эмульсию анализируемых нефтепродуктов готовили согласно (Миронов и др., 1985). Затем последовательным разбавлением готовили нужные концентрации. Диапазон исследуемых концентраций от 10 мл/л до 10<sup>-10</sup> мл/л. Водные суспензии и эмульсии, исследуемых токсикантов готовили на воде используемой для культивирования рачков. Эта же вода служила контролем.

Все эксперименты проводили в трех параллельных сериях. В качестве контроля использовали три параллельные серии с культивационной водой. Биотестирование проводили в химических стаканах объемом 100 мл, в них помещали по 10 рачков.

В опытах определяли концентрацию, вызывающую 50 % изменение тест-показателя (выживаемость, всплытие в поверхностный слой, изменение сердечного и дыхательного ритмов) за 24 часа.

Содержание растворенного в опытных средах кислорода определяли по методу Винклера (Аналитическая химия..., 1984). Измерение поверхностного натяжения опытных сред проводили согласно (Практикум по коллоидной химии..., 1974). Аккумуляцию нефтепродуктов тест-объектами наблюдали с помощью люминесцентного микроскопа "Люам И-1" (Саксонов и др., 2001). Химические анализы проб выполнены в Межвузовской региональной лаборатории экологических исследований под руководством профессора Г.М. Шпейзера.

Для статистической обработки данных пользовались общепринятыми методами (Беленький, 1963; ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.5, 2000).

### **Глава 3. Новая высокочувствительная тест-реакция ракообразных отр. *Cladocera* на нефтепродукты**

При постановке экспериментов по токсикометрической оценке водных проб загрязненных нефтепродуктами нами было обнаружено всплытие D.



Таблица 3.1 - Концентрации (мл/л) нефтепродуктов вызывающие всплытие в поверхностный слой 50% рачков отряда Cladocera при 24-х часовой экспозиции

Нефтепродукты	Температура кипения, °С	Тест - объекты					
		<i>Daphnia magna</i>	<i>Daphnia pulex</i>	<i>Simocephalus vetulus</i>	<i>Bosmina longirostris</i>	<i>Ceriodaphnia pulchella</i>	<i>Chydorus sphaericus</i>
авиабензин Б-95/130	35-195	$(3,45 \pm 0,55) \times 10^{-2}$	$(3,67 \pm 0,79) \times 10^{-2}$	$(6,44 \pm 1,23) \times 10^{-2}$	$(4,17 \pm 0,84) \times 10^{-2}$	$(5,62 \pm 1,27) \times 10^{-2}$	$(2,16 \pm 0,37) \times 10^{-2}$
авиабензин Б-91/115		$(2,19 \pm 0,38) \times 10^{-3}$	$(5,27 \pm 0,93) \times 10^{-2}$	$(2,14 \pm 0,32) \times 10^{-2}$	$(6,69 \pm 1,24) \times 10^{-2}$	$(4,41 \pm 0,96) \times 10^{-3}$	$(4,19 \pm 0,82) \times 10^{-2}$
автобензин 80		$(5,76 \pm 1,23) \times 10^{-3}$	$(8,13 \pm 1,81) \times 10^{-3}$	$(4,15 \pm 0,83) \times 10^{-3}$	$(2,12 \pm 0,38) \times 10^{-3}$	$(2,22 \pm 0,44) \times 10^{-3}$	$(5,56 \pm 1,27) \times 10^{-3}$
автобензин 92		$(4,22 \pm 0,84) \times 10^{-4}$	$(5,33 \pm 1,15) \times 10^{-3}$	$(1,83 \pm 0,31) \times 10^{-3}$	$(6,71 \pm 1,28) \times 10^{-3}$	$(5,11 \pm 0,97) \times 10^{-3}$	$(1,92 \pm 0,35) \times 10^{-3}$
автобензин 95		$(3,64 \pm 0,87) \times 10^{-4}$	$(6,27 \pm 1,24) \times 10^{-3}$	$(7,19 \pm 1,48) \times 10^{-4}$	$(3,25 \pm 0,55) \times 10^{-4}$	$(4,18 \pm 0,83) \times 10^{-4}$	$(7,14 \pm 1,41) \times 10^{-3}$
лигроин	120-240	$(7,12 \pm 1,36) \times 10^{-5}$	$(2,13 \pm 0,33) \times 10^{-3}$	$(7,11 \pm 1,42) \times 10^{-4}$	$(5,71 \pm 1,24) \times 10^{-4}$	$(2,38 \pm 0,36) \times 10^{-4}$	$(8,22 \pm 1,84) \times 10^{-4}$
реактивное топливо Т-1	180-300	$(2,18 \pm 0,36) \times 10^{-6}$	$(5,37 \pm 1,18) \times 10^{-4}$	$(6,17 \pm 1,14) \times 10^{-4}$	$(3,44 \pm 0,77) \times 10^{-4}$	$(2,19 \pm 0,38) \times 10^{-5}$	$(1,74 \pm 0,35) \times 10^{-4}$
реактивное топливо Т-2		$(7,17 \pm 1,32) \times 10^{-6}$	$(5,26 \pm 1,12) \times 10^{-4}$	$(4,43 \pm 0,92) \times 10^{-5}$	$(7,21 \pm 1,47) \times 10^{-5}$	$(4,22 \pm 0,84) \times 10^{-5}$	$(4,25 \pm 0,76) \times 10^{-5}$
реактивное топливо Т-6		$(7,21 \pm 1,41) \times 10^{-6}$	$(1,55 \pm 0,32) \times 10^{-5}$	$(3,41 \pm 0,52) \times 10^{-6}$	$(5,15 \pm 0,92) \times 10^{-6}$	$(2,14 \pm 0,32) \times 10^{-5}$	$(5,23 \pm 1,16) \times 10^{-5}$
диз. топливо (зимнее)	220-370	$(4,12 \pm 0,84) \times 10^{-7}$	$(8,23 \pm 1,86) \times 10^{-6}$	$(2,17 \pm 0,35) \times 10^{-6}$	$(5,56 \pm 1,22) \times 10^{-6}$	$(1,55 \pm 0,32) \times 10^{-7}$	$(6,11 \pm 1,22) \times 10^{-5}$
диз. топливо (летнее)		$(2,18 \pm 0,31) \times 10^{-8}$	$(5,34 \pm 0,91) \times 10^{-7}$	$(5,16 \pm 0,92) \times 10^{-8}$	$(7,24 \pm 1,47) \times 10^{-6}$	$(7,17 \pm 1,32) \times 10^{-7}$	$(1,55 \pm 0,38) \times 10^{-6}$
мазут М-40	более 350	$(6,68 \pm 1,22) \times 10^{-8}$	$(4,23 \pm 0,86) \times 10^{-8}$	$(8,42 \pm 1,87) \times 10^{-8}$	$(2,24 \pm 0,48) \times 10^{-8}$	$(6,68 \pm 1,22) \times 10^{-8}$	$(3,38 \pm 0,72) \times 10^{-7}$
мазут М-100		$(3,22 \pm 0,59) \times 10^{-9}$	$(6,67 \pm 1,23) \times 10^{-8}$	$(1,96 \pm 0,32) \times 10^{-8}$	$(3,56 \pm 0,79) \times 10^{-8}$	$(4,23 \pm 0,86) \times 10^{-8}$	$(7,25 \pm 1,43) \times 10^{-7}$

*magna* на границу раздела эмульсия-воздух. Такое поведение рачков навело на мысль о возможности использования данной реакции в качестве показателя на присутствие нефтегенного загрязнения. В ходе проверки подобного предложения были проведены опыты с нефтью, различными нефтепродуктами, ароматическими и алифатическими углеводородами. Эксперименты показали (таблица 3.1), что реакция всплытия в поверхностный слой характерна для всех рачков отр. Cladocera вне зависимости от их видовой принадлежности. Значительных видовых различий в чувствительности к нефтепродуктам у представителей ветвистоусых не наблюдалось.

В тоже время, во всем диапазоне исследуемых концентраций токсикантов ( $10 \text{ мл/л}$ - $10^{-10} \text{ мл/л}$ ), не наблюдали перехода в поверхностный слой для представителей отр. Copepoda (*C. kolensis*, *E. baicalensis*, *H. inopinata*), отр. Anostraca (*A. salina*) и отр. Podocopida (*H. reptans*).

#### **Глава 4. Сопоставление чувствительности перехода рачков в поверхностный слой с другими критериями интоксикации Cladocera**

В практике биотестирования широко используются такие показатели, как выживаемость и изменение сердечного и дыхательного ритмов у планктонных организмов. Поэтому сопоставляли чувствительность реакции всплытия ветвистоусых рачков на поверхность слой с вышеназванными показателями токсичности.

Как показали эксперименты по такому критерию токсичности как выживаемость, нами не выявлено существенных видовых различий в чувствительности у представителей отр. Cladocera: *D. magna*, *D. pulex*, *C. pulchella*, *B. longirostris*, *S. vetulus* и *C. sphaericus* обнаруживали высокую и достаточно близкую степень чувствительности к исследуемым нефтепродуктам. Представители отр. Copepoda (*C. kolensis*) и отр. Podocopida (*H. reptans*) оказались немного более устойчивыми к токсикантам, по сравнению с ветвистоусыми рачками. Более высокую устойчивость веслоногих рачков к пестицидам, тяжелым металлам и поверхностно-активным веществам отмечали многие авторы

(Кривцова, Островский, 1980; McIntosh, Kevern, 1974) и связывали более высокую токсикорезистентность Copepoda с типом их питания (хищничество) и наличием сравнительно плотного хитинового покрова. Принимая за критерий токсичности всплытие в поверхностный слой 50 % тест-объектов, чувствительность рачков увеличивалась по мере роста температур кипения и молекулярных масс нефтепродуктов (таблица 4.1). Значительно менее выражен этот эффект, если принимать за критерий токсичности выживаемость 50 % Cladocera (рисунок 4.1).

Имеются сведения, что молодь ракообразных более чувствительна к некоторым токсикантам, чем взрослые особи. Наши исследования показали, что молодые рачки в возрасте 1 суток характеризовались более низкой устойчивостью к нефтепродуктам, чем взрослые особи в возрасте 12-14 суток, принимая за критерий токсичности выживаемость.

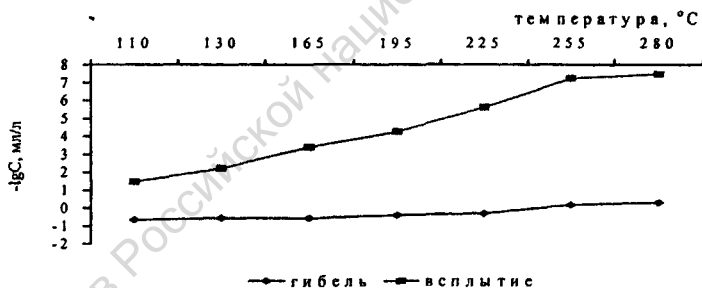


Рисунок 4.1 - Чувствительность тестов по выживаемости (50%) и всплытию (50%) *D. magna* при действии фракций нефти с различными температурами кипения

Как считают некоторые авторы, такая низкая токсикорезистентность может быть обусловлено тем, что молодь характеризуется более высокой степенью протекания биосинтетических процессов, создающих благоприятные условия для внедрения токсикантов и нарушения обмена веществ (Патин, 1979;

Таблица 4.1 - Концентрации (мг/л) ароматических и алифатических углеводородов вызывающие всплытие в поверхностный слой 50% *Daphnia magna* при 24-х часовой экспозиции

Ароматические углеводороды	Температура кипения, °С	Молекулярная масса	Концентрации, мг/л	Алифатические углеводороды	Температура кипения, °С	Молекулярная масса	Концентрации, мг/л
бензол	80	78	$(3,16 \pm 0,63) \times 10^{-2}$	пентан	36	72	$(3,34 \pm 0,67) \times 10^{-2}$
толуол	110	92	$(6,62 \pm 1,26) \times 10^{-2}$	гексан	69	86	$(7,33 \pm 1,45) \times 10^{-2}$
этилбензол	136	106	$(2,12 \pm 0,34) \times 10^{-2}$	гептан	98	100	$(2,27 \pm 0,49) \times 10^{-2}$
пара-ксилол	138	106	$(5,32 \pm 1,14) \times 10^{-4}$	изооктан	99	114	$(1,48 \pm 0,32) \times 10^{-3}$
мета-ксилол	139	106	$(1,51 \pm 0,34) \times 10^{-4}$	октан	125	114	$(4,27 \pm 0,73) \times 10^{-4}$
орто-ксилол	144	106	$(8,24 \pm 1,88) \times 10^{-5}$	нонан	150	128	$(2,32 \pm 0,44) \times 10^{-4}$
стирол	145	104	$(5,32 \pm 0,96) \times 10^{-5}$	декан	174	143	$(3,34 \pm 0,67) \times 10^{-6}$
кумол	152	120	$(4,17 \pm 0,81) \times 10^{-5}$	ундекан	195	156	$(8,37 \pm 1,92) \times 10^{-6}$
мезителен	164	120	$(7,21 \pm 1,43) \times 10^{-5}$	додекан	213	170	$(4,25 \pm 0,83) \times 10^{-7}$
псевдокумол	169	120	$(5,59 \pm 1,18) \times 10^{-5}$	гексадекан	247	226	$(7,26 \pm 1,42) \times 10^{-8}$
тетралин	207	132	$(8,41 \pm 1,83) \times 10^{-6}$	октадекан	318	254	$(3,23 \pm 0,64) \times 10^{-8}$
нафталин*	218	128	$(4,25 \pm 0,78) \times 10^{-8}$	нонадекан	330	268	$(2,34 \pm 0,41) \times 10^{-8}$
антрацен*	342	178	$(7,28 \pm 1,42) \times 10^{-8}$				

Примечание: \* - концентрации даны в мг/л

Щеглов, Григорай, 1987). Вместе с тем, принимая за показатель токсичности реакцию всплытия, взрослые особи обнаруживали более высокую чувствительность по сравнению с молодью.

Таблица 4.2 - Сравнение чувствительности некоторых тест-функций *D. magna* при действии нефтепродуктов при 24-х часовой экспозиции

Нефтепродукты	Температура кипения, °С	Концентрации (мл/л), вызывающие изменение тест - функций в 2 раза			
		гибель 50 % рачков	всплытие в поверхностный слой 50 % рачков	50% изменение частоты	
				сердцебиения	дыхания
авиабензин Б-95/130	35-195	5,52±0,96	$(3,45±0,55) \times 10^{-2}$	2,85±0,54	1,13±0,22
автобензин 95		3,24±0,55	$(3,64±0,87) \times 10^{-4}$	1,17±0,21	$(7,62±1,52) \times 10^{-1}$
реактивное топливо Т-6	180-300	1,23±0,23	$(7,21±1,41) \times 10^{-6}$	$(6,48±1,29) \times 10^{-2}$	$(3,46±0,58) \times 10^{-3}$
дизельное топливо (летнее)	220-370	1,13±0,21	$(2,18±0,31) \times 10^{-8}$	$(4,85±0,92) \times 10^{-3}$	$(8,19±1,47) \times 10^{-4}$
топочный мазут М-100	более 350	$(2,46±0,43) \times 10^{-1}$	$(3,22±0,59) \times 10^{-9}$	$(8,53±1,62) \times 10^{-4}$	$(6,37±1,14) \times 10^{-5}$

Материалы таблицы 4.2 показывают, что 50 % изменение дыхательного ритма в эмульсиях исследуемых токсикантов фиксировали в несколько более низких концентрациях, чем 50 % изменение сердцебиения. Вместе с тем, биотесты основанные на регистрации изменения сердцебиения и дыхания оказались более чувствительны к исследуемым токсикантам, чем метод биотестирования основанный на выживаемости рачков. Исследуемая реакция, основанная на регистрации всплытия рачков в поверхностный слой, оказалась более чувствительной к исследуемым токсикантам, чем названные биотесты, при этом техника постановки опытов проста и доступна для широкого применения.

## Глава 5. Специфичность реакции всплытия *Cladocera* в поверхностный слой на нефтепродукты

Компонентный состав сточных вод предприятий нефтехимической промышленности чрезвычайно разнообразен и зависит от профиля вырабатываемой продукции. В этой связи представлялось важным оценить влияние нефте-

продуктов в смесях с различными химическими соединениями на реакцию всплытия *Cladocera* в поверхностный слой.

Эксперименты показали, что различные фенолы, кислоты, щелочи, соли металлов, спирты, эфиры и биологические депрессанты (хлороформ, ацетон, четыреххлористый углерод и др.) всплытия рачков *Cladocera* в поверхностный слой не инициировали во всем диапазоне исследуемых концентраций.

Поверхностно-активные вещества, также как и другие исследованные токсиканты, не вызывали перехода ветвистоусых рачков в поверхностный слой. Вместе с тем, в смесях с нефтепродуктами они оказывали существенное влияние на реакцию всплытия дафний. Представленные в таблице 5.1 материалы показывают, что при наличии в опытных средах додецилсульфата натрия (ДСН) в концентрации  $10^{-2}$  мл/л все дафнии были живы, всплытия рачков в поверхностный слой при этом не происходило. Присутствие ПАВ в концентрациях  $10^{-3}$  мл/л заметно сказывалось на поведении тест-объектов: часть рачков переходило в поверхностный слой, другие активно плавали в толще инкубационных сред. Концентрация  $10^{-4}$  мл/л ДСН не оказывала видимого воздействия на реакцию всплытия.

Таблица 5.1 - Влияние додецилсульфат натрия в смесях с нефтепродуктами на реакцию всплытия *D. magna* (в %) при 24-х часовой экспозиции

Нефте-продукты	Концентрации (мл/л) вызывающие всплытие 50% рачков	Додецилсульфат натрия, мл/л		
		$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$
дизельное топливо (летнее)	$(2,18 \pm 0,31) \times 10^{-8}$	- (+)	- (+)	$63,67 \pm 12,09$ (+↑)
нефть	$(7,19 \pm 1,42) \times 10^{-6}$	- (+)	$38,51 \pm 7,31$ (+↑)	$54,16 \pm 9,73$ (+↑)
мазут М-100	$(3,22 \pm 0,59) \times 10^{-9}$	- (+)	$52,18 \pm 9,91$ (+↑)	$68,92 \pm 13,78$ (+↑)
лигроин	$(7,12 \pm 1,36) \times 10^{-5}$	- (+)	$42,53 \pm 8,12$ (+↑)	$61,84 \pm 11,13$ (+↑)

Примечание: (-(+)) – рачки живы, плавают в толще опытных сред; (+↑) – рачки живы, находятся в поверхностном слое

Сходное действие на поведение *Cladocera* оказывали и другие использованные в опытах поверхностно-активные вещества (Tween-21, Tween-40, Triton X-100): низкие концентрации ПАВ в смесях с нефтепродуктами не влияли на

проявление реакции всплытия ветвистоусых рачков в поверхностный слой, а высокие концентрации предотвращали исследуемую реакцию. Отметим, что в экспериментах использовали нетоксичные для тест-объектов концентрации ПАВ (при 24-х часах), и концентрации нефтепродуктов, в которых при суточной экспозиции фиксировали всплытие в поверхностный слой 50 % рачков.

Предложенный метод был использован при оценке качества природных сред на Ковыктинском газоконденсатном месторождении. При химическом определении нефтепродуктов в снеговой воде и почве во всех взятых пробах в районе буровой скважины 1071 КГКМ было зафиксировано наличие нефтепродуктов. Данные пробы не оказывали ингибирующего действия на гашение люминесценции светящихся бактерий и не вызывали гибели дафний (*D. magna*) при суточной экспозиции, но во всех пробах наблюдали всплытие рачков в поверхностный слой. Полученные данные подтверждают результаты химического анализа, т.е. наличие в пробах нефтепродуктов. С другой стороны водные вытяжки бурового шлама взятого с различных глубин скважины 1071, отличались высокой токсичностью для гидробионтов. При этом, в пробах не наблюдали всплытия дафний в поверхностный слой. Как показали данные химических анализов, в пробах нефтепродукты отсутствовали. Результаты анализа засоления бурового шлама показали, что концентрация солей в шламе очень высокая (от 290 до 440 г/кг сухого шлама). Очевидно, что токсичность опытных проб обусловлена именно высокими концентрациями NaCl. Анализ проб продемонстрировал возможности использования на практике предложенного способа обнаружения нефтяного загрязнения. Такой подход должен лишь предварять, а не исключать последующее использование признанных аналитических методов, особенно в тех случаях, когда результаты биотестирования оправдывают необходимость подключения сложных аналитических процедур.

**Глава 6. Возможные причины всплытия *Cladocera* в поверхностную пленку в присутствии нефтепродуктов**

Для выявления возможных механизмов, лежащих в основе исследуемой реакции всплытия ветвистоусых рачков в поверхностный слой опытных сред содержащих нефть и нефтепродукты, была проведена серия экспериментов.

Нами было проверено, не связано ли всплытие *Cladocera* в поверхностный слой с возможным дефицитом кислорода, наступающим при образовании поверхностной пленки нефтепродуктов.

На обогащенной и обедненной кислородом воде готовили эмульсии дизельного топлива с концентрацией  $10^{-7}$  мл/л. После приготовления эмульсий содержание кислорода составляло  $10,8 \pm 1,4$  мг/л и  $2,9 \pm 0,5$  мг/л соответственно. В результате, при суточной экспозиции наблюдали всплытие 50 % дафний в поверхностный слой и в насыщенной и в обедненной кислородом эмульсиях. Это убедительно свидетельствовало против того, что всплытие рачков в поверхностный слой может быть связано с недостатком кислорода.

Известно, что под толстым нефтяным slickом приток света может быть сокращен более, чем на 90 %, что резко снижает скорость фотосинтеза фитопланктона и может препятствовать ежедневной вертикальной миграции зоопланктона, регулируемой интенсивностью света (Миронов, 1985). Установлено, что изменение знака фототаксиса или прекращение реагирования на свет являются показателями функциональных нарушений у планктонных организмов под действием токсических веществ (Флеров, 1989). Поэтому возникал вопрос, не могло ли каким-то образом изменение характера освещенности и реакции фототаксиса, под действием нефтепродуктов, быть причиной всплытия *Cladocera* в поверхностный слой. Однако, при всех манипуляциях со светом (направление светового потока сверху, снизу, сбоку) и даже в полной темноте, в эмульсиях дизельного топлива с концентрацией  $10^{-7}$  мл/л фиксировали всплытие 50 % тест-объектов в поверхностный слой. Таким образом, исследуемая реакция не зависела от интенсивности и характера освещения, и, следовательно, не может быть обусловлена влиянием нефтепродуктов на фототаксическую реакцию дафний.



Имеются сообщения, что в состав нефтепродуктов входят соединения, обладающие наркотическими свойствами (Curtier, Peoples, 1954; Goldacre, 1968). Как показали наши эксперименты, в диапазоне концентраций 10 мл/л- $10^{-10}$  мл/л вещества, обладающие наркотическими свойствами (хлороформ и четыреххлористый углерод), не инициировали всплытия *D.magna* в поверхностный слой при 24-х часовой экспозиции. Таким образом, исследуемую реакцию *Cladocera* нельзя объяснить наркотическим действием нефтепродуктов.

Известно, что представители зоопланктона способны захватывать мелкодисперсные частицы нефтепродуктов и накапливать их в концентрациях, многократно превышающих их содержание в окружающей среде (Авдеева, Миронова, 1981; Mackie et al., 1978; Spooner, Corkett, 1979).

Было высказано предположение, что обнаруженная нами реакция всплытия рачков в поверхностный слой, может быть связана с фактом накопления мелкодисперсных частиц нефтепродуктов и придания им, тем самым, дополнительной плавучести. Но как показали наши исследования, накопление люминесцирующих капелек нефти происходило в жировых включениях рачков отряда *Copepoda* – *E. baicalensis*, *C. kolensis* и *H. inopinata*. Для *Cladocera* подобного эффекта мы не обнаружили. Принимая во внимание, что для веслоногих рачков реакции всплытия в поверхностный слой не наблюдали при действии как нефтепродуктов, так и нефтяных углеводородов, исследуемую нами реакцию нельзя объяснить фактом накопления тест-объектами частиц нефтепродуктов.

В ходе экспериментов возникло предположение, что исследуемая реакция может быть связана с хемотаксисом. В эксикаторы объемом 3 литра помещали сосуды объемом 100 мл с водой и 10 дафниями и сосуд с эмульсией дизельного топлива (концентрация 10 мл/л). При 24-х часовой экспозиции, во всех сосудах с водой, в которых отсутствовало дизельное топливо, наблюдали 100 % всплытие *D.magna* в поверхностный слой.

Следующий эксперимент ставили с эмульсией дизельного топлива (концентрация  $10^{-7}$  мл/л) в двух сериях. В первой серии опыта, в пробирку наливали эмульсию и помещали 10 дафний, сосуд закрывали герметично крышкой, при этом воздушной фазы не было. В другом варианте в пробирке оставляли воздушную фазу. В результате, в первом случае рачки более суток жили в инкубационных средах и реакции всплытия не отмечали. Во втором варианте наблюдали всплытие тест-объектов в поверхностный слой.

В опытах применяли проточные установки парного выбора, которые представляли собой боксы размером 20x40 см с поперечной перегородкой, разделяющей каждый на два параллельных отсека. Установки были герметично закрыты крышками с наличием воздушной фазы над жидкостью. В отсеки разделяльно подавали 2 потока жидкости: один поток с водой, другой поток с токсикантом (Флеров, 1989). При поступлении в один отсек воды, а в другой отсек эмульгированных нефтепродуктов (нефть, дизельное топливо, бензол и гексан в диапазоне концентраций  $10^{-1}$ - $10^{-3}$  мл/л) тест-объекты переплывали из отсека с водой в отсек, содержащий эмульсию.

Анализируя полученные данные, можно отметить, что для возникновения исследуемой реакции всплытия *Cladocera* в поверхностный слой необходимо наличие в опыте двух фаз – жидкой и воздушной. При этом необязателен непосредственный контакт нефтепродукта с тест-объектами, достаточно лишь наличие токсикантов в воздушной фазе. По всей вероятности всплытие ветвистоусых рачков в поверхностный слой связано с наличием в воздушной среде летучих фракций нефтепродуктов, что позволяет использовать данный метод для обнаружения нефтяных углеводородов не только в водной среде, но и в воздухе. Перемещение дафний из отсеков с водой в отсеки с эмульсией нефтепродуктов в проточных камерах свидетельствует о хемотаксическом характере тест-реакции. Результаты всех выполненных нами экспериментов, с большой долей вероятности позволяют говорить о том, что рачков привлекают именно нефтепродукты, накапливающиеся на поверхности раздела вода-воздух.

Наблюдение в люминесцентном микроскопе показало, что тело дафний, перешедших в поверхностный слой, покрыто тонкой пленкой нефтепродуктов, а у рачков, извлеченных из толщи водной эмульсии, такая пленка отсутствует. Таким образом, невозможность ухода рачков из поверхностного слоя в толщу инкубационных сред обусловлена гидрофобизацией их покровных тканей углеводородами нефтяной пленки, которая в дальнейшем препятствует обратимости поведенческой реакции, т.е. переходу *Cladocera* с границы раздела фаз в толщу инкубационных сред.

#### Выводы:

1. Обнаружена и изучена реакция всплытия рачков отр. *Cladocera* в присутствии эмульсий нефтепродуктов, ароматических и алифатических углеводородов на границу раздела фаз жидкость-воздух и на основе этой реакции разработан новый высокочувствительный экспрессный и технически простой биологический метод обнаружения нефтяного загрязнения в природных средах.
2. Поведенческая реакция всплытия специфична только для нефтепродуктов. Тяжелые металлы, фенолы, спирты, эфиры, поверхностно-активные вещества и вещества обладающие наркотическими свойствами переход рачков в поверхностный слой не инициировали.
3. Показана специфичность реакции всплытия в зависимости от тест-объектов и их возраста. Изучаемый эффект наблюдался только для рачков отр. *Cladocera* (*Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, *Simocephalus vetulus*, *Bosmina longirostris*, *Ceriodaphnia pulchella*, *Chydorus sphaericus*). Для представителей отр. *Copepoda* (*Cyclops kolensis*, *Epischura baicalensis*, *Harpacticella inopinata*), отр. *Podocopida* (*Heterocypris reptans*), отр. *Anostraca* (*Artemia salina*) всплытия в поверхностный слой эмульсий нефтепродуктов не зафиксировано.
4. Чувствительность поведенческой реакции всплытия *Cladocera* для некоторых нефтепродуктов на 3-7 порядков выше, чем биотестов основанных на выживаемости рачков, а также изменении сердцебиения и дыхания.

5. Установлено, что чувствительность реакции всплытия, также как и теста по выживаемости, возрастала с увеличением температуры кипения фракций нефти и нефтепродуктов, а для ароматических и алифатических углеводородов и по мере увеличения их молекулярных масс.

6. Показано, что всплытие рачков в поверхностный слой не связано с дефицитом кислорода, наркотическим действием нефтепродуктов, реакцией фототаксиса, изменением поверхностного натяжения и аккумуляцией в организме нефтепродуктов.

7. Переход рачков в поверхностный слой под действием летучих фракций нефтепродуктов без непосредственного контакта организма с эмульсией, необходимость для его осуществления воздушной фазы и факт привлечения ветвистоусых рачков эмульгированными нефтепродуктами в проточных камерах парного выбора свидетельствуют в пользу природы хемотаксического эффекта. Невозможность последующего ухода рачков из поверхностного слоя в толщу эмульсий связана с гидрофобизацией их покровных тканей углеводородами нефтяной пленки.

#### **Основные публикации по теме диссертации**

1. Балаян А.Э., Саксонов М.Н., Стом Д.И., Лозовой Д.В. Реакция всплытия дафний при действии нефтепродуктов // Международная научно-практическая конференция «Человек-среда-вселенная»: Тез. докл., Иркутск, 16-20 июня 1997.- т. 1.- С. 37-38.

2. Лозовой Д.В., Баранская В.К., Саксонов М.Н. Влияние парафиновых углеводородов нефти на *Daphnia magna* // Научно-практическая конференция «Водные ресурсы Байкальского региона: проблемы формирования и использования на рубеже тысячелетий» Тез. докл., 6-9 октября 1998 г., Иркутск. - т. 2. - С.27.

3. Стом Д.И., Саксонов М.Н., Балаян А.Э., Потапов Д.С., Лозовой Д.В., Бархатова О.А., Горбунов В.В., Агапова А.В. Разработка новых методов биотестиро-

- вания нефтепродуктов // 1 съезд токсикологов России: Тез. докл., 17-20 ноября 1998 г. – Москва. - С. 320.
4. Лозовой Д.В., Стом Д.И., Балаян А.Э., Саксонов М.Н., Баранская В.К. Перспективный метод биотестирования нефтяного загрязнения // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. - 1998. - № 2 (8). - С. 137-139.
5. Лозовой Д.В., Балаян А.Э., Саксонов М.Н., Стом Д.И. Влияние детергентов на реакцию биотестирования нефтепродуктов с помощью *Cladocera* // Междунар. науч.-практ. конф.: Экология речных бассейнов. - Тез. докл. - Владимир: Владимиринформэкоцентр, 1999. - С. 92.
6. Лозовой Д.В., Балаян А.Э., Саксонов М.Н., Стом Д.И. *Daphnia magna* как тест-объект при оценке токсичности нефтяного загрязнения // Проблемы систематики, экологии и токсикологии беспозвоночных: сборник статей. – Иркутск, 2000. - С.104-107.
7. Balayan A.E., Saxonov M.N., Stom D. I., Polovitkin V.P., Lozovoy D.V. Method of biotesting of oil pollution based on behavior of *Daphnia magna* // Program and Proceedings of the International Symposium on Ecotechnology in Environmental Protection and Fresh Water Lake Management, october 17-20, 2000. - Natural Science Auditorium, PaiChai University, 2000. - P. 254.
8. Лозовой Д.В. Биотестирование нефтепродуктов с помощью ракообразных // Безопасность биосферы: Сборник тезисов докладов. - Екатеринбург: УГТУ-УПИ, 2000 - С. 108.
9. Балаян А.Э., Саксонов М.Н., Стом Д.И., Лозовой Д.В., Стом А.Д. Выбор тест-объекта при биотестировании нефтепродуктов // Биоразнообразие Байкальского региона; Труды биол.-почв. факультета ИГУ. – Иркутск: ИГУ, 2001. – Вып.4. – С. 9-12.
10. Балаян А.Э., Саксонов М.Н., Стом Д.И., Лозовой Д.В., Стом А.Д. Действие нефтепродуктов и поверхностно-активных веществ на *Daphnia magna* // Биоразнообразие Байкальского региона; Труды биолого - почв. факультета ИГУ. – Иркутск: ИГУ, 2001. – Вып.4. – С. 19-23.

11. Лозовой Д.В. Оценка токсичности эмульсий нефтепродуктов на разновозрастных *Daphnia magna* // 5 Международная конференция “Природные условия, история и культура Западной Монголии и сопредельных регионов”: 20-24 сентября 2001 г. г. Ховд, МНР. – С. 46-47.



Подписано к печати 19.05.2003 г.

Объем 1 п.л. Тираж 120 экз. Заказ № 227

Издательство Института географии СО РАН,

664033, Иркутск, ул. Улан-Баторская, 1

Институт географии СО РАН, 2003 г.

Из фондов Российской национальной библиотеки

Из фондов Российской национальной библиотеки

2003-A

9365

№ .9 365

Из фондов Российской национальной библиотеки