

**Фаина Викторовна ГОРДЕЕВА** —  
аспирант Тюменской государственной  
сельскохозяйственной академии

**Людмила Владимировна МИХАЙЛОВА** —  
зав. кафедрой водных биоресурсов и  
гидроэкологии Тюменской государственной  
сельскохозяйственной академии,  
кандидат биологических наук, профессор  
g-r-c@mail.ru

**Галина Александровна ПЕТУХОВА** —  
профессор кафедры экологии и генетики  
Тюменского государственного университета,  
доктор биологических наук  
gpenuchova@utmn.ru

УДК 631.427

## **ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ PARAMESCIUM CAUDATUM В ВОДНЫХ ЭКСТРАКТАХ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОГО ТОРФА**

### **VITAL PARAMETERS PARAMESCIUM CAUDATUM IN WATER EXTRACTS OF OIL POLLUTED SOIL**

**АННОТАЦИЯ.** Исследовано влияние водных экстрактов нефтезагрязненных почв на жизненные показатели *Paramecium caudatum* — численность, пищеварительную активность и хемотаксис. Показано, что почвы, содержащие 300-10000 мг/кг нефти, замедляют процесс размножения и пищеварительную активность простейших.

**SUMMARY.** The influence of water extract of oil polluted soil on vital parameters *Paramecium caudatum* — number, digestive activity and chemotaxis is investigated. It is shown that ground, containing 300-10000 mg/kg of oil slow the process of the duplication and digestive activity of the animalcule organisms.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА.** Водный экстракт, нефтезагрязненные почвы, *Paramecium caudatum*, численность, пищеварительная активность, хемотаксис.

**KEY WORDS.** Water extract, oil polluted soil, *Paramecium caudatum*, number, digestive activity, chemotaxis.

Нефть и нефтепродукты относятся к числу наиболее распространенных и опасных загрязняющих веществ. Огромные масштабы добычи и транспортировки нефти на протяжении последних десятилетий обусловили сильное негативное воздействие на окружающую среду, в том числе и почвы ХМАО-Югры [1].

Почва — это центральное звено биогеохимического круговорота веществ, источник поступления их в растительные организмы и по трофическим цепям — в организм животных и человека [2]. В районах нефтедобычи и нефтепереработки наблюдается интенсивная трансформация физико-химических и биологических свойств почв [3].

Наиболее сильно загрязняются нефтью, буровыми растворами, другими веществами и продуктами добычи и транспортировки нефти болотные экосистемы. Болота выполняют роль природных ловушек, которые сорбируют и тем самым задерживают многие, в том числе токсичные вещества, в частности нефть и нефтепродукты [4]. Торфяная залежь представляет собой по существу водный объект, в котором сухого вещества содержится всего лишь 5-14%. Торф по



своей способности впитывать и удерживать воду является уникальным в ряду природных сорбентов [5], а болота являются перераспределителем вод, а заодно и накопившихся загрязняющих веществ.

Настоящая работа посвящена изучению влияния водных экстрактов нефтезагрязненного торфа на *Paramecium caudatum*. Известно, что простейшие являются неизменным компонентом как почвенных, так и водных биоценозов [6], [7].

**Материал и методы исследования.** Почву органогенного типа (верховой торф) с Ханты-Мансийского района освобождали от крупных включений, высушивали, измельчали. Раствор шаимской нефти в петролейном эфире наносили на тонкий слой почвы из пульверизатора при постоянном перемешивании из расчета 300, 1000, 3000, 10000 мг/кг. По плотности (0,846 г/см<sup>3</sup>) и составу используемая нефть относится ко II группе смешанных метано-нафтеноароматических нефтей. Торф и нефть имеют одинаковую генетическую природу, поэтому количественному определению нефтяного загрязнения в пробах торфа сильно мешает высокий фон органического вещества, извлекаемого элюентом. Тестировали водный экстракт нефтезагрязненных почв (1:10) с помощью простейших *Paramecium caudatum* [8]. Контролем служила разведенная в 2 раза питательная среда —  $K_1$  и водная вытяжка из торфа без нефти —  $K_2$ .

**Критерием острой и хронической токсичности** является статистически достоверное различие с контролем или снижение численности простейших на 50% и 25% по сравнению с контролем в течение 24-х и 96-часовой и более экспозиции соответственно. Проба является токсичной также при стимуляции клеток простейших более чем на 30% [9]. Кроме того, учитывались фагоцитарная активность и хемотаксис парамеций [10].

В качестве критерия состояния пищеварительной функции использовали метод подсчета числа пищеварительных вакуолей, сформировавшихся за определенный промежуток времени [9]. Определение хемотаксиса производили в условиях острого и хронического опытов через каждые 4 суток в течение 120 минут на протяжении всей экспозиции (16 сут.).

**Результаты исследований и их обсуждение.** При исследовании водных вытяжек нефтезагрязненного торфа в течение всего периода наблюдений проявлялся синусоидный характер изменения численности простейших (рис. 1). Так на 3-4 сутки эксперимента численность парамеций однонаправлено сокращалась на 19,2-61,0%. На 8 сутки наблюдалось резкое ускорение (в 1,6-2,0 раза) темпа деления *P. caudatum* в опытах, в связи с чем численность клеток возросла в 2,7-4,4 раза по сравнению с уровнем  $K_1$ .

На 12 сутки в водных вытяжках почв с содержанием нефти 300 и 1000 мг/кг существенных отличий с  $K_1$  не наблюдали, а при содержании нефти 3000 и 10000 мг/кг отмечалось значительное снижение численности простейших — на 45,8-53,1% по сравнению с  $K_1$ .

На 16 сутки скорость деления клеток культуры увеличилась, что сопровождалось интенсивным приростом численности простейших (на 58,4-128,2% по сравнению с  $K_1$ ).

Таким образом, резкие изменения скорости роста культуры под влиянием водных вытяжек нефтезагрязненных почв обусловлены двумя факторами: действием отбора (малоустойчивые особи погибали) и проявлением адаптаций резистентных особей.

По данным Г.А. Петуховой [11], у парамеций, наряду с физиологическими механизмами, при адаптации к нефти большую роль играют генетические механизмы (отбор устойчивых особей), что показано также и в опытах с буровы-



ми шламами [12]. Вместе с напряженной работой систем физиологической адаптации, обуславливающих выживаемость инфузорий при возрастании концентрации нефти в грунте, отмечена элиминация только части наиболее чувствительных особей. Выжившая часть популяции имела, вероятно, приспособления к действию токсиканта в высокой концентрации.

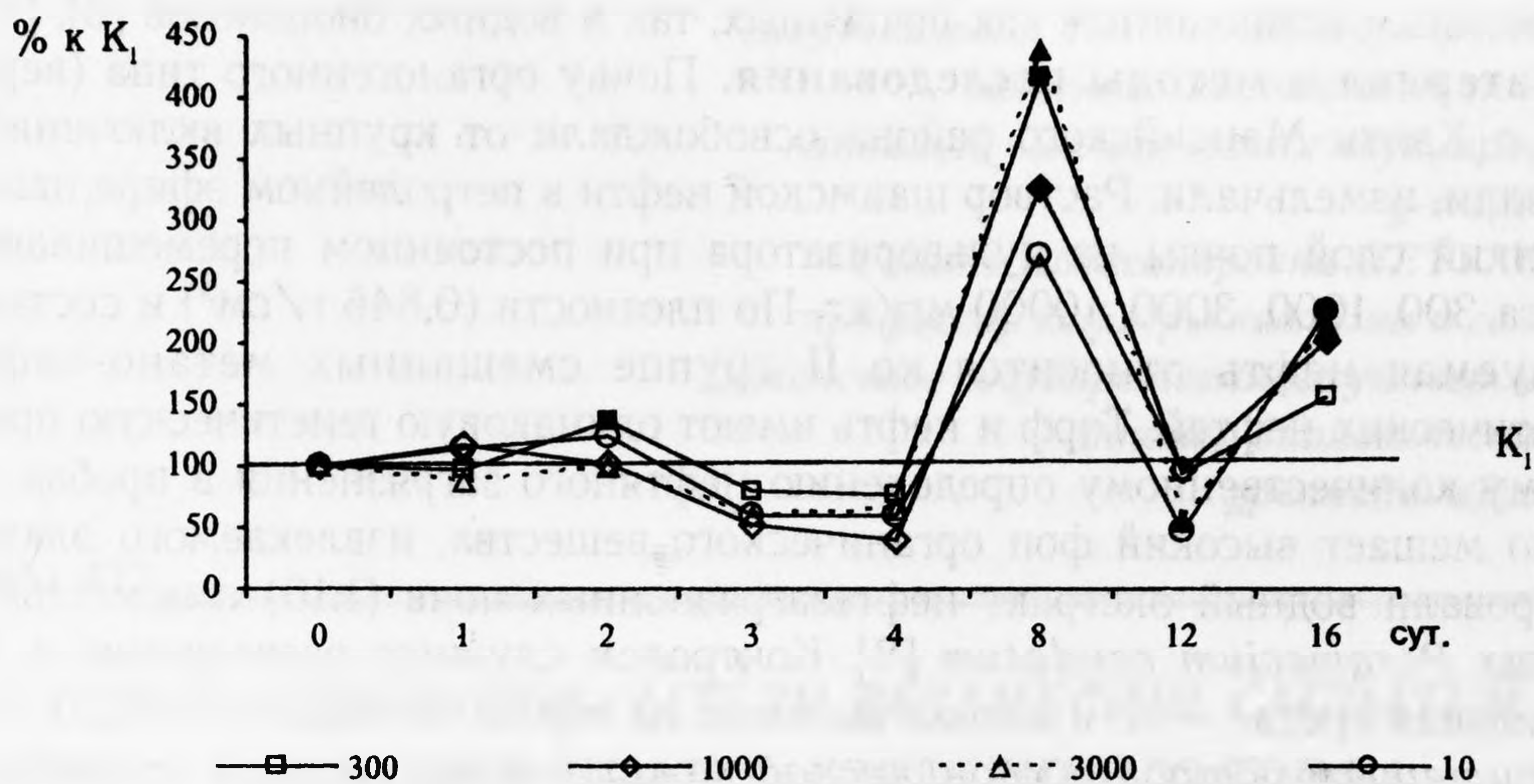


Рис. 1. Численность *Paramecium caudatum* в водных экстрактах нефтезагрязненного торфа (1:10) относительно  $K_1$

По отношению к  $K_2$  численность простейших в водных вытяжках нефтезагрязненных почв начала снижаться с 3 суток, и к 8 суткам была статистически достоверно ниже уровня  $K_2$ . На 12 сутки водные вытяжки из торфа с содержанием нефти 300 и 1000 мг/кг стимулировали рост культуры простейших, а при содержании нефти 3000 и 10000 мг/кг — угнетали. На 4, 8 и 16 сутки во всех исследуемых водных вытяжках из нефтезагрязненного торфа проявлялся эффект угнетения численности парамеций (рис. 2).

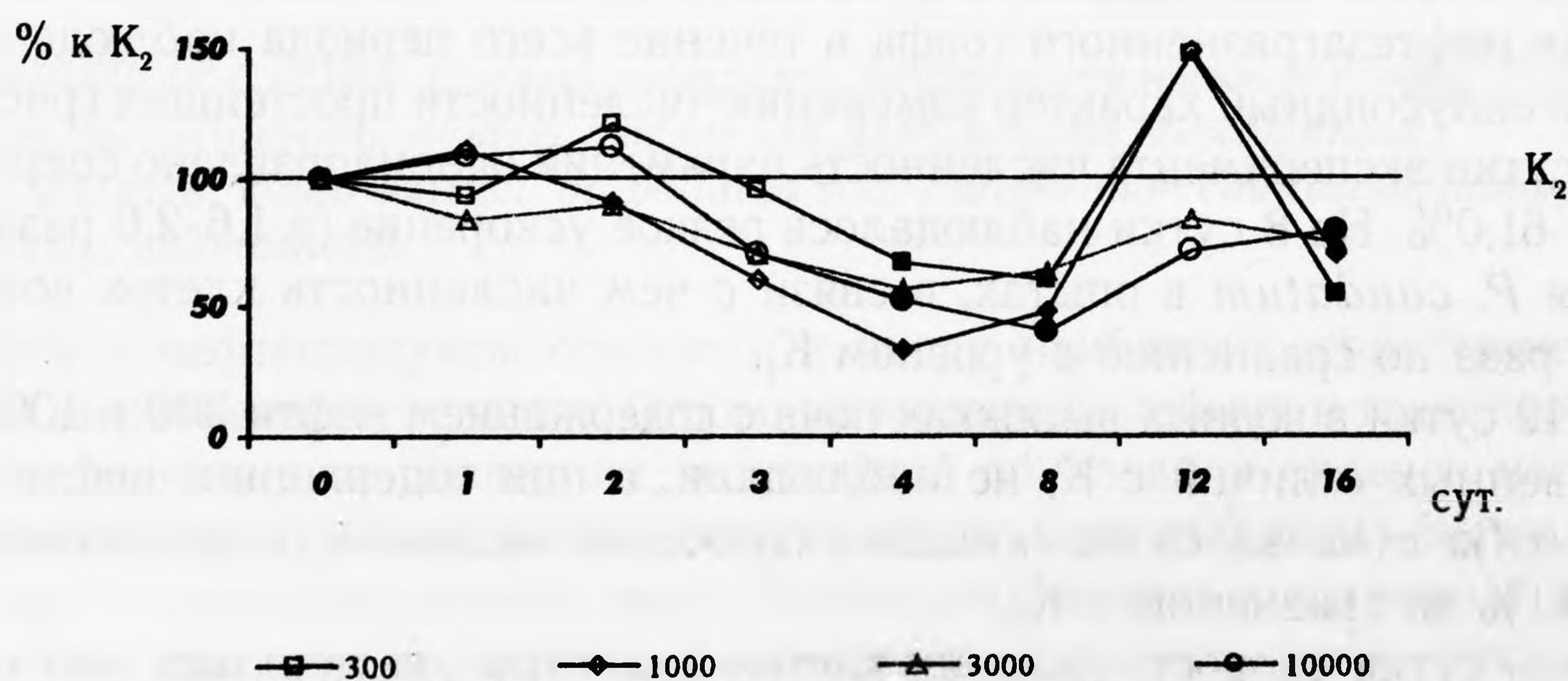


Рис. 2. Численность *P. caudatum* в водных экстрактах нефтезагрязненного торфа (% к  $K_2$ ).

По-видимому, такая динамика численности парамеций связана с физико-химическими свойствами торфа. Торф как высокоэффективный природный сорбент хорошо удерживает нефтяные углеводороды. Однако в водные вытяжки при встряхивании они переходят в воду в очень малых количествах (1,05-1,36 мг/л) по сравнению с внесенным.



Водная вытяжка холостой пробы торфа ( $K_2$ ) с 1 по 4 и на 12 сутки практически не отличалась от уровня  $K_1$ . Однако на 8 и 16 сутки наблюдалась резкая стимуляция численности инфузорий — в 6,8 и 2,9 раза по сравнению с  $K_1$  соответственно (рис. 3).



Рис. 3. Численность *P. caudatum* в водном экстракте холостой пробы торфа по сравнению с  $K_1$

Значительное увеличение численности парамеций в водных вытяжках нефтезагрязненного торфа и в холостой пробе на 8 сутки (см. рис. 1 и 3), вероятнее всего, связано со стимулирующим действием нефти и присутствием в торфе органических веществ. Исследования А.Д. Жирковой и Л.И. Никитиной [13] показали, что высокие концентрации нефти угнетают, а низкие стимулируют развитие инфузорий. Предположительно, стимулирующий эффект низких концентраций является следствием развития в среде бактерий, водорослей, которые служат кормом для инфузорий. Известно также, что углеводный комплекс торфа состоит из водорастворимых и легкогидролизуемых простых и сложных сахаров.

Фагоцитарная функция инфузорий изменяется при более низких концентрациях токсиканта, чем выживаемость. Интенсивность вакуолеобразования зависит как от концентрации токсиканта, так и от времени его действия. При хроническом действии может отмечаться некоторое восстановление интенсивности фагоцитоза [14]. Л.Н. Серавин [15] отмечает фазное изменение процесса пищеварения при действии пороговых концентраций химических веществ: подавление, стимуляция и возвращение к норме. В более слабых концентрациях подавление и стимуляция фагоцитоза могут быть менее выражены.

Пищеварительная активность *P. caudatum* в водных вытяжках нефтезагрязненного торфа через 15 мин. экспозиции в 1 сутки опыта снижалась на 12,4-19,0% по сравнению с  $K_1$  (рис. 4). На 4 сутки во всех водных вытяжках число образовавшихся у инфузорий пищеварительных вакуолей превышало уровень  $K_1$  на 19,3-60,2%. К 8 суткам значительных отклонений от  $K_1$  не наблюдалось, за исключением водной вытяжки с содержанием нефти 1000 мг/кг, здесь проявлялось угнетение пищеварительной активности инфузорий на 16,8% ( $P < 0,05$ ). На 12 сутки в водных вытяжках торфа при содержании нефти 1000, 3000 и 10 000 мг/кг число вакуолей у парамеций снижалось против  $K_1$  на 20,3-25,7%, а при 300 мг/кг — было на уровне  $K_1$ . На 16 сутки хроническое токсическое действие оказывала водная вытяжка нефтезагрязненного торфа с минимальным содержанием нефти 300 мг/кг, уменьшая количество пищеварительных фагосом на 12,3% против  $K_1$ . Обращает внимание, что водная вытяжка торфа без нефти ( $K_2$ ) существенно от  $K_1$  не отличалась на протяжении всего эксперимента ( $P > 0,05$ ), то есть не влияла на пищевую активность парамеций. Поэтому различия опытных вариантов с  $K_2$  наблюдались лишь



на 4 сутки при стимуляции фагоцитарной активности в водных вытяжках с содержанием нефти 300 и 10000 мг/кг на 36,4-83,1% ( $P < 0,05-0,01$ ).

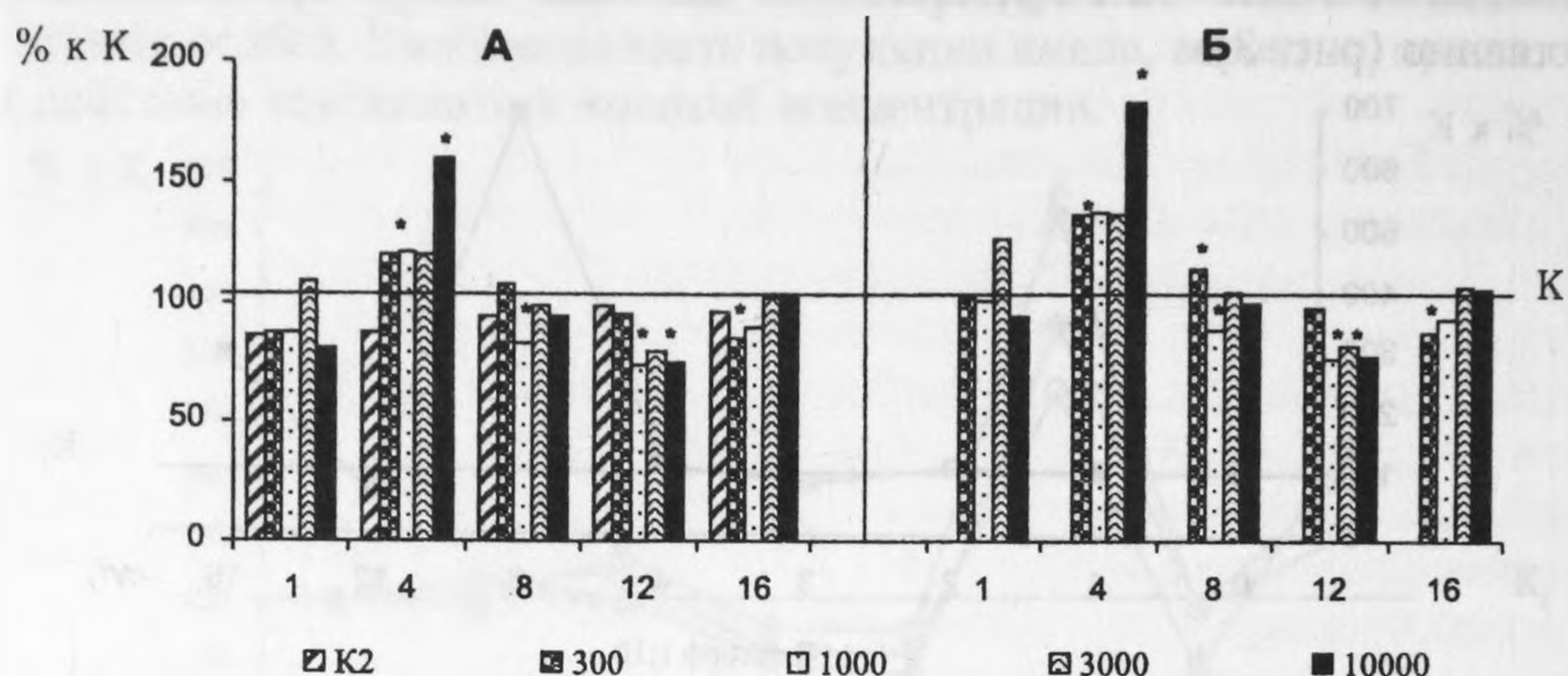


Рис. 4. Фагоцитоз *P. caudatum* в водных экстрактах нефтезагрязненного торфа, % к  $K_1$  (А) и к  $K_2$  (Б)

Метод биотестирования по реакции хемотаксиса парамеций основан на способности инфузорий перемещаться в направлении или от источника химического воздействия. Интактных парамеций помещали в чистую каплю воды, соединенную со второй каплей суспензии нефтезагрязненных почв (опыт). На 1 сутки контрольные особи практически равномерно распределились в обеих каплях воды (табл. 1). В дальнейшем контрольные особи концентрировались в одной из капель чистой воды.

Таблица 1

**Хемотаксис *P. caudatum* в водных экстрактах нефтезагрязненного торфа**

| Содержание нефти   | Капля   | Сутки опыта |             |          |           |          |
|--------------------|---------|-------------|-------------|----------|-----------|----------|
|                    |         | 1           | 4           | 8        | 12        | 16       |
| К                  | чистая  | 5,7±0,99    | 3,1±0,67    | 6,9±0,85 | 6,7±1,22  | 7,4±1,33 |
|                    | чистая  | 4,3±0,99    | 6,9±0,67    | 3,1±0,85 | 3,3±1,22  | 2,6±1,33 |
| Чистая проба торфа | чистая  | 6,8±0,54    | 5,8±1,01    | 4,6±0,69 | 3,5±0,62* | 7,6±0,69 |
|                    | грязная | 3,2±0,54    | 4,2±1,01    | 5,4±0,69 | 6,5±0,62* | 2,4±0,69 |
| 300 мг/кг          | чистая  | 2,3±0,88*   | 8,1±0,46*** | 6,5±1,51 | 4,0±0,65  | 6,7±0,74 |
|                    | грязная | 7,7±0,88*   | 1,9±0,46*** | 3,5±1,51 | 6,0±0,65  | 3,3±0,74 |
| 1000 мг/кг         | чистая  | 2,7±1,13    | 1,8±0,57    | 5,8±1,84 | 2,1±1,65  | 4,3±1,23 |
|                    | грязная | 7,3±1,13    | 8,2±0,57    | 4,2±1,84 | 7,9±1,65  | 5,7±1,23 |
| 3000 мг/кг         | чистая  | 3,1±1,42    | 0,9±0,63*   | 4,1±1,14 | 5,2±1,18  | 4,3±1,21 |
|                    | грязная | 6,9±1,42    | 9,1±0,63*   | 5,9±1,14 | 4,8±1,18  | 5,7±1,21 |
| 10000 мг/кг        | чистая  | 5,4±1,35    | 5,5±1,06    | 5,5±1,68 | 4,3±1,06  | 4,4±1,16 |
|                    | грязная | 4,6±1,35    | 4,5±1,06    | 4,5±1,68 | 5,7±1,06  | 5,6±1,16 |

Опытные инфузории в 1 сут. наблюдения проявляли положительный хемотаксис, за исключением содержания нефти в вытяжке 10000 мг/кг. На 4 сут. эксперимента лишь при содержании нефти 1000 и 3000 мг/кг интактные инфузории предпочитали токсическую среду. На 8 сут. положительный хемотаксис выявлен лишь у инфузорий при содержании нефти 3000 мг/кг, а на 12 сут. — 300, 1000 и 10000 мг/кг. К 16 сут. подопытные инфузории, находив-



шиеся в экстракте нефтезагрязненных почв, предпочитали загрязненную среду (1000, 3000 и 10000 мг/кг). Вероятно, это связано с отбором более резистентных особей к данному уровню нефтяного загрязнения. К данному сроку токсический фактор начинает играть ведущую роль.

#### Выводы:

1. Водные экстракты нефтезагрязненных почв, содержащие 300-10000 мг/кг нефтепродуктов, замедляют процессы размножения, а также вызывают гибель части наименее устойчивых особей популяции простейших.

2. Все исследуемые водные вытяжки из нефтезагрязненного торфа оказывают негативное воздействие на поведенческие реакции (хемотаксис и фагоцитарную активность) простейших.

3. Культура *P. caudatum* способна адаптироваться к действию водных вытяжек нефтезагрязненных почв.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабушкин А.Г., Московченко Д.В., Пикунов С.В. Гидрохимический мониторинг поверхностных вод Ханты-Мансийского автономного округа — Югры. Новосибирск: Наука, 2007. 152 с.

2. Московченко Д.В. Нефтегазодобыча и окружающая среда: эколого-геохимический анализ Тюменской области. Новосибирск: Наука. Сиб. Предприятие РАН, 1998. 112 с.

3. Солнцева Н.П. Добыча нефти и геохимия природных ландшафтов. М.: изд-во МГУ, 1998. 376 с.

4. Плотников В.В. Экология Ханты-Мансийского автономного округа. Тюмень: СофтДизайн, 1997. 288 с.

5. Толстограй В.И. К вопросу о рекультивации нефтезагрязненных поверхностей торфяных болот // Теоретические и практические вопросы мониторинга, предупреждения, ликвидации и рекультивации последствий нефтяного загрязнения. Тезисы докладов науч.-практич. конф. (Ханты-Мансийск, 25-27 ноября 2003 года). Тюмень, 2003. С. 75-77.

6. Кривоуцкий Д.А. Животный мир почвы. М.: Знание, 1969. 47 с.

7. Бурковский И.В. Экология свободноживущих инфузорий. М.: МГУ, 1984. 208 с.

8. Голубкова Э.Г. *Paramecium caudatum* Ehrenberg как токсикологический тест-объект // Гидробиологический журнал. 1978. Т. 14. № 2. С. 95-99.

9. Методические указания. Проведение токсикологических экспериментов с использованием парameций. Петрозаводск, 1994. С. 6-7.

10. Методика определения токсичности почвы и донных осадков по хемотаксической реакции инфузорий. М., 1998. 22 с.

11. Петухова Г.А. Адаптационные возможности животных при хроническом нефтяном загрязнении среды // Адаптация биологических систем к естественным и экстремальным факторам среды: Мат-лы Всерос. науч. конф. Челябинск: изд-во ЧГПУ, 2004. С. 60-63.

12. Михайлова Л.В., Рыбина Г.Е., Лихачева С.В., Копалиани Л.Г. Влияние буровых шламов разного срока хранения и возможность адаптации к ним *Paramecium caudatum* // Актуальные задачи защиты водных биологических ресурсов от негативного воздействия работ по освоению нефтегазовых месторождений. Москва-Владивосток, 2006. С. 187-198.

13. Жиркова А.Д., Никитина Л.И. Влияние различных концентраций нефти на популяции пресноводных инфузорий // Сборник научных трактатов. Хабар. гос. пед. ун-т. 2003. № 4. С. 5-11.

14. Жандарева М.В. Питание и размножение парameции-туфельки под воздействием поливинилбензилтриметиламмоний хлорида и диметилдиаллиламмоний хлорида // Физиология и токсикология гидробионтов. Ярославль, 1990. С. 48-50.

15. Серавин Л.Н. Влияние растворов химических веществ на фагоцитоз *Paramecium caudatum*. Вестник ЛГУ. Сер. Биол. 1957. № 3.