

На правах рукописи

Козлов Константин Сергеевич

ВЛИЯНИЕ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВЫ НЕФТЕПРОДУКТАМИ
НА ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ

03.00.16 - Экология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Томск – 2003

Работа выполнена на кафедре радиотехнологий и экологического мониторинга Томского государственного университета систем управления и радиоэлектроники

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор Карташев Александр Георгиевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Плеханов Геннадий Федорович

кандидат биологических наук, доцент Шинкин Николай Алексеевич

Ведущая организация:

Томский государственный педагогический университет

Защита состоится 24 декабря 2003 г. в 12 ч. на заседании диссертационного совета Д 212.267.10 по присуждению ученой степени кандидата биологических наук в Томском государственном университете по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36, НИИ ББ.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Томского государственного университета.

Автореферат разослан 24 ноября 2003 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

И.Ф. Головацкая

Актуальность проблемы. Загрязнение почвы нефтью и нефтепродуктами, являющееся одним из наиболее распространенных загрязнителей окружающей среды антропогенного происхождения, в настоящее время изучено недостаточно. В процессе нефтедобычи на месторождениях, а также при транспортировке нефти неизбежно происходят разливы нефти, ведущие к нарушению экологического равновесия, проявляющиеся в изменении структуры биоценозов, интенсивности и направленности почвообразующих процессов и приносящие несомненный урон природным экосистемам (Волостнов, 1998; Dorn et al, 1998). Проблемы экологии почвообитающих беспозвоночных в антропогенных экосистемах, исследование механизмов их функционирования является предметом обсуждения экологов и зоологов (Атлавините, 1975; Гиляров, 1975; Перель, 1979; Покаржевский, 1994; Кривоуццкий, 1994; Dominguez, Edwards, 1997; Davies et al, 2003). Вместе с тем, роль отдельных групп животных и структура их комплексов в условиях антропогенной нагрузки на экосистемы изучена недостаточно.

Биоиндикационные методы оценки состояния природной среды широко используются в современных экологических исследованиях (Holmstrup, 2000). Одной из многочисленных и представленных во всех биогеоценозах групп почвообитающих животных – биоиндикаторов являются дождевые черви (Langdon et al, 1999). По количеству дождевых червей и их состоянию можно судить о степени загрязнения почв. Актуальность изучения роли дождевых червей как биоиндикаторов территорий, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, определяется в первую очередь тем, что эти факторы вызывают ответную реакцию животных. Данные реакции зависят не только от длительности загрязнения, но и от дозы загрязнителя. Исследованию влияния загрязнения почв нефтью на дождевых червей посвящены работы И.М. Порядиной с соавторами (1981), И.В. Любвиной с соавторами (1982), Г.П. Романюк с соавторами (1982), Т. И. Артемьевой (1989), Saterbak et al (1999), Dorn, Salanitro (2000) и ряда других ученых. В тоже время в научных публикациях практически отсутствуют данные о влиянии нефтепродуктов (бензина и дизельного топлива) на дождевых червей. Актуальность и недостаточная изученность данных проблем послужила предпосылкой для настоящего исследования.

Цель работы: исследовать влияние загрязнения почвы нефтью, бензином и дизельным топливом на дождевых червей.

В соответствии с целью работы определены **задачи исследования:**

1. Исследовать поведенческие реакции дождевых червей под влиянием нефти, бензина и дизельного топлива (далее нефтепродукты).
2. Изучить выживаемость дождевых червей в зависимости от вида и дозы вносимых нефтепродуктов.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Комплекс поведенческих реакций дождевых червей при загрязнении почвы нефтепродуктами, зависит от вида и дозы загрязнителя, продолжительности загрязнения и вида дождевых червей. При равных дозах внесения бензин оказывает большее влияние на смертность дождевых червей, чем дизельное топливо и нефть.
2. Выживаемость и восстановление численности дождевых червей на почвах, загрязненных нефтепродуктами, зависит от вида и остаточной концентрации нефтепродуктов и вида дождевых червей.

Новизна работы.

1. Впервые проведены исследования по влиянию бензина и дизельного топлива на виды дождевых червей, широко распространенных в естественных условиях Западной Сибири.
2. Изучены поведенческие реакции дождевых червей при загрязнении почвы нефтью, бензином и дизельным топливом.
3. Установлены интервалы остаточной концентрации нефтепродуктов в почве, при которых начинается восстановление численности дождевых червей.
4. Выявлена зависимость между загрязнением почвы нефтепродуктами (бензином, дизельным топливом, нефтью) и изменением формы ядер амебоцитов в гемолимфе дождевых червей.
5. Определен дозо - зависимый и дозо - временной эффект влияния нефтепродуктов на смертность дождевых червей.

Практическая значимость.

1. Результаты исследований могут быть использованы при разработке региональных нормативов допустимого остаточного содержания нефти и нефтепродуктов в почве (ДОСНП) для оценки степени загрязнения и ремедиации (рекультивации) земель, подвергшихся углеводородному загрязнению.
2. Усовершенствованная методика почвенно-токсикологических исследований влияния углеводородов нефти и нефтепродуктов на дождевых червей применима в комплексных экотоксикологических исследованиях с использованием других групп макро - и мезопедобионтов.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на Межрегиональной научно-технической конференции «Научная сессия ТУСУР» (Томск, 2002), на Региональной конференции молодых ученых и специалистов «Современные подходы к управлению охраной окружающей среды» (Томск, 2003), на III-й международной научно-практической конференции «Состояние биосферы и здоровье людей» (Пенза, 2003), на Международной научно-практической конференции «Мониторинг и оценка состояния рас-

тительного покрова» (Минск, 2003), на 4-й международной конференции молодых ученых, преподавателей, аспирантов и докторантов «Актуальные проблемы современной науки» (Самара, 2003), на II-й международной научной конференции «Биоразнообразие и роль зооценоза в естественных и антропогенных экосистемах» (Днепропетровск, 2003), на 24-й ежегодной международной конференции Общества химии окружающей среды и экотоксикологии SETAC (Остин, США, 2003).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 работ.

Структура и объем работы. Диссертация общим объемом 150 страниц состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы. Работа содержит 22 рисунка, 60 таблиц и 3 приложения. Список литературы включает 221 источник, в том числе 47 иностранных.

Благодарности. Автор выражает искреннюю глубокую благодарность своему научному руководителю – профессору ТУСУРа доктору биологических наук, Александру Георгиевичу Карташеву за консультации по всем разделам работы, помощь в планировании работы и аналитическом осмыслении материала. Автор искренне признателен доктору биологических наук, зав. кафедрой биологии и генетики СГМУ Николаю Николаевичу Ильинских за высококвалифицированные консультации по вопросам цитологии, а также за предоставление лабораторий для проведения работ по гемолимфе дождевых червей. Автор выражает искреннюю благодарность кафедре почвоведения и экологии почв, а также кафедре ботаники ТГУ, в лице Андреевой Т.А и Конева В.В.

Объекты и методы исследований

Объектами исследования являлись дождевые черви семейства Lumbricidae.

Общий обзор семейства Lumbricidae. В работе приводится обзор семейства Lumbricidae. На территории России дождевые черви представлены главным образом видами семейства люмбрицид (*Lumbricidae Claus*). Однако выделяются еще четыре семейства, распространенные на территории России. К ним относятся: *Moniligastridae Claus*, *Criodrilidae Vejdovsky*, *Ocnodrilidae Beddard*, *Megescolicidae Michaelsen*. Данные семейства включают 6 видов (Перель, 1979). Это преимущественно крупные виды, входящие в состав группы «макрофауна» (Martin, 1992). Ранее эта группа почвенных беспозвоночных, учитываемых методом ручной разборки, была объединена термином «мезофауна» (Гиляров, 1965).

Обзор фауны дождевых червей boreальных лесов России. По имеющейся в настоящее время информации видовой состав дождевых червей Томской области может быть представлен 11 видами: *Dendrobaena octaedra S.*, *Dendrodrilus rubidus f. tenuis E.*, *Lumbricus rubellus H.*, *Octolasion lacteum O.*, *Nicodrilus roseus S.*, *Nicodrilus caliginosus S.*, *Eisenia nordenskioldi E.*, *Eisenia fetida S.*, *Eiseniella tetraedra S.*, *Allobophora (S.) diplo-tetralheca P.*, *Allobophora (S.) tuberosa S* (Перель, 1979; Всеволодова - Перель, 1997).

Схема проведения исследований. Материалы, представленные в диссертации, являются результатом почвенно-экологических исследований в период с 2000 по 2003 гг. Для определения остаточной концентрации нефти и нефтепродуктов в почве было отобрано 49 проб почвы.

Методика лабораторных исследований. В лабораторных условиях изучались закономерности поведенческих реакций и изменения численности дождевых червей *Lumbricus rubellus H.* под влиянием различных доз нефтепродуктов (бензина А-80, дизельного топлива (летнего типа), товарной нефти). Исследования были проведены по методике, разработанной на основе стандартной методики (OECD 207, 1984; ISO 11268-1, 1995; ISO 11268-2, 1998; ISO 11268-3, 1999), с учетом рекомендаций 2-го международного симпозиума по экотоксикологии дождевых червей (Advances in Earthworm Ecotoxicology, 1998).

Для оценки влияния нефти, бензина, дизельного топлива на поведенческие реакции и выживаемость дождевых червей применялись специально изготовленные лабораторные кюветы из оргстекла, размерами: длина – 0,4 м; высота – 0,15 м; ширина – 0,02 м. В каждом опыте использовалось по 5 лабораторных кювет. Опыты проводились при комнатной температуре +20°C.

Известно, что основное количество животных сосредоточено в поверхностном 10–20-ти сантиметровом слое почвы (Криволуцкий, 1994). В лабораторные кюветы помещалась усредненная проба верхнего гумусового горизонта серой лесной почвы, зернисто-комковатой структуры, влажностью 30%, по одному килограмму (в среднем 14-ти сантиметровый слой) почвы в каждой кювете. Данный тип почв широко распространен в Западной Сибири (Хмелев и др., 1988). В каждую кювету было помещено по 10 дождевых червей (*Lumbricus rubellus H.*). Данный вид был выбран исходя из того, что в лесах подтаежной зоны, господствуют поверхностно - обитающие формы, среди которых *L. rubellus*. В экспериментах использовалось 850 половозрелых особей дождевых червей. Эксперименты состояли из двух частей: опыты со сплошным и частичным загрязнением почвы нефтепродуктами.

Эксперименты со сплошным загрязнением почвы товарной нефтью состояли из восьми опытов с дозами загрязнителя 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100 г/кг почвы, при параллельном контроле (незагрязненные варианты). Эксперименты на сплошное загрязнение бензином А-80 и дизельным топливом (летнего типа) включали по

шесть опытов с дозами 2,5, 5, 7,5, 10, 20 г/кг почвы, при параллельном контроле. Нефтепродукты вносили в кюветы через сутки после инокуляции червей.

Опыты с частичным загрязнением почвы нефтепродуктами проводились по следующей схеме: в лабораторные кюветы с почвой и червями вносились нефтепродукты равномерно на всю глубину слоя почвы. В целом, эксперимент состоял из восьми вариантов на каждый вид нефтепродукта, с сегментами загрязнения шириной: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 40 см при параллельном контроле.

Методика полевых исследований. В полевых исследованиях изучались закономерности изменения численности дождевых червей, а также изменения форм ядер амебоцитов в гемолимфе дождевых червей под влиянием различных доз нефтепродуктов. Исследования проводились в Томском районе Томской области (подтайга Западной Сибири) на аллювиальной дерновой среднесуглинистой среднегумусной почве. Было проведено рекогносцировочное обследование участка проведения полевых исследований. На месте закладки площадок было установлено наличие двух видов дождевых червей *Lumbricus rubellus* Н. и *Octolasion lacteum* О.

Для оценки влияния токсичности различных доз нефтепродуктов на поведение и выживаемость дождевых червей в естественном биоценозе были заложены по единой методике модельные площадки по 1 м² с дозированным внесением товарной нефти (2,5, 5, 10, 15 кг/м²), бензина А-80 (0,5, 1, 2, 4 кг/м²), дизельного топлива (летнего типа) (0,5, 1, 2, 4 кг/м²). Каждый вариант опыта был представлен в 3-х кратной повторности. Всего было заложено 39 модельных площадок, в том числе 36 с внесением загрязнителей и 3 – контрольные. В качестве фоновых взяты близко расположенные участки изучаемого района вне явно выраженного загрязнения. Наблюдения и учеты на площадках проводились через 3, 10, 30, 90 дней после закладки опыта. Сезонная динамика распределения дождевых червей изучалась в течение 2003 г. Количественный учет дождевых червей производился методом раскопок с применением ручной разборки почвы (Гиляров, 1965) (размер проб – 0,05 м², глубиной – 0,3 м, повторность 6-ти кратная). Отбор проб производился на загрязненном участке, на границе загрязнения, на удалении 1-го метра от загрязнения и контрольном участке. Параллельно проводился количественный учет коконов. Для изучения деградации нефти и нефтепродуктов в почве было отобрано 49 проб почвы для определения содержания остаточной концентрации нефтепродуктов. Образцы обрабатывались в аккредитованной лаборатории ОГУ «Облкомприрода» (Аттестат аккредитации № РОСС RU 0001.510342) с использованием метода ИК-спектрофотометрии (ПНДФ 16.1:2.2-22-98), при котором определяется концентрация неполярных и малополярных углеводородов (далее нефтепродуктов).

Дальнейшие исследования влияния загрязнения почвы нефтепродуктами заключались в выяснении воздействия этих загрязнителей на изменение форм ядер амебоцитов в гемолимфе дождевых червей. В данной работе анализировались незернистые базофильные амебоциты, потому что в них четко видно ядро. Мазки изготавливались из гемолимфы дождевых червей, отобранных на загрязненных площадках, на границе загрязнения и контрольных участках. На каждой площадке отбиралось по 5 особей каждого вида, из каждого червя изготавливали 1 мазок. Обследовано 639 мазков, на каждом из которых просмотрено по 200 клеток. Всего проанализировано 127800 клеток. Обработка материалов проводилась на кафедре биологии и генетики СГМУ, согласно стандартным методикам (Заварзин, 1985) а также руководству по цитологии (Вахин и др., 1966), общей цитологии (Ченцов, 1995).

Анализ и обработка данных проводились с использованием пакета программ STATISTICA® for Windows (Боровиков и др., 1998), предварительная обработка данных и описательная статистика – в табличном процессоре Microsoft® EXCEL 97.

Результаты исследований и обсуждение

Результаты лабораторных исследований и обсуждение. При сплошном загрязнении почв нефтью (100, 50, 40, 30 г/кг субстрата) дождевые черви начинали реагировать в первые 10 – 15 минут. Все животные по характеру поведенческих реакций были условно разделены на три группы. 1) Поведенческие реакции остались без изменения. Количество червей отнесенных к данной реакции составило в среднем 15%. В основном это черви, которые находились на дне экспериментальных садков или в придонной части. 2) Дождевые черви поднимаются до границы просачивания нефти, начинают двигаться вдоль нее, проявляя ответную реакцию на загрязнение, очевидно в поисках незагрязненной почвы. К данной реакции отнесено 60% червей. 3) Дождевые черви проходят слой почвы, загрязненный сырой нефтью, перпендикулярно границе просачивания и выходят на поверхность. К данной реакции отнесено 25% червей.

Стабилизация численности дождевых червей достигалась на 4-е сутки опытов. Кинетика выживаемости дождевых червей в зависимости от вида и дозы нефтепродуктов может быть описана классическим уравнением неконкурентного ингибирования и его модификацией (Евдокимов, 2001):

$$V(D) = \frac{V \times K_i^\alpha}{K_i^\alpha + D^\alpha} \quad \text{где:}$$

V – выживаемость дождевых червей;
D – доза внесения нефтепродуктов;
K_i – константа ингибирования;
α - коэффициент нелинейности.

На рисунке 1 представлен типичный вид зависимости выживаемости дождевых червей (*Lumbricus rubellus* Н.) от дозы внесения нефти через 1 сутки. Кинетика, соответствующая модифицированному уравнению неконкурентного ингибирования, часто встречается при выживаемости дождевых червей в условиях загрязнения различными дозами и видами нефтепродуктов в лабораторных экспериментах.

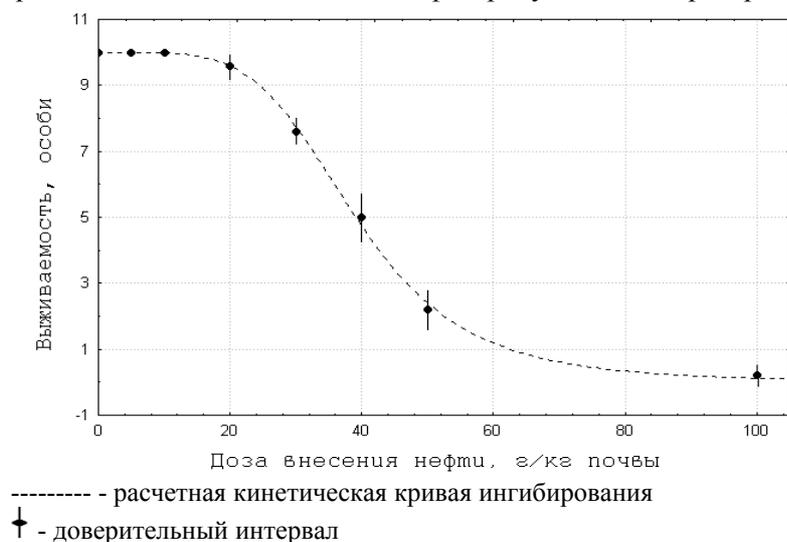


Рис. 1. Выживаемость дождевых червей (*Lumbricus rubellus* Н.) в зависимости от дозы внесения товарной нефти (через 1 сутки)

Данный вид кинетической кривой характерен и для остальных сроков наблюдения, видов нефтепродуктов и вносимых доз в лабораторных экспериментах. Изменяются лишь основные параметры кривой (таблица 1).

Таблица 1

Основные параметры кинетических кривых ингибирования при внесении нефтепродуктов (через 1, 2 и 7 дней)

Загрязнители	Дни	Коэффициент корреляции кинетической кривой с исходными данными (R)	Константа ингибирования (K _i)	Коэффициент нелинейности ингибирования (α)
Нефть	1	0.999	39.12 ± 0.8	4.7 ± 0.5
	2	0.999	36.9 ± 0.6	5.5 ± 0.5
	7	0.997	29.8 ± 1.4	4.6 ± 0.9
Бензин	1	0.989	6.2 ± 0.7	3.6 ± 1.7
	2	0.987	4.9 ± 0.9	2.6 ± 1.2
	7	0.999	4.0 ± 0.7	2.2 ± 0.75
Дизельное топливо	1	0.999	7.0 ± 0.2	3.3 ± 0.4
	2	0.995	5.8 ± 0.5	2.96 ± 0.9
	7	0.98	4.9 ± 1.1	2.64 ± 1.5

При внесении бензина и дизельного топлива различной дозы (2.5, 5, 7.5, 10, 20 г/кг почвы) в случае сплошного загрязнения дождевые черви (*Lumbricus rubellus* Н.) начинали реагировать в течение первых 15 минут. Все животные по характеру поведенческих реакций были условно разделены на три группы. 1) Пове-

денческие реакции остались без изменения. Количество червей, отнесенных к данной реакции, составило в среднем 89%. 2) Дождевые черви начинают двигаться в горизонтальном направлении, проявляя ответную реакцию на загрязнение, в поисках незагрязненной почвы. Количество червей, отнесенных к данной реакции, составило в среднем 10%. 3) Дождевые черви проходят слой почвы, загрязненный бензином и дизельным топливом, перпендикулярно границе просачивания и выходят на поверхность. Количество червей, отнесенных к данной реакции, составило в среднем 1%.

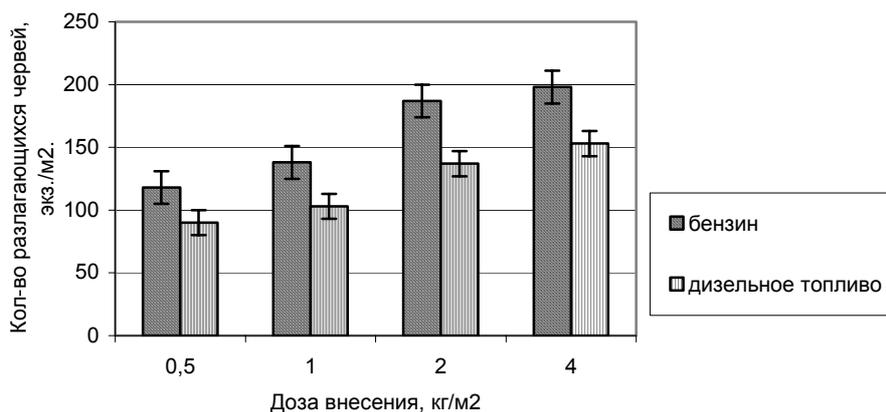
Сравнительный анализ данных, полученных в лабораторных опытах с искусственным загрязнением почвы нефтью (50, 100 г/кг почвы), дизельным топливом и бензином с дозой внесения 10, 20 г/кг почвы, выявил, что основная масса дождевых червей погибает в первые дни после загрязнения. Анализируя данные смертности червей в зависимости от дозы внесения бензина А-80 и дизельного топлива (летнего типа) при сплошном загрязнении почвы на 1-й день после внесения загрязнителей, можно утверждать, что бензин оказывает большее влияние на смертность, чем дизельное топливо.

Высокая смертность дождевых червей в первые дни лабораторных опытов обусловлена попаданием ароматических углеводородов с почвенным воздухом через кожные покровы в организм червей, вызывая отравление (Бызова, 1973; Артемьева, 1989). Проявляется это в том, что находясь в обездвиженном состоянии, большинство червей не способны уходить от загрязненного места в незагрязненную почву. LD₅₀ в условиях сплошного загрязнения почвы достигается для бензина при дозе 4.0 г/кг почвы, дизельного топлива - 4.9 г/кг. Учитывая чувствительность дождевых червей к снижению содержания кислорода в воздухе, можно считать, что смертность дождевых червей вызвана снижением концентрации кислорода в почвенном профиле. Для нефти LD₅₀ в условиях сплошного загрязнения почвы достигается при 29,8 г/кг.

Результаты лабораторных опытов на частичное загрязнение почвы показали, что увеличение степени загрязнения почвы нефтепродуктами и, соответственно, повышение концентрации в почве легких фракций углеводородов приводят к тому, что дождевые черви уходят от загрязнения на то минимальное расстояние, при котором токсичное действие легкой фракции для них менее выражено.

Результаты полевых исследований и обсуждение. Влияние нефтепродуктов на дождевых червей определяется, прежде всего, интенсивностью загрязнения. При проведении полевых исследований в зоне загрязнения дождевые черви исчезают полностью. Оценить влияние нефтепродуктов на смертность дождевых червей в первые 3 дня можно по разлагающимся червям на площадках с внесением загрязнителей (рис. 2).

Следовательно, существует прямая зависимость между концентрацией вносимых нефтепродуктов и смертностью дождевых червей на загрязненных площадках в первые дни после внесения в почву нефтепродуктов.



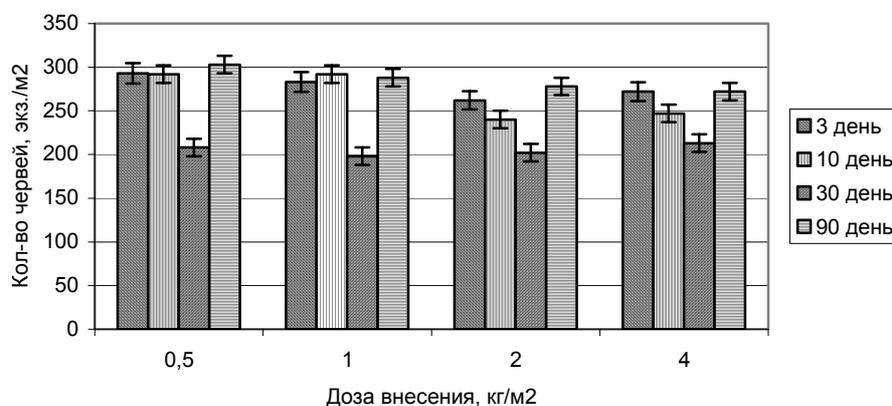
I - доверительный интервал

Рис. 2. Количество разлагающихся червей на площадках с внесением бензина и дизельного топлива (3-й день после загрязнения)

Проводя сравнительный анализ результатов исследования, представленных на рисунках 3, 4 и 5, на 3-й день после внесения бензина и дизельного топлива различной дозы, можно утверждать, что загрязнение почвы бензином вызывает большую смертность дождевых червей по сравнению с загрязнением дизельным топ-

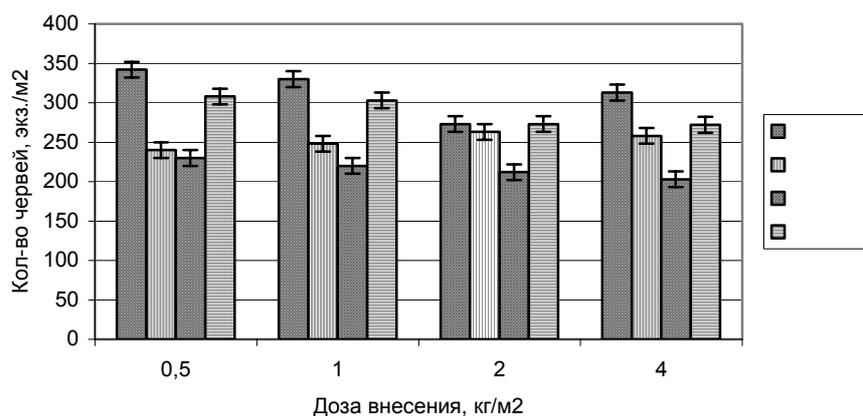
ливом. Данный вывод подтверждается не только процентом погибших червей на самих загрязненных площадках, но и процентом живых червей на границе с этими площадками.

На 3-й день после загрязнения количество червей на границе с загрязненными участками было максимальным при внесении бензина 0.5 кг/м^2 и составило 293 экземпляра (144.3 % от количества дождевых червей на контрольном участке) (рис. 3) и 342 экземпляра при внесении дизельного топлива (144.3 % от количества дождевых червей на контрольном участке) (рис. 4).



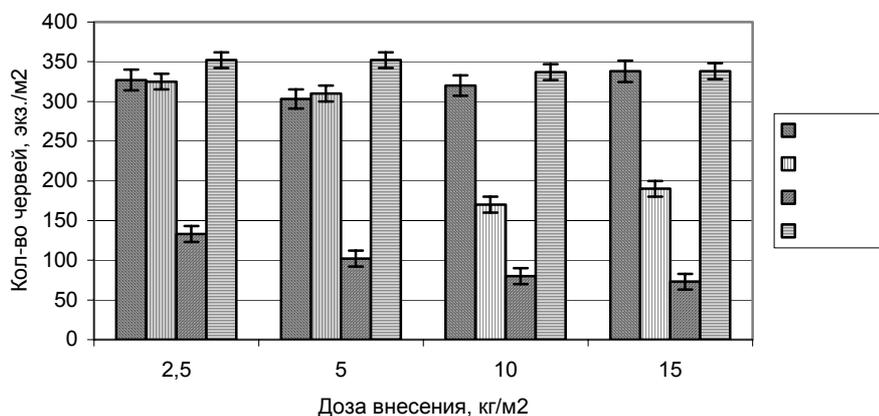
I - доверительный интервал

Рис. 3. Количество червей на границе с площадками загрязненными бензином (3, 10, 30, 90-й день после загрязнения)



I - доверительный интервал

Рис. 4. Количество червей на границе с площадками загрязненными дизельным топливом (3, 10, 30, 90-й день после загрязнения)



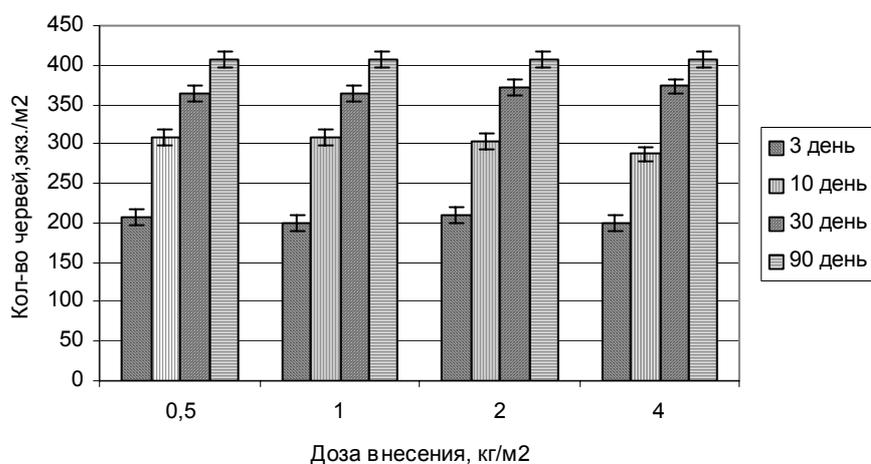
I - доверительный интервал

Рис. 5. Количество червей на границе с площадками загрязненными нефтью (3, 10, 30, 90-й день после загрязнения)

Проводя анализ горизонтальной миграции дождевых червей, можно заключить, что часть дождевых червей в первые дни после внесения загрязнения уходит за пределы загрязнения. На 3-й день после загрязнения нефтью количество червей на границе с загрязненными площадками было максимальным при дозе внесения 15.0 кг/м² и составило 338 экземпляров (166.5 % от количества дождевых червей на контрольной площадке), минимальным при внесении 5.0 кг/м² и составило 303 экземпляров (149.3 % от количества дождевых червей на контрольной площадке) (рис. 5).

Анализируя данные, полученные в полевых исследованиях на площадках, находящихся на удалении 1 метра от различных загрязнителей, существенных различий в общем количестве дождевых червей и в видовом соотношении не обнаружено (рис. 6).

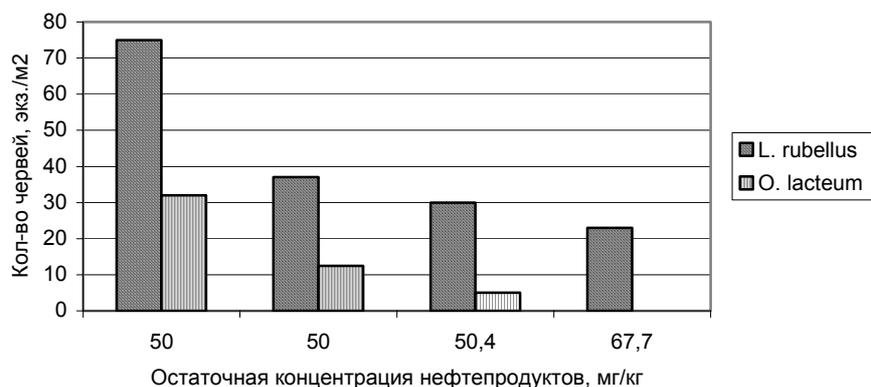
При сравнении численности и видового соотношения дождевых червей на контрольной площадке с участками, находящимися на расстоянии 1 метра от различных загрязнителей, существенных различий не обнаружено. Данный факт свидетельствует о том, что на участках, находящихся на 1 м от загрязненных площадок, сезонная динамика плотности популяций дождевых червей соответствует контролю и не зависит от вида и дозы загрязнителя.



I - доверительный интервал

Рис. 6. Количество червей, находящихся на 1 м от площадок с внесением бензина (3, 10, 30, 90-й день после загрязнения)

На 90-й день после внесения нефтепродуктов на всех загрязненных площадках наблюдалось наличие дождевых червей (рис. 7, 8, 9). Восстановление численности дождевых червей на площадках, загрязненных бензином, начинается после того, как остаточная концентрация нефтепродуктов находится в интервале от 67.7 до 71.7 мг/кг. Данный интервал в нормативной документации классифицируется как допустимый уровень загрязнения почвы. Однако, этот диапазон величин неодинаков для разных видов червей. Интервал остаточной концентрации нефтепродуктов бензина от 67.7 до 71.7 мг/кг является началом восстановления численности *Lumbricus rubellus* Н. Данный интервал был определен исходя из того, что на 30-й день после внесения загрязнителя, на площадках с остаточной концентрацией нефтепродуктов бензина равной 71.7 мг/кг дождевых червей *Lumbricus rubellus* Н. не обнаружено. На 90-й день после внесения загрязнителя, на площадках с остаточной концентрацией нефтепродуктов бензина равной 67.7 мг/кг количество дождевых червей *Lumbricus rubellus* Н. составляло $23 \pm 4,1$ особи/м² (рис.7).



I - доверительный интервал

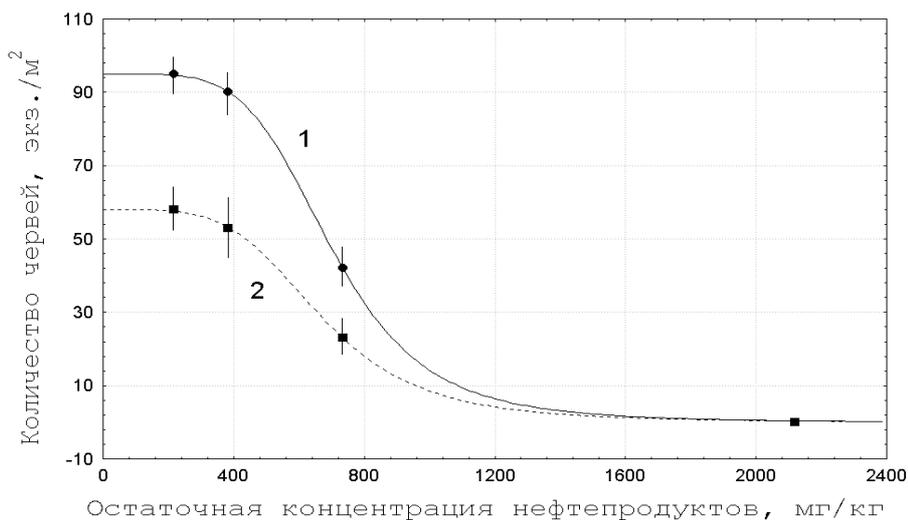
Рис. 7. Количество червей на площадках на 90 день после загрязнения бензином

Для *Octolasion lacteum* O. соответствующий интервал колеблется от 62.7 до 67.7 мг/кг. Данный интервал был определен исходя из того, что на 30-й день после внесения загрязнителя, на площадках с остаточной концентрацией нефтепродуктов бензина равной 62.7 мг/кг количество дождевых червей *Octolasion lacteum* O. составляло $48 \pm 9,4$ особей/м². На 90-й день после внесения загрязнителя, на площадках с остаточной концентрацией нефтепродуктов бензина равной 67.7 мг/кг дождевых червей *Octolasion lacteum* O. не обнаружено (рис. 7).

Аналогичная кинетическая кривая ингибирования, соответствующая модифицированному уравнению неконкурентного ингибирования, полученная в лабораторных экспериментах, наблюдается и при восстановлении численности дождевых червей на площадках, загрязненных различными дозами и видами нефтепродуктов в полевых экспериментах. На рисунке 8 представлен типичный вид зависимости восстановления дождевых червей *Lumbricus rubellus* H. и *Octolasion lacteum* O. от остаточной концентрации нефтепродуктов.

Восстановление численности дождевых червей на площадках, загрязненных дизельным топливом, начинается после того, как остаточная концентрация нефтепродуктов находится в интервале от 1725 до 2120.3 мг/кг. Аналогичный интервал в нормативном документе «Порядок определения размеров ущерба...» (1993) классифицируется как низкий и средний уровень загрязнения почвы.

Вид графика, представленный на рисунке 8 характерен не только для вариантов с дизельным топливом, но и для остальных видов нефтепродуктов. Изменяются лишь основные параметры: коэффициент корреляции кинетической кривой с исходными данными (R), константа ингибирования (K_i), коэффициент нелинейности ингибирования (α). Основные параметры кинетических кривых ингибирования, изображенных на рисунке 8 составляют: для *Lumbricus rubellus* H. ($R=0.999$, $K_i = 699.528 \pm 69.9$, $\alpha = 4.86$), для *Octolasion lacteum* O. ($R = 0.999$, $K_i = 665.93 \pm 66.5$, $\alpha = 4.34$)



----- - расчетная кинетическая кривая ингибирования

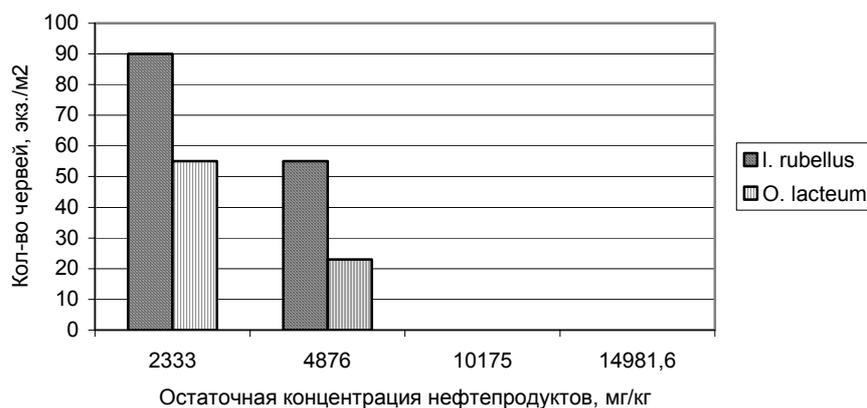
1 – для *Lumbricus rubellus* Н.

2 – для *Octolasion lacteum* О.

† - доверительный интервал

Рис. 8. Восстановление численности дождевых червей на площадках на 90 - й день после загрязнения дизельного топлива

Восстановление численности дождевых червей на площадках, загрязненных нефтью начинается после того, как остаточная концентрация углеводородов нефти находится в интервале от 4876 до 5107 мг/кг. Соответствующий интервал в нормативном документе «Порядок определения размеров ущерба...» (1993) классифицируется как высокий и очень высокий уровень загрязнения почвы.



I - доверительный интервал

Рис. 9. Количество червей на площадках на 90-й день после загрязнения нефтью

В гемолимфе дождевых червей при загрязнении почвы нефтепродуктами в различных дозах встречаются двуядерные амебоциты. Вследствие того, что двуядерные амебоциты представлены двумя типами: 1) оба ядра в клетке с нормальными формами; 2) одно ядро - нормальной формы, другое измененное, можно предположить, что это результат двух процессов. Один процесс - незавершенный цикл митотического деления. Известно, что митоз, сочетающийся с задержкой цитокинеза, приводит к образованию многоядерных клеток (Слюсарев, Жукова, 1987). Второй - образование двуядерных клеток при слиянии двух клеток. В гемолимфе

дождевых червей контрольной группы 2-х и более ядерных клеток не обнаружено. В гемолимфе червей, находящихся на границе загрязнения и на самих площадках загрязнения, число двуядерных клеток изменялось от 1.4 ± 0.6 до 2.8 ± 0.8 на 100 клеток.

Проводя анализ полученных данных по амебоцитам в первые дни после внесения загрязнителей, можно заметить снижение делящихся клеток, а на 10 день - их отсутствие. На границе с площадками, загрязненными бензином (при дозе внесения 4.0 кг/м^2) на 3-й день число делящихся клеток в гемолимфе у *Lumbricus rubellus* Н. составило 0.3 ± 0.2 клетки на 100 клеток (12.5% от числа этих же клеток в контроле).

При сравнении амебоцит с ядрами нормальной формы и измененными в гемолимфе дождевых червей, находящихся на границе загрязнения и на загрязненных площадках, прослеживается тенденция снижения числа клеток с измененными формами ядра и увеличение числа клеток с нормальной формой ядра через 90 дней после загрязнения. Сравнивая гемолимфу червей, находящихся на границе участка, загрязненного бензином, с контролем, наблюдаем достоверную зависимость увеличения нормальных форм клеток амебоцитов через определенный период времени. На 3 день после внесения загрязнителя число одноядерных амебоцитов с нормальной формой ядра у *Lumbricus rubellus* Н. было максимально при внесении бензина 0.5 кг/м^2 и составило 31.4 ± 2.6 клетки на 100 клеток гемолимфы (36.9 % от числа этих же клеток в контроле), минимально при внесении бензина 4.0 кг/м^2 и составило 14.3 ± 1.5 клетки на 100 клеток (16.6 % от числа этих же клеток в контроле). На 90 день после внесения загрязнителя число одноядерных амебоцитов с нормальной формой ядра у *Lumbricus rubellus* Н. при внесении бензина 0.5 кг/м^2 составило 45.2 ± 2.7 клетки на 100 клеток (51.7 % от числа этих же клеток в контроле), при дозе 4.0 кг/м^2 – 44.5 ± 1.6 клетки на 100 клеток (50.6 % от числа этих же клеток в контроле). Это объясняется тем, что в первые дни после загрязнения нефтепродукты оказывают наибольшее влияние на организм дождевых червей. Вследствие этого значительно увеличивается число амебоцитов с измененными формами ядер. Через определенный период времени концентрация нефтепродуктов снижается, уменьшается степень их воздействия на организм, и происходит увеличение числа амебоцитов с нормальной формой ядра.

Противоположный эффект наблюдался с одноядерными амебоцитами с измененной формой ядра. На 3-й день после внесения загрязнителя число одноядерных амебоцитов с измененной формой ядра у *Lumbricus rubellus* Н. максимально при внесении бензина 4.0 кг/м^2 и составило 81 ± 2.5 клетку на 100 клеток гемолимфы (что в 6 раз больше числа этих же клеток в контроле), минимально - при 0.5 кг/м^2 и составило 65.1 ± 1.7 клетку на 100 клеток (что в 5 раз больше числа этих же клеток в контроле). На 90-й день после внесения бензина в дозе 0.5 кг/м^2 обнаружено 50.9 ± 1.0 одноядерных амебоцитов с измененной формой ядра у *Lumbricus rubellus* Н. на 100 клеток, при внесении бензина в дозе 4.0 кг/м^2 выявлено 52.1 ± 1.0 клетки этого же типа амебоцитов на 100 клеток гемолимфы.

Параллельно с процессами, приводящими к патологиям клеток, развиваются и механизмы, устраняющие эти нарушения. Наиболее хорошо изучена система репарации нарушений в молекулах ДНК, одновременно с ней функционирует и система активного выявления и элиминации генетически поврежденных клеток. Снижение через определенный период времени числа амебоцитов с измененной формой ядра в гемолимфе дождевых червей, подвергшихся влиянию нефтепродуктов, подтверждает это положение.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что зависимость выживаемости дождевых червей в почве, загрязненной нефтепродуктами различной дозы внесения, подчиняется кинетике неконкурентного ингибирования. Константа ингибирования (K_i) в лабораторных экспериментах на день стабилизации численности дождевых червей составила: для нефти - 29.8 ± 1.4 ; бензина А-80 - 4.0 ± 0.7 ; дизельного топлива (летнего типа) - 4.9 ± 1.1 .
2. При равных дозах внесения, бензин приводит к наибольшей смертности дождевых червей, чем дизельное топливо и нефть.
3. Выявлен комплекс поведенческих реакций, характерный при загрязнении почвы нефтепродуктами. Все животные по характеру поведенческих реакций были условно разделены на три группы. А. Поведенческие реакции остались без изменения. Количество червей, отнесенных к данной реакции, составило в среднем для нефти - 15%; бензина и дизельного топлива - 89%. Б. Дождевые черви поднимаются до границы просачивания нефтепродуктов, начинают двигаться вдоль нее, проявляя ответную реакцию на загрязнение в поисках чистой почвы. Количество червей, отнесенных к данной реакции, составило в среднем 60% - для нефти, 10% - для бензина и дизельного топлива. В. Дождевые черви проходят слой почвы, загрязненный сырой нефтью, перпендикулярно границе просачивания и выходят на поверхность. Количество червей, отнесенных к данной реакции, составило в среднем 25% - для нефти, 1%- для бензина и дизельного топлива.
4. Выявлены остаточные концентрации нефти и нефтепродуктов в почве, при которых начинается восстановление плотности популяции дождевых червей для бензина – 70 мг/кг , дизельного топлива – 2000 мг/кг , нефти – 5000 мг/кг .

6. Показано, что приграничная зона миграции дождевых червей в условиях загрязнения почвы нефтепродуктами не превышает 1-го метра.
7. Дождевые черви *Lumbricus rubellus* Н. более устойчивы к загрязнению почвы нефтепродуктами чем *Octolasion lacteum* О.
8. Установлено, что у дождевых червей, подвергшихся влиянию нефти и нефтепродуктов независимо от дозы загрязнителя, в гемолимфе происходит снижение числа амебоцитов с нормальной формой ядер и увеличение числа амебоцитов с измененной формой ядер.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Козлов К.С. Дождевые черви – биоиндикационный тест почв загрязненных нефтью // Материалы докладов межрегиональной научно-технической конф. «Научная сессия ТУСУР». Томск, 2002. Ч.3. С. 136-138.
2. Козлов К.С. *Lumbricus rubellus* – «модельный вид» биоиндикации почв загрязненных бензином // Материалы региональной научно-технической конф. «Научная сессия ТУСУР - 2003». Томск, 2003. Ч.3. С. 203-205.
3. Козлов К.С. Мониторинг загрязнения почв на основе биоиндикационных методов // Материалы региональной конф. молодых ученых и специалистов «Современные подходы к управлению охраной окружающей среды». Томск, 2003. – с. 47-53.
4. Карташев А.Г., Козлов К.С. Дождевые черви (*Lumbricus rubellus*) – биоиндикаторы почв загрязненных нефтью // Сборник научных работ «Актуальные проблемы медицины и биологии». Томск, 2003. – С. 165-167.
5. Козлов К.С. Зоологические методы оценки влияния нефти и нефтепродуктов в полевых условиях // Сборник материалов III международной научно-практической конф. «Состояние биосферы и здоровье людей». Пенза, 2003. – С. 58-60.
6. Козлов К.С., Конева В.В. Оценка состояния растительного покрова в условиях загрязнения почв нефтью // Сборник материалов международной научно-практической конф. «Мониторинг и оценка состояния растительного покрова». Минск, 2003. – С. 72-75.
7. Козлов К.С., Карташев А.Г. Изменение численности дождевых червей под влиянием острой токсичности нефти и нефтепродуктов // Сборник материалов 4-й международной конф. молодых ученых, преподавателей, аспирантов и докторантов «Актуальные проблемы современной науки». Самара, 2003. – С. 63-66.
8. Козлов К.С. Оценка влияния нефти и нефтепродуктов на дождевых червей в условиях искусственного загрязнения // Сборник материалов II международной науч. конф. «Биоразнообразие и роль зооценоза в естественных и антропогенных экосистемах». Днепропетровск, 2003. – С. 55-57.
9. Козлов К.С. Разнообразие дождевых червей Томской области // Сборник материалов II международной науч. конф. «Биоразнообразие и роль зооценоза в естественных и антропогенных экосистемах». Днепропетровск, 2003. – С. 76-78.
10. Козлов К.С., Антонова Е.В. Кариопатологические изменения амебоцитов дождевых червей *Lumbricus rubellus* Н. Под влиянием дизельного топлива (летнего типа) // Сборник материалов II международной науч. конф. «Биоразнообразие и роль зооценоза в естественных и антропогенных экосистемах». Днепропетровск, 2003. – С. 37-40.
11. Kozlov K.S. (2003) Earthworm Testing (*Lumbricus rubellus* H.) Grey Forest Soil Contaminated by Oil Hydrocarbons. In: SETAC-NA 24th Annual Meeting «Science without Borders: Developing Solutions for Global Environmental Challenges», 9-13 November 2003, Austin, Texas, USA. Pensacola, FL, SETAC Press. P. 214.