

**Влияние загрязнения воды нефтью  
на замедленную флуоресценцию водоросли  
*Chlorella vulgaris* Beijer  
и выживаемость рачков *Daphnia magna* Str.**

Т. С. БОРОДУЛИНА, В. И. ПОЛОНСКИЙ, Е. С. ВЛАСОВА\*, Т. Л. ШАШКОВА, Ю. С. ГРИГОРЬЕВ\*

Красноярский государственный аграрный университет  
660049, Красноярск, просп. Мира, 90  
E-mail: media3000@rambler.ru

\*Сибирский федеральный университет  
660041, Красноярск, просп. Свободный, 79  
E-mail: tatyana\_eco@inbox.ru

**АННОТАЦИЯ**

В лабораторных опытах изучали влияние различных концентраций нефти в водной среде на водоросль хлорелла и рачков дафнии. Показано, что при увеличении содержания нефти в воде интенсивность замедленной флуоресценции тест-культуры хлореллы и выживаемость дафний снижаются. Однако для хлореллы снижение свечения как показателя ее фотосинтетической активности наблюдается только при очень высоких концентрациях нефти (1000–2000 ПДК), тогда как для рачков выживаемость уменьшается с 4 ПДК. Аналогичная зависимость имеет место при внесении в среду подсолнечного масла, использованного в качестве имитатора нефтяного загрязнения. Высказано предположение, что негативное влияние нефти на микроводоросль и рачков обусловлено скорее физическими, чем химическими факторами.

**Ключевые слова:** токсичность нефти, рост *Chlorella vulgaris*, выживаемость *Daphnia magna*, замедленная флуоресценция хлорофилла.

Нефтяные углеводороды (НУ) – одни из наиболее опасных и широко распространенных поллютантов [1–5]. Нефть и нефтепродукты относятся к самым распространенным загрязняющим веществам в Мировом океане. Наибольшие потери нефти связаны с процессом ее транспортировки из районов добычи. Поступившая в поверхностные воды нефть вступает в общую цепь сложных и мало исследованных по длительности физических и хи-

мических процессов (испарение, растворение, эмульгирование, образование агрегатов, седиментация, окисление, биодegradация) [6].

Нефть отрицательно воздействует на все группы живых организмов, обитающих как в поверхностном слое, так и в толще воды, а также в грунте (ПДК нефти для воды рыбохозяйственных водоемов соответствует 0,05 мг/л) [4, 7]. В первую очередь от повышенных концентраций НУ страдают планктонные ракообразные и личиночные формы многих беспозвоночных и рыб [3, 5, 8–10]. Показано, что при уровне нефтяного загрязнения до 0,84 мг/л у предличинок севрюги обнаружены опухолеподобные образования на

Бородулина Татьяна Сергеевна  
Полонский Вадим Игоревич  
Власова Екатерина Сергеевна  
Шашкова Татьяна Леонидовна  
Григорьев Юрий Сергеевич

кожных покровах (до 5 % от общего количества аномалий), значительное снижение объема желточной массы, слабость тургора желточного мешка [11]. Планктонные организмы быстро гибнут при концентрациях нефти в водной среде порядка 0,01–0,001 мг/л; бентосные организмы оказываются значительно более выносливыми к нефтяному загрязнению [12, 13]. При этом молодь гораздо чувствительнее к воздействию НУ, чем взрослые особи, что, например, продемонстрировано на гаммаридах [14].

В серии работ по изучению влияния НУ на поведение морских ракообразных [15–17] экспериментально показано, что двигательная активность амфиподы *Onisimus affinis* угнетается при сублетальных концентрациях сырой нефти 15–20 мг/л.

Несмотря на проведенные исследования, проблема влияния нефтезагрязнения водной среды на ее обитателей по-прежнему остается весьма актуальной. Она обусловлена необходимостью выяснения воздействия этого поллютанта на водную экосистему на всех ее уровнях. К сожалению, в литературе недостаточно данных о влиянии нефти на водоросли и низших ракообразных, являющихся классическими тест-объектами при биотестировании уровня токсичности вод. Цель настоящей работы – изучение действия различных концентраций нефти в воде на ростовую и фотосинтетическую активность микроводоросли хлорелла, а также выживаемость рачков дафний.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили одноклеточная зеленая водоросль *Chlorella vulgaris* Beijer и рачки *Daphnia magna* Str.

В экспериментах использовали альгологически чистую культуру микроводоросли, находящуюся в экспоненциальной стадии роста. Для поддержания этой стадии роста хлореллы пересев культуры осуществляли ежедневно.

Токсическое действие нефти на клетки водоросли оценивали по снижению прироста культуры по сравнению с контрольной водой после 22 ч культивирования в многокуветном культиваторе водорослей КВМ-05 [18]. В 24 флакона-реактора объемом 10 см<sup>3</sup> вно-

сили по 6 см<sup>3</sup> тест-культуры водоросли в 2%-й питательной среде Тамия, приготовленной на дистиллированной воде. В пять опытных проб дополнительно вносили нефть в концентрациях 250, 500, 1000, 2000 и 4000 мг/л соответственно. Все 6 вариантов токсикологического эксперимента выполнены в четырех аналитических повторностях.

Культивирование водоросли проводили при температуре среды 36 °С, непрерывном световом облучении лампой накаливания средней интенсивностью 60 Вт/м<sup>2</sup> ФАР и снабжении СО<sub>2</sub> из воздуха (0,03 %). За 22 ч культивирования количество клеток в контрольном варианте увеличивалось в 30–35 раз.

После культивирования прирост хлореллы определяли посредством измерения величины оптической плотности тест-культуры при длине волны 560 нм, а также интенсивности ее замедленной флуоресценции (ЗФ). Замедленную флуоресценцию регистрировали при возбуждении вспышками синего света длительностью 20 мс, в промежутках между которыми (5 мс) измеряли интенсивность свечения хлорофилла клеток водоросли. Измерение ЗФ производилось на флуориметре Фотон-10. Использование ЗФ позволяло учесть наряду с изменением количества клеток их фотосинтетическую активность [19].

При исследовании токсичности нефти для дафний в культивационную воду вносили нефть в концентрациях 0,02; 0,2; 2; 20 и 200 мг/л. Максимальную концентрацию получали, добавляя 0,05 см<sup>3</sup> нефти в 200 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, остальные – последовательным десятикратным разбавлением исходного раствора. После внесения нефти смесь интенсивно взбалтывали до образования эмульсии.

Биотестирование с использованием рачков выполняли в пробирках объемом 100 см<sup>3</sup>, которые заполняли 50 см<sup>3</sup> исследуемой воды. В каждую пробирку помещали по 10 дафний в возрасте 6–24 ч. Эксперимент выполняли в трех аналитических повторностях. Биотестирование проводили при температуре 20 °С и 12-часовом световом дне. В качестве контроля использовали отстоянную водопроводную воду, на которой выращивались рачки. Согласно используемой методике [20], пробирки с пробами воды и тест-организмами помещали на 48 ч во вращающуюся кассету устрой-

ства для экспонирования рачков (УЭР-03). Благодаря вращению кассеты (6–8 об./мин) происходила непрерывная аэрация проб, а также создавались равные условия для всех тестируемых образцов. Устройства УЭР-03 устанавливали в климатостат Р2, обеспечивающий поддержание требуемой температуры и режима фотопериодического освещения. По истечению времени экспонирования подсчитывали количество выживших дафний.

Для имитации влияния маслянистой пленки, образующейся на водной поверхности при нефтяном загрязнении, в параллельной серии экспериментов в пробы воды вместо нефти вносили нерафинированное подсолнечное масло в тех же концентрациях.

Содержание кислорода в среде в эксперименте с дафниями измеряли оксиметром в моменты кратковременной остановки вращения кассеты УЭР-03.

Эксперименты проведены трижды. Результаты обработаны статистически с помощью пакета программ Microsoft Excel 2003.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Присутствие нефти в культуральной среде приводило к снижению интенсивности замедленной флуоресценции культуры водоросли (рис. 1, а). Однако уменьшение свечения клеток наблюдалось только при очень высоком содержании нефти в среде – более 1000 мг/л. При концентрации поллютанта 4000 мг/л интенсивность ЗФ снижалась по сравнению с контролем на 63 %. Показатель  $EC_{50}$  был равен около 3000 мг/л. В этих условиях культура водоросли сохраняла хорошо выраженную зеленую окраску, зафиксировать которую в присутствии нефтяных капель посредством измерения оптической плотности суспензии не представлялось возможным.

Что же касается влияния подсолнечного масла на ЗФ изучаемой микроводоросли, то в экспериментах с хлореллой также наблюдалось снижение ее интенсивности (рис. 1, б). При концентрации масла 4000 мг/л интенсивность ЗФ уменьшилась на 50 %. Исходя из того, что  $EC_{50}$  нефти равен 3000 мг/л, можно сделать заключение, что с увеличением концентрации подсолнечного масла также происходило снижение уровня свечения

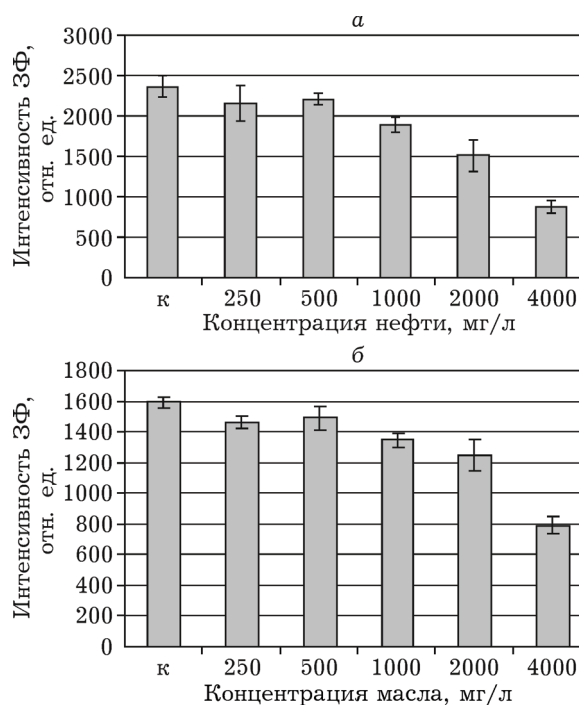


Рис. 1. Интенсивность замедленной флуоресценции суспензии водоросли *Chlorella vulgaris* после 22 часов культивирования в среде с различной концентрацией нефти (а) и масла (б)

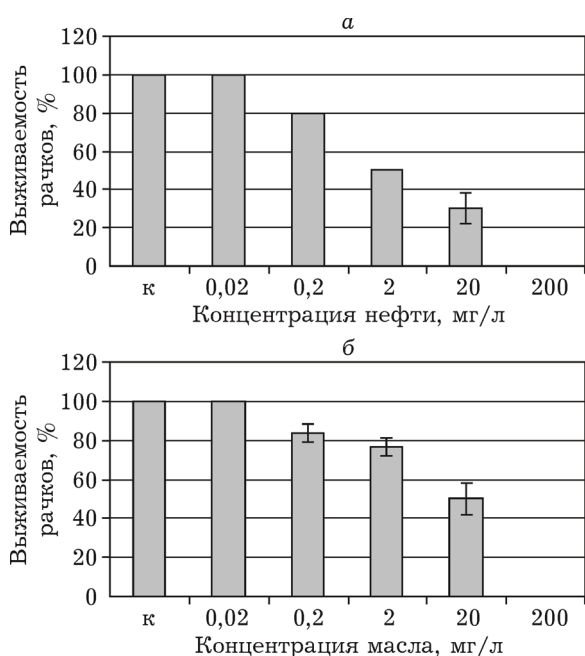


Рис. 2. Выживаемость рачков *Daphnia magna* (в % от контроля) после 48 часов экспонирования в воде с различной концентрацией нефти (а) и масла (б)

**Содержание кислорода (% от насыщения) в среде с рачками дафний в начале и конце токсикологического эксперимента (48 ч, экспонирование в УЭР-03)**

Момент эксперимента	Концентрация нефти, мг/л					
	Контроль	0,02	0,2	2	20	200
В начале опыта	99 ± 1	95,7 ± 0,6	91,3 ± 0,6	88,7 ± 2,5	79,7 ± 0,6	75,7 ± 1,5
В конце опыта	98,3 ± 0,6	85,7 ± 0,6	82 ± 1,7	79,7 ± 1,5	77,3 ± 1,5	74,7 ± 0,6

культуры водоросли, но к нефти хлорелла более чувствительна, чем к воздействию ее имитатора.

Воздействие водной эмульсии нефти на дафний показало, что гибель 50 % особей ( $LC_{50}$ ) за время экспонирования происходила при концентрации нефти в воде 2 мг/л (рис. 2, а). При увеличении содержания поллютанта до 200 мг/л регистрировалась гибель всех тест-организмов уже в первые часы эксперимента. Последнее, вероятно, происходило из-за того, что рачки, периодически всплывавшие на поверхность воды, “залипали” в нефтяной пленке и погибали. При уменьшении концентрации нефти до 0,02 мг/л (ниже ПДК в 2,5 раза) выживаемость дафний была на уровне контроля. Однако во всех исследуемых вариантах, кроме контрольного, наблюдалось всплытие рачков к поверхности воды. Такая ответная реакция этих организмов обычно отмечается на присутствие нефтепродуктов в воде [20].

В опытах с дафниями зарегистрирована отрицательная реакция на присутствие подсолнечного масла в воде, выражающаяся в снижении показателя их выживаемости (рис. 2, б). При концентрации масла 200 мг/л наблюдалась гибель всех тест-организмов в первые часы эксперимента. Это происходило, вероятно, из-за образования пленки на поверхности воды, аналогично тому, что имело место в случае использования нефти. Гибель 50 % особей дафний фиксировалась при концентрации масла в среде 20 мг/л, что на порядок выше, чем в случае применения нефти.

Отметим, что начало достоверного снижения выживаемости дафний происходило при одной и той же концентрации как масла, так и нефти – 0,2 мг/л. Расчеты показали, что при использованной в экспериментах на порядок меньшей концентрации нефти и масла сплошной слой этих гидрофобных веществ на поверхности воды не образуется.

При содержании нефти и масла в воде на уровне 0,2 мг/л может создаваться сплошная пленка толщиной около 140 Å, что приблизительно соответствует слою из шести молекул. Последнее следует из использованной при выполнении расчетов характерной величины молекулы стеариновой кислоты, длина которой составляет 25 Å [21].

Нефть может оказывать отрицательное влияние и на водоросль *Chlorella vulgaris*, и на рачков *Daphnia magna* либо из-за растворенных в воде токсичных веществ, либо из-за пленки, которая образуется на поверхности воды. Исходя из полученных результатов, свидетельствующих о незначительных различиях в концентрациях нефти и масла, ингибирующих ростовые характеристики изучаемых организмов, можно допустить, что именно пленка, образующаяся на поверхности воды, оказывает негативное влияние на рачков, обволакивая их и, вероятно, затрудняя дыхание. При этом в условиях непрерывного вращения флаконов с рачками в устройствах УЭР-03 образующаяся пленка, как показали прямые измерения (см. таблицу), практически не препятствовала поступлению кислорода в водную среду. Задержка роста водоросли хлорелла, наблюдаемая при очень высоких ее концентрациях, очевидно, обусловлена слипанием клеток в нефтяных каплях. В таких скоплениях клетки получают меньше углекислого газа и света для обеспечения процесса фотосинтеза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Киреева Н. А., Тарасенко Е. М., Бакаева М. Д. Детоксикация нефтезагрязненных почв под посевами люцерны (*Medicago sativa* L.) // Агрохимия. 2004. № 10. С. 68–72.
2. Михайлова Л. В. Действие водорастворимой фракции Усть-Балыкской нефти на ранний онтогенез стерляди *Acipenser ruthenus* // Гидробиол. журн. 1991. Т. 27, № 3. С. 77–86.

3. Нельсон-Смит А. Нефть и экология моря. М.: Прогресс, 1977. 302 с.
4. Carls M. G., Marty G. D., Hose J. E. Synthesis of the toxicological impacts of the Exxon Valdez oil spill on Pacific herring (*Clupea pallasii*) in Prince William Sound, Alaska, USA // Can. J. Fish. Aquat. Sci. 2002. Vol. 59. P. 153–172.
5. Rice S. D., Short J. W., Karinen J. F. Fate and Effects of Petroleum Hydrocarbons in Marine Ecosystems and Organisms. NY: Pergamon Press, 1977. N 3. P. 78–94.
6. Егоров Н. Н., Шипулин Ю. К. Особенности загрязнения природных вод и грунтов нефтепродуктами // Водные ресурсы. 1998. № 5. С. 598–602.
7. Перечень ПДК и ОБУВ вредных веществ для воды рыбохозяйственных водоемов. М., 1995.
8. Миронов О. Г. Биологические ресурсы моря и нефтяное загрязнение. М.: Пищевая пром-сть, 1972. 105 с.
9. Патин С. А. Нефть и экология континентального шельфа. М.: ВНИРО, 2001. 247 с.
10. Патин С. А. Экологические проблемы освоения нефтегазовых ресурсов морского шельфа. М.: ВНИРО, 1997. 350 с.
11. Лепилина И. Н. Прибрежное рыболовство – XXI век: материалы Междунар. науч.-практ. конф. Южно-Сахалинск. Сахалин, 2002. С. 323–329.
12. Калугина А. А., Миловидова Н. Ю., Свиридова Т. В., Уральская И. В. О влиянии загрязнений на морские организмы Новороссийской бухты Черного моря // Гидробиол. журн. 1967. № 1. С. 47–53.
13. Миловидова Н. Ю. Действие нефти на некоторых прибрежных ракообразных Черного моря // Там же. 1974. № 4. С. 96–100.
14. Смоляр Р. И. Выживаемость молоди и интенсивность размножения бокоплава *Gammarus divii* M. Edwards при хронической нефтяной интоксикации // Там же. 1981. № 3. С. 132–133.
15. Percy J. A., Mullin T. S. Effects of crude oils on the locomotory activity of Arctic marine invertebrates // Mar. Poll. Bull. 1977. Vol. 8, N 2. P. 35–39.
16. Percy J. A. Responses of Arctic marine benthic crustaceans to sediments contaminated with crude oil // Environ. Poll. 1977. Vol. 13. P. 1–10.
17. Percy J. A. Responses of Arctic marine crustaceans to crude oil and oil-tainted food // Ibid. 1976. Vol. 10. P. 155–162.
18. Григорьев Ю. С. Методика определения токсичности питьевых, природных и сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по измерению оптической плотности тест-культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) (ПНД Ф 14.1:2.3:4.10-04 16.1:2.3.7-04). М., 2007. 36 с.
19. Григорьев Ю. С., Шашкова Т. Л. Методика определения токсичности водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов, питьевой, сточной, природной воды по смертности тест-объекта *Daphnia magna* Straus (ПНД Ф 14.1:2.4.12-06 16.1:2.3.3.9-06). М., 2006. 44 с.
20. Стом Д. И., Балаян А. Э., Саксонов М. Н., Лозова Д. В. Токсикологическая оценка нефтезагрязненных вод с помощью ракообразных // Сиб. экол. журн. 2003. № 5. С. 565–567.
21. Слейбо У., Персонс Т. П. Общая химия. М.: Мир, 1979. 551 с.

## Effect of Water Pollution with Oil on Delayed Fluorescence of *Chlorella vulgaris* Beijer Algae and Survival Probability for *Daphnia magna* Str.

T. S. BORODULINA, V. I. POLONSKY, E. S. VLASOVA\*,  
T. L. SHASHKOVA, Yu. S. GRIGORIEV\*

Krasnoyarsk State Agricultural University  
660049, Krasnoyarsk, Mir ave., 90  
E-mail: media3000@rambler.ru

\*Siberian Federal University  
660041, Krasnoyarsk, Svobodny ave., 79  
E-mail: tatyana\_eco@inbox.ru

Effect of different oil concentrations in aqueous medium on chlorella alga and daphnia was studied in laboratory experiments. It was shown that with an increase in oil content in water, the intensity of delayed fluorescence of the test culture of chlorella and the survival probability of daphnia decrease. However, for chlorella, a decrease in fluorescence as an index of its photosynthetic activity is observed only for very high oil concentrations (1000–2000 MPC), while for daphnia the survival probability decreases starting from 4 MPC. A similar dependence is also observed when sunflower-seed oil imitating oil pollution is introduced into the medium. It is assumed that the negative effect of oil on microalgae and daphnia is due to physical factors rather than chemical ones.

**Key words:** oil toxicity, growth of *Chlorella vulgaris*, survival probability of *Daphnia magna*, delayed fluorescence of chlorophyll.