

## ФІТОТЕСТУВАННЯ ЯК ЕКСПРЕС-МЕТОД ОЦІНКИ ТОКСИЧНОСТІ НАФТОЗАБРУДНЕНИХ ҐРУНТІВ

М. Горон<sup>1</sup>, Н. Джура<sup>1</sup>, О. Романюк<sup>2</sup>, Л. Шевчик<sup>1</sup>, Н. Сенечин<sup>1</sup>, О. Терек<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

<sup>2</sup>Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії  
і вулехімії імені Л. М. Литвиненка НАН України  
вул. Наукова, 3<sup>а</sup>, Львів 79053, Україна  
e-mail: Horon.Marta@gmail.com

Проведено оцінку токсичності нафтозабруднених ґрунтів методами фітотестування. Встановлено лінійну залежність між пригніченням росту коренів і пагонів досліджуваних фітотестів – льону звичайного (*Linum usitatissimum* L.) і соняшника однорічного (*Helianthus annuus* L.) та ступенем нафтового забруднення. Обґрунтовано рекомендації щодо використання отриманих результатів для розробки експрес-методу визначення концентрацій нафти у ґрунті й еколого-токсикологічної діагностики нафтозабруднених територій.

*Ключові слова:* фітотестування, *Linum usitatissimum* L., *Helianthus annuus* L., токсичність, нафтозабруднені ґрунти.

Розроблення та експлуатація нафтогазових родовищ, наявність нафтовидобувної і переробної інфраструктури, розвинута мережа нафтогазопроводів є постійними факторами потенційної загрози навколишньому середовищу. Нафтопродукти важко розкладаються у зв'язку з їх складною хімічною природою, високою стійкістю до дії факторів довкілля. Ґрунти, забруднені нафтою і нафтопродуктами, набувають гідрофобних властивостей, унаслідок чого порушуються їхня структура, газообмін, водний режим, змінюються основні фізико-хімічні та біолого-екологічні параметри, різко знижується кількісний і якісний склад ґрунтової біоти, значно зменшується їхня біопродуктивність. Нафтопродукти проявляють токсичну і мутагенну дію, відповідно, негативно впливають на здоров'я людини [6–8, 11–13, 18].

У зв'язку з цим актуальною проблемою є пошук достовірних і надійних способів діагностики наслідків цього полікомпонентного забруднення та розроблення ефективних методів його ліквідації [8, 16, 23, 24]. Серед першочергових заходів – проведення оперативного екологічного моніторингу, що є важливою складовою системи управління якістю довкілля [9, 14, 20, 22].

При здійсненні оцінки екологічної небезпеки нафтопродуктів для навколишнього середовища необхідно мати інформацію за такими характеристиками: вміст нафтопродуктів в окремих компонентах, швидкість їхньої хімічної та біологічної деструкції, рівень токсичності нафтопродуктів стосовно живих організмів [8, 11]. На основі хімічного аналізу забруднених ґрунтів отримують дані про вміст нафтопродуктів у них. Однак для вивчення потенційного впливу на екосистему необхідною є оцінка через серію біотестів [5, 7, 21].

У біотестуванні основним критерієм оцінки забруднення виступає не концентрація поллютанта, а реакція та відповідь живого організму. Перевагою біотестування токсичності забрудненого середовища є урахування впливу антагоністичних і синергічних взаємодій поллютантів, сумісної біологічної активності впливу фізико-хімічних факторів на біоту

[2, 3, 15, 23]. Крім того, методи біотестування, які ґрунтуються на вивченні характеру зворотної реакції тест-організмів, характеризуються простотою і доступністю досліджень, оперативністю, повторюваністю й достовірністю отриманих результатів, економічністю. При відборі тест-об'єктів суттєвим є використання високочутливих до дії забруднювальних компонентів організмів. Також важливою вимогою є обов'язкова зворотна реакція тест-організму на дію токсиканта [4].

Рослини є первинними ланками трофічних ланцюгів, виконують важливу роль у поглинанні різноманітних забруднювачів і постійно зазнають їхнього впливу внаслідок закріплення на субстраті. Саме тому рослини вважають найбільш зручними об'єктами для біомоніторингу ґрунтів [4, 8, 15, 24, 25]. Оперативну інформацію про фітотоксичність забрудненого ґрунту можна отримати, використовуючи *тест-об'єкти* (насіння і проростки рослин) і різноманітні *тест-функції* (динаміка проростання насіння, відсоток схожості, довжина головного і бічних коренів, висота пагона тощо) [3, 22].

Відомо, що рослинні об'єкти відрізняються за фізіологічними характеристиками і біохімічним складом, їхня реакція значно залежить від умов середовища, умов проведення експерименту [19]. У зв'язку з цим при застосуванні кожної рослинної тест-системи необхідним є етап *калібрування* – випробовування даної тест-системи з використанням різних концентрацій забруднювачів [3].

Пріоритетними є дослідження з пошуку тест-систем, які даватимуть змогу оцінювати комбінований вплив забруднювачів довкілля на біоту. У цьому сенсі рослини мають істотні переваги перед приладами: дешеві, легко відтворюються, швидко розмножуються, мають типову відповідну реакцію на вплив.

Тому, враховуючи вищесказане, **метою роботи** було проведення оцінки токсичності нафтозабруднених ґрунтів методами фітотестування і встановлення залежності „доза-ефект” із подальшим обґрунтуванням методичних рекомендацій для розробки експрес-методу кількісного визначення відповідних концентрацій нафти у ґрунті.

#### Матеріали та методи

У процесі пошуку чутливих тест-об'єктів для оцінки токсичності ми пророщували насіння різних видів рослин – льону звичайного (*Linum usitatissimum* L.), соняшника однорічного (*Helianthus annuus* L.), ріпаку озимого (*Brassica napus* L.), проса дикого (*Panicum miliaceum* L.), крес-салату (*Lepidium sativum* L.), огірка звичайного (*Cucumis sativus* L.) на ґрунтах, забруднених сировою нафтою у концентрації 5%.

Для встановлення залежності між концентраціями нафти у ґрунті та морфометричними показниками чутливих фітотестів (*L. usitatissimum* та *H. annuus*) закладали додаткові дослідні середньосуглинковий ґрунт, приготовлений згідно з методами [2, 17], забруднювали сировою нафтою (густиною 0,86 г/мл) у концентраціях 1, 2,5, 5, 8, 10, 15%. Контролем слугував ґрунт без нафти. У чашки Петрі поміщали 20 г ґрунту і зволожували 10 мл води (вологість 35%). На ґрунт розкладали насіння тест-об'єктів. Закриті чашки ставили в термостат на проростання при температурі +24°C [2, 3, 17]. Через 3 доби визначали кількість пророслого насіння, а через 6 діб – вимірювали довжину коренів і висоту пагонів. Отримані показники у дослідних варіантах виражали у відсотках щодо контролю. Достовірність різниці між контрольним і дослідними варіантами оцінювали за критерієм Стьюдента, вірогідними вважали різниці, де рівень значущості  $p < 0,05$  [1].

#### Результати і їхнє обговорення

На основі аналізу схожості насіння, довжини кореня (ДК) і висоти пагона (ВП), коефіцієнтів варіації морфометричних параметрів показано різну чутливість досліджуваних

тест-об'єктів до нафтового стресу (див. таблицю). Уперше виявлено вразливість крес-салату до дії нафти у ґрунті – відносна схожість насіння, довжина кореня і висота пагона зменшувалися та становили відповідно 85,7±4,7, 15,6±1,1 і 32,5±2,7% порівняно з контролем.

Чутливість різних видів рослин до забруднення ґрунту нафтою у концентрації 5%

Тест-об'єкти	Відносна схожість, % $x \pm m$	Довжина кореня			Висота пагона		
		$x \pm m$ , %	Рівень	Коефіцієнт варіації, %	$x \pm m$ , %	Рівень	Коефіцієнт варіації, %
			значущості, $p <$			значущості, $p <$	
<i>Brassica napus</i> L.	96,2±6,6	59,7±6,8	0,05	39,4	20,7±3,5	0,001	54
<i>Panicum miliaceum</i> L.	131±12,5	115,5±5,4	—	32,5	26,9±3,2	0,05	81,6
<i>Cucumis sativus</i> L.	130±10,4	45,4±4,2	0,01	56,9	54±5,9	0,05	68,4
<i>Lepidium sativum</i> L.	85,7±4,7	15,6±1,1	0,001	22,5	32,5±2,7	0,05	38,1
<i>Linum usitatissimum</i> L.	111±6,2	47,4±2,2	0,01	28,2	21,2±1	0,01	29,6
<i>Helianthus annuus</i> L.	116±4,2	52,9±4,2	0,01	41,7	16,1±2,4	0,01	31,20%

**Примітка.** Контроль для усіх показників прирівнювали до 100%;  $x$  – середнє арифметичне;  $m$  – статистична похибка середнього арифметичного.

В умовах нафтового забруднення виявлено неоднозначність різних тест-реакцій проса дикого: довжина кореня сягала контролю, тоді як висота пагона становила тільки 26,9±3,2%. Для останньої характерний високий рівень мінливості – коефіцієнт варіації 81,6%. Нами показано, що огірок звичайний є більш чутливим до дії нафти порівняно з просом: ДК – 45,4±4,2%, а ВП – 54±5,9%. Проте для даних ознак характерна висока мінливість: значення коефіцієнта варіації становило відповідно 56,9 і 68,4%. Неоднорідність реакції всередині вибірки спостерігали і для ріпаку озимого.

Таким чином, на основі проведених досліджень уперше виявлено високу варіабельність показників у *L. sativum*, *P. miliaceum* та *C. sativus* на дію нафти, що не дозволяє використовувати дані види для подальших досліджень. Проте показано високу чутливість льону звичайного та соняшника однорічного до дії нафтового забруднення ґрунту: довжина кореня та висота пагона льону становила 47,4±2,2 і 21,2±1%, у соняшника – 52,9±4,2 і 16,1±2,4% відповідно. Слід вказати на однорідність реакцій усередині вибірки – коефіцієнт варіації морфометричних показників становив близько 30% для обох тест-об'єктів, крім довжини кореня соняшника – 41,7%. Це дало нам підставу використовувати *L. usitatissimum* та *H. annuus* для подальших досліджень.

Схожість насіння льону та соняшника за дії нафти від 1 до 8% достовірно не відрізнялася від контролю. Суттєве зменшення схожості насіння *L. usitatissimum* та *H. annuus* спостерігали за дії високих концентрацій нафти у ґрунті: так, за дії нафти 10% даний показник у льону становив 28±6,5%, а у соняшника – 70,8±11% щодо контролю; за дії нафти 15% насіння досліджуваних тест-об'єктів не проростало (рис. 1). Відомо, що насіння здатне адсорбувати нафту, яка, у свою чергу, призводить до розвитку змін метаболічних реакцій, унаслідок чого зменшується схожість або насіння взагалі не проростає [20, 25].

Для одержання кількісних характеристик впливу забруднювачів необхідно визначити залежність між реакцією рослини на стресовий фактор і дозою фактора. Для цього зіставляють відповідні параметри (схожість, довжину кореня тощо) з відповідними дозами (концентраціями) фактора з отриманням залежності „доза-ефект” („концентрація-ефект”), на основі яких будують калібрувальні криві [3, 15].

Нами виявлено, що за дії низьких концентрацій нафти (1; 2,5%) довжина кореня соняшника суттєво не відрізнялася зі статистичною достовірністю від контролю, проте у льону спостерігали зменшення ДК на 70 і 60% відповідно (рис. 2). Це свідчить про більшу

Льон звичайний  
(*Linum usitatissimum* L.)Соняшник однорічний  
(*Helianthus annuus* L.)

Контроль



8% нафти у ґрунті



10% нафти у ґрунті



15% нафти у ґрунті

Рис. 1. Рослинні тест-системи *Linum usitatissimum* L. та *Helianthus annuus* L. за дії нафти у ґрунті.

чутливість даної тест-реакції *L. usitatissimum* до низького нафтового забруднення. Однак дана залежність має складний нелінійний характер на проміжку 1–5% нафти. Важливо підкреслити, що на проміжку 5–15% нафти залежності між довжиною кореня обох досліджуваних тест-об'єктів і ступенем нафтового забруднення є близькими і тяжіють до лінійних. Це свідчить про можливість застосування даної тест-реакції у практиці для відображення ступеня токсичності й фітооцінки нафтозабруднених ґрунтів різними видами рослин у межах концентрацій нафти 5–15%.

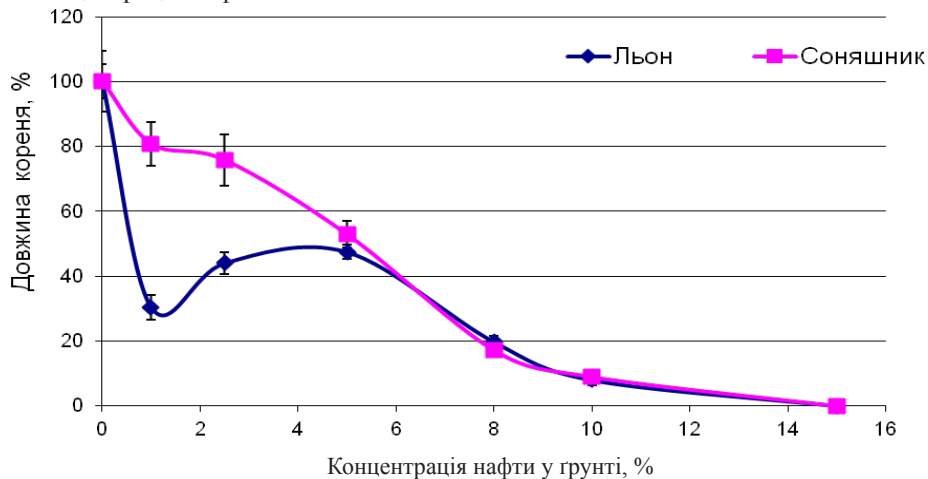


Рис. 2. Залежність довжини коренів льону звичайного (*Linum usitatissimum* L.) та соняшника однорічного (*Helianthus annuus* L.) від концентрації нафти у ґрунті.

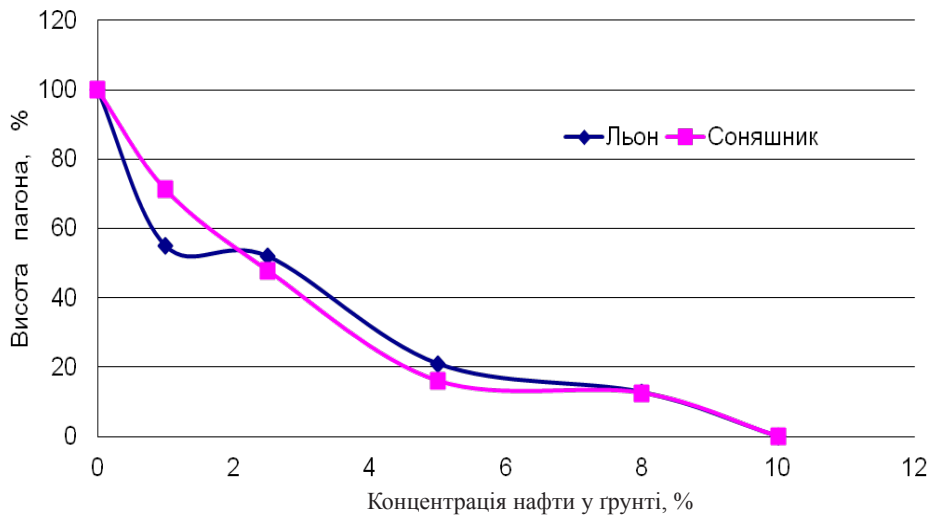


Рис. 3. Залежність висоти пагонів льону звичайного (*Linum usitatissimum* L.) та соняшника однорічного (*Helianthus annuus* L.) від концентрації нафти у ґрунті.

Наші дослідження засвідчили високу чутливість росту пагонів до дії нафти, навіть при низьких концентраціях (1%): зокрема, висота пагонів у льону становила  $55 \pm 4,7\%$ , а у соняшника –  $71,2 \pm 8,5\%$  (рис. 3). Досліджувана тест-реакція дає можливість зафіксувати токсичність слабозабруднених ґрунтів на територіях нафтових виливів.



Зі зростанням концентрації нафти у ґрунті ріст пагона поступово пригнічувався в обох досліджуваних об'єктах. За дії нафти 10% пагін не розвивався. Таким чином, встановлена залежність між висотою пагона та концентрацією нафти у ґрунті може бути представлена двома лінійними ділянками в діапазонах концентрацій нафти 0–5 та 5–10%. Отримані прямі майже збігаються, що вказує на однаковий ступінь фітотоксичності забруднених ґрунтів для обох видів рослин.

Таким чином, на основі проведених досліджень встановлено залежність „концентрація-ефект” між відносною довжиною коренів *H. annuus* і ступенем нафтового забруднення на проміжку 1–15%, а також відносною довжиною пагонів і нафтовим забрудненням на проміжку 1–10% для обох досліджуваних тест-об'єктів – *L. usitatissimum* та *H. annuus*. Проте за дії низьких концентрацій нафти (1%) попередню оцінку доцільно проводити за висотою пагонів однієї із рослин, а подальше її уточнення – за довжиною кореня *L. usitatissimum*.

Отже, у результаті проведених досліджень виявлено специфічність і чутливість фітотестів *Linum usitatissimum* L. та *Helianthus annuus* L., що вказує на можливість їхнього використання для оцінки токсичності нафтозабруднених ґрунтів. Отримані нами результати є базовими для розробки методичних рекомендацій визначення концентрацій нафти у ґрунті й еколого-токсикологічної діагностики нафтозабруднених територій.

*Наукова праця виконана в рамках держбюджетної теми БР-83П “Застосування рослинних тест-систем для еколого-токсикологічної діагностики нафтозабруднених ґрунтів у процесі їх фіторе mediaції” (№ держреєстрації 0111U001083).*

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Атраментова Л. О., Утєвська О. М. Біометрія. Ч. 1, 2. Характеристики розподілів: підручник. Харків: Ранок, 2007.
2. Горова А., Кулина С. Оцінка токсичності ґрунтів Червоноградського гірничопромислового району за допомогою ростового тесту // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2008. Вип. 48. С. 189–194.
3. Гродзинський Д. М., Шиліна Ю. В., Кущокоць Н. К. та ін. Застосування рослинних тест-систем для оцінки комбінованої дії факторів різної природи. К.: Фітосоціоцентр, 2006. 60 с.
4. Губачов О. І. Особливості використання рослин для біотестування ґрунтів з метою визначення рівня екологічної безпеки промислових територій // Наук. вісн. КУЕІТУ. Нові технології. 2010. № 3 (29). С. 164–171.
5. Джура Н., Шевчик Л., Романюк О., Терек О. Екотоксикологічний моніторинг нафтозабруднених ґрунтів // Молодь і поступ біології: VII Міжнар. конф. студентів та аспірантів: зб. тез. (5–8 квітня 2011 р. Львів). С. 318–319.
6. Джура Н. М., Мороз О. М., Русин І. Б. та ін. Вплив рослин бобу кормового (*Vicia faba* var. *minor*) на функціонування мікробних асоціацій метаболізму азоту у забрудненому нафтою ґрунті // Ґрунтознавство. 2010. Т. 11. № 3–4. С. 105–112.
7. Джура Н. М., Терек О. І. Перспективи застосування рослинних тест-систем для екологічної оцінки нафтозабруднених ґрунтів // Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів: Матеріали XI конф. молодих вчених. К., 2010. С. 50–51.
8. Киреева Н. А., Мифтахова А. М., Салахова Г. М. Рост и развитие растений яровой пшеницы на нефтезагрязненных почвах и при биоремедиации // Агрехимия. 2006. № 1. С. 85–89.

9. Концепція екологічного нормування допустимого антропогенного навантаження на ґрунтовий покрив / За ред. д.с.-г.н., проф. С.А. Балюка, д.т.н., проф. М.І. Ромашенка. К.: Аграрна наука, 2004. 34 с.
10. *Крайнюков О. М.* Особливості розповсюдження вуглеводневого забруднення та оцінка його впливу на геоекологічний стан басейну р. Сіверський Донець у межах Харківської області: автореф. дис. ... канд. географ. наук. Харків, 2007. 20 с.
11. *Крайнюков О. М.* Оцінка екологічної небезпеки забруднення нафтопродуктами ґрунтового покриву // Екологічний атлас Кременчука. Зб. 2007 /www.eko-kremen.mvk.pl.ua/material/2007.zip.
12. *Митропольський О. Ю., Байсарович І. М.* Нафтохімічне забруднення та проблеми екології Карпатського регіону // Екологія довкілля та безпека життєдіяльності. К.: Знання, 2002. С. 62–65.
13. *Мороз О. М., Джура Н. М., Безноска Г. Я.* та ін. Вплив рослин *Carex hirta* на мікрофлору нафтозабруднених ґрунтів // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. біол. 2006. Вип. 19. С. 149–154.
14. НД. Рекомендації. Створення регіональної мережі спостережень та контролю за забрудненням нафтопродуктами басейну річки Сіверський Донець на території Харківської області. Харків, 2007. 15 с.
15. *Ольхович О. П., Мусієнко М. М.* Фітоіндикація та фітомоніторинг. К.: Фітосоціоцентр, 2005. 64 с.
16. Пат. на корисну модель 60481 Україна, МПК (2011.01) A01B 79/02 (2006.01) B09C 1/00. Спосіб фітоочищення нафтозабруднених ґрунтів / Н.М. Джура, О.І. Романюк, О.М. Цвілінюк, О.І. Терек №u2010 12943; Заявл. 01.11.2010; Опубл. 25.06.2011; Бюл. №12, 2011 р.
17. *Руденко С. С., Костишин С. С., Морозова Т. В.* Загальна екологія: практичний курс: Навч. посібник. Част. 1, 2. Чернівці: Рута, 2003. 320 с.
18. *Русин І. Б., Фігурка О. М., Фігурка У. М.* та ін. Мікробіота нафтозабрудненого ґрунту, рекультивованого рослинами *Carex hirta* // Мікробіологія і біотехнологія. 2009. №8. С. 41–47.
19. *Терек О. І.* Механізми адаптації та стійкості рослин до несприятливих факторів довкілля // Журн. агробіологія та екологія. 2004. № 1. С. 41–56.
20. *Baker J. M.* The effect of oils on plants // Environ. Polut. 1970. Vol. 1. 27. 44 p.
21. *Banks M., Schultz K.* Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum contaminated soil // Water, Air, and Soil Pollution. 2005. Vol. 167. P. 211–219.
22. *Grant W.* Higher plant assays for the detection of the chromosomal aberration and gene mutation – a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals // Mutat. Res. 1999. N 426. P. 107–112.
23. *Keddy C., Greene J., Bonnell M.* Review of whole organism bioassays: Soil, freshwater sediment and freshwater assessment in Canada // Ecotoxicol Environ Saf. 1995. Vol. 30. 251 p.
24. *Sharifi M., Sadeghi Y., Akbarpour M.* Germination and growth of six plant species on contaminated soil with spent oil // Int. J. Environ. Sci. Tech. 2007. Vol. 4. P.463–477.
25. *Ziółkowska A., Wyszowski M.* Toxicity of petroleum substances to microorganisms and plants // Ecological Chemistry and Engineerings. 2010. Vol. 17. N 1. P. 73–82.

Стаття: надійшла до редакції 17.11.11

доопрацьована 30.11.11

прийнята до друку 01.12.11

**PHYTOTEST AS RAPID METHOD OF TOXICITY ASSESSMENT  
OF OIL POLLUTED SOILS****M. Horon<sup>1</sup>, N. Dzhura<sup>1</sup>, O. Romanyuk<sup>2</sup>, L. Szewczyk<sup>1</sup>, N. Senechyn<sup>1</sup>, O. Terek<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Ivan Franko National University of Lviv  
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine*<sup>2</sup>*Physical Chemistry of Combustible Minerals Department of the Lytvynenko L.M.  
Institute of Physical-Organic Chemistry and Coal Chemistry of NAS of Ukraine  
3<sup>a</sup>, Naukova St., Lviv 79053, Ukraine  
e-mail: Horon.Marta@gmail.com*

Conducted estimation of toxicity of oil polluted soils by phytotesting methods. It was set linear dependence between growth inhibition of root and shoot studied phytotests *Linum usitatissimum* L. and *Helianthus annuus* L. plants and degree of oil contamination. The recommendations of usage the results to develop a rapid method for assessment concentrations of oil in the soil and ecotoxicological diagnostic of oil polluted areas were argued.

*Keywords:* phytotesting, *Linum usitatissimum* L., *Helianthus annuus* L., toxicity, oil polluted soils.

**ФИТОТЕСТИРОВАНИЕ КАК ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОЦЕНКИ  
ТОКСИЧНОСТИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ****М. Горон<sup>1</sup>, Н. Джура<sup>1</sup>, О. Романюк<sup>2</sup>, Л. Шевчик<sup>1</sup>, Н. Сенечин<sup>1</sup>, О. Терек<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина*<sup>2</sup>*Отделение физико-химии горючих ископаемых Института физико-органической химии и углехимии имени Л.М. Литвиненко НАН Украины  
ул. Научная, 3<sup>a</sup>, Львов 79053, Украина  
e-mail: Horon.Marta@gmail.com*

Проведена оценка токсичности нефтезагрязненных почв методами фитотестирования. Установлена линейная зависимость между угнетением роста корней и побегов исследуемых фитотестов – *Linum usitatissimum* L., *Helianthus annuus* L. и степенью нефтяного загрязнения. Обоснованы рекомендации относительно использования полученных результатов для разработки экспресс-метода определения концентраций нефти в почве и эколого-токсикологической диагностики территорий нефтезагрязненных территорий.

*Ключевые слова:* фитотестирование, *Linum usitatissimum* L., *Helianthus annuus* L., токсичность, нефтезагрязненные почвы.