

# ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ

УДК 574.24 : 57.044 : 615.099

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ВЛИЯНИЯ ТРОТИЛА НА МИКРОФЛОРУ ПОЧВЫ

А.А. Масленников, С.А. Демидова

Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии» Федерального медико-биологического агентства (ФГУП «НИИ ГТП» ФМБА России), 400048, г. Волгоград, Российская Федерация

**П**роведена экспериментальная оценка опасности содержания тротила в почве по одному из наиболее значимых общесанитарных показателей вредности – микробиоценозу.

В качестве тест-организмов использовали: *E. coli*, микромицеты, актиномицеты и сапрофитные бактерии, которые выращивали на средах, специфических для каждого вида микрофлоры.

Установлено, что при содержании токсиканта в грунте на уровнях 20,0 и 10,0 мг/кг в течение всего эксперимента выявлен существенный рост колоний *E. coli*, достигавший 458,87 % (относительно контроля), что свидетельствует о торможении процесса самоочищения почвы.

Кроме того, соединение в данных концентрациях способствовало значимому росту колоний микромицетов (до 200,00 %), указывающее на его накопление в почве, где грибы выступают в роли индикаторов (накопителей токсина).

В то же время вещество на уровне 20,0 мг/кг вызывало угнетение жизнедеятельности актиномицетов, достигавшее 50,27 %. Численность колоний сапрофитной микрофлоры также достоверно уменьшалась в почвенной смеси при содержании химагента на уровнях 20,0 и 10,0 мг/кг.

По данному виду общесанитарного показателя вредности концентрация тротила – 10,0 мг/кг принята в качестве пороговой, а значение 2,0 мг/кг – как недействующее.

Полученные данные учтены при последующей разработке гигиенического норматива данного взрывчатого вещества.

**Ключевые слова:** тротил, почва, микробиоценоз, токсическое действие, пороговая и недействующая концентрация.

**Введение.** В процессе длительного периода времени взрывчатые вещества (ВВ) широко используются во многих странах мира в оборонной промышленности и отдельных видах хозяйственной деятельности (буровые работы, горноразведочные выработки, проведение тоннелей, взрывание льда и др.) [1].

Международной проблемой в последние годы являются участвовавшие случаи использования взрывчатых веществ в террористических акциях [2].

К числу наиболее распространенных видов ВВ относится тротил. В нашей стране предприятия

по его производству входят в категорию химически опасных производственных объектов [3].

Опасность применения тротила помимо основного назначения (брзантность, фугасность, детонационная волна и др.) заключается в загрязнении зданий, сооружений и объектов окружающей среды токсичными газами, которые образуются в процессе химической реакции взрывчатого превращения, а также компонентами, входящими в состав данного соединения [4].

Для защиты здоровья контактирующих от токсического воздействия ВВ, включая тротил, экс-

Масленников Александр Александрович (Maslennikov Aleksandr Aleksandrovich), доктор биологических наук, заведующий лабораторией экологической токсикологии ФГУП «НИИ ГТП» ФМБА России, maslennikov@rihtop.ru

Демидова Светлана Александровна (Demidova Svetlana Aleksandrovna), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экологической токсикологии ФГУП «НИИ ГТП» ФМБА России, demidova@rihtop.ru.

периментально обосновываются соответствующие гигиенические нормативы (ПДК, ПДУ), обеспечивающие их безопасное содержание в производственной зоне и объектах окружающей среды. Разработаны концептуальные подходы по обоснованию стандартов безопасности после деконтаминации поверхности помещений, загрязнённых в результате химических чрезвычайных ситуаций [5, 6].

В то же время на момент выполнения работы экспериментальные данные об опасности содержания тротила в почве отсутствовали, что и послужило *целью настоящих исследований*, необходимых для последующей разработки соответствующего гигиенического норматива.

**Материалы и методы исследования.** В качестве объекта исследований использован стандартный образец тротила (2,4,6-тринитротолуол, ТНТ,  $C_7H_5N_3O_6$ ), номер CAS – 118-96-7, удельной плотностью  $d_4^{20} = 1,663$  г/см<sup>3</sup> и молекулярной массой 227,0. Данное соединение представляет собой порошкообразное соединение кремового цвета. Растворимость в воде при температуре 20,0 °С составляет 0,013 г на 100,0 г, при 100,0 °С – 0,15% [7].

Объём и методология проведенных экспериментальных работ соответствовали требованиям действующих «Методических рекомендаций по обоснованию ПДК химических веществ в почве» [8] и руководства «Гигиеническое нормирование химических веществ в почве» [9].

При выполнении микробиологических исследований, формировали смесь почвы и модельного почвенного эталона (МПЭ) с таким расчётом, чтобы содержание углерода в ней составляло 0,5 %. В качестве МПЭ использовали предварительно подготовленный среднезернистый карьерный песок, отобранный с глубины не менее 3-х метров от поверхности почвы [8, 9]. Такой грунт в меньшей степени способствует ускоренному распаду химических веществ с учётом биологического фактора [9]. В работе применена модельная смесь (почва и МПЭ) в соотношении 1:2. Почвенным образцом служил дерново-подзолистый грунт (верхний слой 0,0 – 25,0 см) средней полосы европейской части России.

В соответствии с «Методическими рекомендациями...» [8] в качестве тест-организмов использовали: *E. coli*, микромицеты, актиномицеты и сапрофитные бактерии. Общую численность микробных сообществ учитывали при их выращивании на следующих средах: *E. coli* – среда Эндо; микромицеты (почвенные грибы) – среда Чапека; актиномицеты – крахмало-аммиачный агар; сапрофитные бактерии – почвенный агар [8 – 11].

Целесообразность включения в исследования почвенных грибов, участвующих в минерализации органических веществ и образовании гу-

муса, обусловлена тем, что последние являются высокочувствительной группой почвенной микрофлоры к воздействию ксенобиотиков [8 – 11].

Актиномицеты – группа микроорганизмов с чертами организации бактерий и простейших грибов распространены в почве, отвечающие за биохимические процессы в почве [11, 12].

Сапрофитные бактерии представляют наиболее многочисленную и активную группу почвенного микробиоценоза, играющую важную роль в любых процессах самоочищения почвы (разложение органических соединений синтетического, растительного и животного происхождения) [11, 12].

*E. coli*, как условно-патогенная микрофлора является индикатором загрязнения. Возрастание и уменьшение количества колоний данных бактерий относительно контроля свидетельствует об изменении процесса самоочищения почвы [8]. В настоящих исследованиях использован музейный штамм *E. coli*.

Воздействие экотоксиканта на микробиоценоз оценивали при его поступлении в почву в концентрациях 20,0, 10,0 и 2,0 мг/кг.

Схема проведения экспериментов сводилась к следующему. В течение всего периода исследований сосуды с почвенной смесью (как с загрязненной веществом, так и контрольной) выдерживали при комнатной температуре (20,0 – 25,0 °С) в темноте. С целью поддержания необходимой влажности (60,0 % от полной влагоёмкости) периодически в них добавляли стерильную водопроводную воду. Длительность микробиологических посевов для микромицетов, актиномицетов и сапрофитных бактерий составила 14 дней, а для *E. coli* – 7 суток [8, 9]. Показатели рН-среды водных вытяжек из почвенной смеси (ПС), приготовленных при соотношении ПС: вода – 1:10, были нейтральными (рН 7-8) [11, 12].

В сосуды, содержащие модельную почву, загрязненную и незагрязненную веществом, вносили приготовленную суспензию культуры *E. coli*, плотность которой по стандарту мутности равна 10,0 ед. [8], в количестве 1,0 мл исходной взвеси на 1,0 кг почвы.

Чашки Петри с указанными питательными средами, загрязненными исследуемым химагентом, выдерживали в течение всего эксперимента в термостатах при температуре от 25,0 до 37,0 °С, в зависимости от вида тестируемых микроорганизмов [8 – 11].

Посев бактерий, актиномицетов и почвенных грибов проводили при разведении ПС в стерильной водопроводной воде в интервале от 1:10 до 1:10000, соответственно каждому виду микрофлоры [9 – 11].

Внесение в чашки Петри с питательными средами тестируемых культур микрофлоры осу-

ществляли капельным методом; почвенных грибов – поверхностным методом [8 – 11].

В соответствии с инструктивно-методическими документами подсчёт численности колоний микромицетов, актиномицетов, сапрофитных бактерий и *E. coli* проводили визуально, а затем рассчитывали по соответствующей формуле [8 – 12].

В качестве критерия вредного действия вещества принимали уровень подавления роста всех тестируемых микроорганизмов, а так же стимуляцию развития колоний микромицетов и *E. coli* на 50,0 % относительно контроля [8, 9].

**Результаты и обсуждение.** В ходе работ установлено, что при содержании тротила в грунте на уровнях 20,0 и 10,0 мг/кг в течение всего эксперимента выявлен достоверно значимый рост колоний *E. coli* от 53,38 % до 458,87 % (табл. 1). Это свидетельствует о тор-

можении процесса самоочищения почвы от кишечных палочек [8, 9].

Так же при содержании в почве тротила в указанных концентрациях с 1-х по 7-е сутки эксперимента зарегистрирован значимый рост колоний микромицетов до 200,00 % (табл. 2), который вызывает на накопление в почве химагента, где грибы выступают в роли индикаторов (накопителей токсина) [8, 9].

В противоположность отмеченному внесение вещества в модельную смесь на уровне 20,0 мг/кг вызывало на 3-и сутки опыта угнетение жизнедеятельности актиномицетов, достигавшее 50,27 % (табл. 3).

Помимо указанного, выявлено отрицательное воздействие токсиканта (до 58,50 %) в концентрациях 20,0 и 10,0 мг/кг на сапрофитную микрофлору, отмечавшееся на 3-и и 10-е сутки эксперимента (табл. 4).

Таблица 1

**Влияние тротила на численность *E. coli* (КОЕ, тыс. ед. / 1 г почвы с учетом влажности)**

Период посева, сутки	Контроль	Содержание тротила в почвенной смеси, мг/кг						
		20,0		10,0		2,0		
	М	М	эффект воздействия, %	М	эффект воздействия, %	М	эффект воздействия, %	
0 (фон)	489,95	-	-	-	-	-	-	
1	310,00	1732,50	<b>458,87*</b> ↑	479,59	<b>54,71*</b> ↑	231,67	25,27	
2	311,67	530,00	<b>70,00*</b> ↑	521,67	<b>67,38*</b> ↑	239,17	23,26	
5	358,35	556,65	<b>55,34*</b> ↑	549,62	<b>53,38*</b> ↑	448,57	25,18	
7	204,51	443,34	<b>116,78*</b> ↑	326,67	<b>59,73*</b> ↑	114,17	44,17	

Примечание: в этой и последующих таблицах символами \*↑↓ обозначены достоверные изменения показателей и их направленность относительно контроля

Таблица 2

**Влияние тротила на численность микромицетов (КОЕ, тыс. ед. / 1 г почвы с учетом влажности)**

Период посева, сутки	Контроль	Содержание тротила в почвенной смеси, мг/кг						
		20,0		10,0		2,0		
	М	М	эффект воздействия, %	М	эффект воздействия, %	М	эффект воздействия, %	
0 (фон)	1,85	-	-	-	-	-	-	
1	0,75	2,25	<b>200,00*</b> ↑	1,42	<b>89,33*</b> ↑	0,83	10,67	
3	1,50	2,50	<b>66,67*</b> ↑	1,92	28,00	1,00	33,33	
7	1,00	0,92	8,00	1,83	<b>83,00*</b> ↑	1,08	8,00	
10	1,67	1,33	20,36	1,92	14,97	1,33	20,36	
14	2,13	2,25	5,63	1,25	41,31	1,92	9,86	

Таблица 3

## Влияние тротила на численность актиномицетов (КОЕ, тыс. ед. / 1 г почвы с учетом влажности)

Период посева, сутки	Контроль	Содержание тротила в почвенной смеси, мг/кг					
		20,0		10,0		2,0	
	М	М	эффект воздействия, %	М	эффект воздействия, %	М	эффект воздействия, %
0 (фон)	5712,15	-	-	-	-	-	-
1	4220,00	5766,63	36,65	5549,96	31,52	5175,00	22,63
3	6970,88	3466,67	<b>50,27*</b> ↓	7700,00	10,46	6100,00	12,49
7	9200,00	8016,72	12,86	6491,63	29,44	9000,04	2,17
10	13216,72	8833,34	33,17	11299,97	14,50	12408,38	6,12
14	4416,67	4660,88	5,53	5566,67	26,04	5766,67	30,57

Таблица 4

## Влияние тротила на численность сапрофитной микрофлоры (КОЕ, тыс. ед. / 1 г почвы с учетом влажности)

Период посева, сутки	Конт-роль	Содержание тротила в почвенной смеси, мг/кг					
		20,0		10,0		2,0	
	М	М	эффект воздействия, %	М	эффект воздействия, %	М	эффект воздействия, %
0 (фон)	7758,73	-	-	-	-	-	-
1	5525,04	6912,54	25,11	6308,34	14,18	5033,34	8,90
3	10383,38	5083,29	<b>51,04*</b> ↓	5091,67	<b>50,96*</b> ↓	7766,63	25,20
7	7308,34	8754,13	19,78	5925,00	18,93	5858,34	19,84
10	9558,34	4450,04	<b>53,44*</b> ↓	3966,63	<b>58,50*</b> ↓	11483,34	20,14
14	6639,63	7758,34	16,85	7100,00	6,93	6225,04	6,24

С учётом изложенного концентрацию тротила – 10,0 мг/кг можно принять в качестве пороговой, а значение 2,0 мг/кг – как недействующее по данному виду общесанитарного показателя вредности.

Обобщенный анализ приведенных данных свидетельствует о том, что тестируемое взрывчатое вещество оказывало негативное влияние на микробиоценоз почвы.

Выявленные изменения представляют собой «классическую» картину нарушения процессов самоочищения и самовосстановления почвы под воздействием экотоксиканта. Действительно, содержание тротила в исследуемой биосреде приводило к резкому дисбалансу соотношения оцениваемых видов микрофлоры. В частности, в почвенной смеси установлено снижение количества клеток сапрофитных групп: акти-

номицетов и сапрофитных бактерий, отвечающих за разложение органических соединений синтетического, растительного и животного происхождения, необходимое для равномерного протекания биохимических процессов (нитрификация, ферментация, дыхание и т.п.). На этом фоне резко возрастала численность колоний микромицетов (индикаторов-накопителей токсина) и особенно условно-патогенных бактерий *E. coli*.

При этом особая опасность, попадания тротила в данную биосреду, заключалась в широте токсического эффекта, реализованное в изменении численности всех оцениваемых видов почвенной микрофлоры, что согласуется с результатами аналогичных исследований боевых отравляющих веществ кожно-нарывного и нервно-паралитического действия [13].

Полученные данные необходимо учитывать при обращении с данным взрывчатым веществом.

### Выводы.

1. Поступление тротила в почву сопровождается токсическим влиянием на исследуемые группы микрофлоры данной экосистемы.

2. Наиболее чувствительными тест – объектами при воздействии оцениваемого соединения оказались бактерии *Escherichia coli* и микромитозы.

3. Допустимая концентрация тротила на микробиоценоз почвы составляет 2,0 мг/кг.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Взрывчатые вещества – основные понятия, применение, классификация. Available at: <http://fb.ru/article/47526/vzryvchatyie-veschestva---osnovnyie-ponyatiya-primenenie-klassifikatsiya>.
2. Взрывные вещества и взрывные устройства, применяемые при совершении террористических актов. Available at: <http://mirznani.com/a/23063/vzryvnye-veschestva-i-vzryvnye-ustroystva-primenyaemye-pri-sovershenii-terroristicheskikh-aktov>.
3. Федеральный закон от 21.07.1997 № 116-ФЗ (ред. от 07.03.2017) «О промышленной безопасности опасных производственных объектов» (с изм. и доп., вступ. в силу с 25.03.2017). Available

- at: Доступ из справ.-правовой системы «Консультант Плюс».
4. Об экологической чистоте взрывчатых веществ. Available at: <http://mirznani.com/a/10955/ob-ekologicheskoy-chistote-vzryvchatykh-veschestv>.
  5. Филатов Б.Н., Британов Н.Г., Кирюхин В.В., Масленников А.А., Точилкина Л.П., Клаучек В.В. Разработка стандартов безопасности после деkontаминации поверхностей помещений, загрязненных в результате химических чрезвычайных ситуаций. Химическая и биологическая безопасность. 2007; 6 (36): 3–9.
  6. Филатов Б.Н., Британов Н.Г., Точилкина Л.П., Жуков В.Е., Масленников А.А., Игнатенко М.Н., Волчек К. Регла-

- менты деkontаминации поверхностей, загрязненных в результате химических чрезвычайных ситуаций (концептуальные подходы). Медицина труда и промышленная экология. 2011;7: 37–42.
7. Пиротехника. Справочник по взрывчатым веществам, порохам и пиротехническим составам. М.: Издание 6; 2008.
  8. МР № 2609 – Методические рекомендации по обоснованию ПДК химических веществ в почве. изд. 2-е. М.: 1982.
  9. Гончарук Е.И., Сидоренко Г.И. Гигиеническое нормирование химических веществ в почве. Руководство. М.: Медицина; 1986.
  10. Звягинцев Д.Г., ред. Методы почвенной микробиологии и биохимии. М.:

- Изд-во Моск. Ун-та; 1980.
11. Елинов Н.П., Заикина Н.А., Соколова И.П.; Елинова Н.П., ред. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. Учебное пособие. М.: Медицина; 1988.
  12. Сидоренко Г.И., ред. Методы санитарно-микробиологического исследования объектов окружающей среды. М.: Медицина; 1978.
  13. Демидова С.А., Максимова Е.Ю., Масленников А.А., Юдина Е.В. Экспериментальная оценка токсического влияния отравляющих веществ кожно-нарывного и нервно-паралитического действия на микробиоценоз почвы. Токсикологический вестник. 2006; 2: 10-14.

## REFERENCES:

1. Explosive substances - basic concepts, application, classification. Available at: <http://fb.ru/article/47526/vzryvchatyie-veschestva---osnovnyie-ponyatiya-primenenie-klassifikatsiya> (accessed 26 May 2018).
2. Explosives and explosive devices used in terrorist acts. Available at: <http://mirznani.com/a/23063/vzryvnye-veschestva-i-vzryvnye-ustroystva-primenyaemye-pri-sovershenii-terroristicheskikh-aktov> (accessed 30 May 2018).
3. Federal Law No. 116-FZ of 21.07.1997 (as amended on 07.03.2017) "On the Industrial Safety of Hazardous Production Facilities" (as amended and supplemented, entered into force on 25.03.2017). Available at:

- Access from the Legal System "Consultant Plus".
4. On the environmental cleanliness of explosives. Available at: <http://mirznani.com/a/10955/ob-ekologicheskoy-chistote-vzryvchatykh-veschestv> (accessed 30 May 2018).
  5. Filatov B.N., Britanov N.G., Kiryukhin V.V., Maslennikov A.A., Tochilkina L.P., Klauček V.V. Development of decontamination safety standards for room surfaces contaminated after chemical emergencies. *Khimicheskaya i biologicheskaya bezopasnost*. 2007; 6 (36): 3–9 (in Russian).
  6. Filatov B.N., Britanov N.G., Tochilkina L.P., Zhukov V.E., Maslennikov A.A., Ignatenko M.N., Volchek K. Regulations

- for decontamination of surfaces contaminated by chemical emergencies (conceptual approaches). *Meditsina труда i promyshlennaya ekologiya*. 2011;7: 37–42 (in Russian).
7. Piropravka. Explosives, gunpowder and pyrotechnic compounds manual. М.: Издание 6; 2008 (in Russian).
  8. МР № 2609 – Methodical recommendations on MPC substantiation of chemical substances in soil. изд. 2-е. М.: 1982 (in Russian).
  9. Goncharuk E.I., Sidorenko G.I. Hygienic regulation of chemicals in soil. Manual. М.: Meditsina; 1986 (in Russian).
  10. Zvyagintsev D.G., ed. Methods of soil microbiology and biochemistry. М.:

- Izdatelstvo Mosk. Un-ta; 1980 (in Russian).
11. Elinov N.P., Zaikina N.A., Sokolova I.P.; Elinov N.P., ed. Manual for laboratory studies in microbiology. Tutorial. М.: Meditsina; 1988 (in Russian).
  12. Sidorenko G.I., ed. Methods for sanitary-microbiological examination of environmental objects. М.: Meditsina; 1978 (in Russian).
  13. Demidova S.A., Maksimova E.YU., Maslennikov A.A., YUdina E.V. Experimental assessment of the toxic effect of blister-nasal and nerve-paralytic chemical agents on the soil microbiocenosis. *Toksikologicheskii vestnik*. 2006; 2: 10-14 (in Russian).

A.A. Maslennikov, S.A. Demidova

## EXPERIMENTAL ASSESSMENT OF TOXIC EFFECTS OF TROTYL (TNT) ON SOIL MICROFLORA

Research Institute of Hygiene, Toxicology and Occupational Pathology, Federal Medical and Biological Agency, 400048, Volgograd, Russian Federation

An experimental assessment of the hazard of trotyl content in the soil has been carried out according to one of the most significant sanitary indicators of harm - the microbiocenosis. *E. coli*, micromycetes, actinomycetes and saprophytic bacteria grown up in the specific to each microflora medium were used as test organisms. It was found that the content of the toxicant in the soil at the levels of 20.0 and 10.0 mg/kg during the experiment revealed a significant growth of *E. coli* (up to 458.87 % relative to the control) indicating the inhibition of the process of self-purification of the soil. In addition, TNT in these concentrations contributed to a significant growth of micromycete colonies (up to 200.00%) indicating its accumulation in the soil, where fungi act as indicators (toxin accumulators). At the same time the substance at the level of 20.0 mg/kg caused inhibition of vital activity of actinomycetes reaching 50.27 %. The number of colonies of saprophytic microflora also significantly decreased in the soil mixture with the content of the chemical at the levels of 20.0 and 10.0 mg/kg. According to this type of general health hazard indicator the concentration of TNT – 10.0 mg/kg has been accepted as a threshold, and the value of 2.0 mg/kg – as inactive. The data obtained are taken into account in the subsequent development of the hygienic standard for this explosive compound.

**Keywords:** trotyl, soil, microbiocenosis, toxic effect, threshold and inactive concentration.

Переработанный материал поступил в редакцию 14.11.2018 г.