

Н. В. Дудчик, С. И. Сычик, О. А. Емельянова

Научно-практический центр гигиены, Минск, Республика Беларусь

ТЕСТ-МОДЕЛЬ ОЦЕНКИ ИНТЕГРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПОЧВ, КОНТАМИНИРОВАННЫХ СОЛЯМИ ЦИНКА

Аннотация. Проведена оценка интегрального токсического воздействия нитратом цинка с использованием количественной популяционной тест-модели. Обосновано применение биомаркера и биоиндикатора для оценки биологического действия контаминанта. Показано, что применение солей цинка в изученном диапазоне концентраций ингибирует дегидрогеназную активность тест-культур, при этом отмечается сильная отрицательная корреляция. Токсическое воздействие нитратом цинка приводило к увеличению продолжительности лаг-фазы в развитии популяции тест-культур в системе периодического культивирования, при этом выявлена сильная положительная корреляция. Коэффициенты детерминации изученных параметров были наиболее высокими для тест-модели *Rhodococcus sp.* ЦГ 4, что подтверждает адекватность этой тест-модели и возможность ее использования для прогноза содержания цинка в почве по изменению биоиндикаторов и биомаркеров.

Ключевые слова: количественная популяционная модель, оценка токсических эффектов, биоиндикаторы, биомаркеры

Для цитирования: Дудчик, Н. В. Тест-модель оценки интегральной токсичности почв, контаминированных солями цинка / Н. В. Дудчик, С. И. Сычик, О. А. Емельянова // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2017. – № 4. – С. 52–57.

N. V. Dudchik, S. I. Sychik, O. A. Emeljanova

Scientific and Practical Center of Hygiene, Minsk, Republic of Belarus

TEST MODEL FOR THE ASSESSMENT OF CUMULATIVE TOXICITY OF SOIL CONTAMINATED WITH SALTS OF ZINC

Abstract. The integral toxic effect of zinc nitrate on the quantitative population-based test model was evaluated. In the model experiment, a biomarker and a bioindicator for evaluating the biological effect of the contaminant are substantiated. It was shown that zinc salts in the studied concentration range inhibited the dehydrogenase activity of test cultures, while the dependence was negative with a strong correlation. The toxic effect of zinc nitrate led to an increase in the lag-phase test cultures population duration in the periodic system, with a strong positive correlation. The coefficients of determination of these parameters were the highest for the test model of *Rhodococcus sp.* CG 4, which confirms the adequacy of the test model, which can be used to predict the content of zinc in the soil by changing bioindicators and biomarkers.

Keywords: quantitative population model, toxic effects evaluation, bioindicators, biomarkers

For citation: Dudchik N. V., Sychik S. I., Emeljanova O. A. Test model for the assessment of cumulative toxicity of soil contaminated with salts of zinc. *Vesti Natsyonal'noi akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 4, pp. 52–57 (in Russian).

Введение. В настоящее время техногенное загрязнение почв тяжелыми металлами является одной из важнейших медико-биологических проблем. Системный анализ содержания тяжелых металлов в почвах Республики Беларусь в 2013–2014 гг. выявил, что в наибольшем количестве проб с превышением гигиенических нормативов выявлены цинк и свинец. Максимальное содержание цинка на уровне 2,8–3,0 ОДК выявлено в Минске и поселке Красносельский Гродненской области. Наибольшие площади загрязнения отмечены в Новолукомле, поселке Красносельский и Минске (22,2–32,3 % изученных территорий) [1, 2].

В почвах придорожных полос также обнаружено высокое валовое содержание цинка – от 8,86 до 41,05 мг/кг, при этом максимальное загрязнение почв валовыми и подвижными формами цинка установлено на расстоянии 5–25 м от полотна дороги. В этой зоне содержание подвижных форм цинка превышало величину ПДК, составив 23 мг/кг [3, 4]. Анализ степени загрязнения городских почв тяжелыми металлами показал, что среднее содержание цинка в почвах Беларуси составляет 35,0 мг/кг [5].

В работах ряда авторов установлено, что почва является своеобразной «ловушкой» для тяжелых металлов, попадающих из воздуха и отходов, что определяет ассоциированные токсические воздействия на почвенные флору, фауну и микробиоту. Ингибирование роста, индукция ферментов, продукция стрессовых белков весьма важны в качестве «конечных точек» для определения токсических воздействий [6–15].

Кинетика ингибирования химическими факторами развития и роста биологических популяций сложна и недостаточно разработана. Ранее нами показано, что импедиметрическое выявление особенностей развития популяции микроорганизмов в условиях периодической культуры, дополненное метаболическими и культурально-морфологическими маркерами, является перспективным для количественного определения зависимости «доза–эффект» в условиях токсического воздействия. Использование импедансной технологии дает возможность изучить параметры динамических моделей, в том числе детекцию степени ингибирования или стимулирования роста популяции тест-культуры химическими контаминантами в режиме реального времени [7–11].

Цель работы – разработать популяционную тест-модель для оценки токсического воздействия солей цинка.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования были образцы почв, экспериментально контаминированные нитратом цинка для разработки и валидации популяционной тест-модели оценки его токсического воздействия. Предварительный химический анализ почв подтвердил, что содержание тяжелых металлов, в том числе цинка, не превышало гигиенических нормативов.

В качестве тест-культур использовали чувствительные почвенные микроорганизмы *Azotobacter sp.* БИМ-74, *Arthrobacter sp.* ЦГ 1, *Rhodococcus sp.* ЦГ 4.

В работе использовали стандартные средства измерений и основное оборудование микробиологических лабораторий, которые были должным образом проверены и калиброваны. Импедиметрические исследования по определению длительности лаг-фазы проводили на микробиологическом анализаторе BacTrac 4300 (SY-LAB, Австрия), экзогенную дегидрогеназную активность тест-штаммов оценивали по методике, приведенной в работе [9].

Статистическую обработку результатов осуществляли в пакете статистических программ STATISTICA 10, SPSS13 for Windows. Критический уровень значимости p при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05. Для количественной оценки направленности взаимосвязи между переменными проводили корреляционный анализ, а для количественного определения вида математической функции в причинно-следственной зависимости между переменными величинами – парный регрессионный анализ (метод наименьших квадратов). Для оценки силы связи корреляции r использовали шкалу Чеддока: слабая – от 0,1 до 0,3; умеренная – от 0,3 до 0,5; заметная – от 0,5 до 0,7; высокая – от 0,7 до 0,9; весьма высокая (сильная) – от 0,9 до 1,0. Степень соответствия трендовой модели исходным данным оценивали по коэффициенту достоверности аппроксимации R^2 (коэффициент детерминации), нормированному от 0 до 1.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных исследований установлено, что токсическое воздействие нитратом цинка приводит к увеличению продолжительности лаг-фазы от 4,2 до 45,0 ч для *Azotobacter sp.* БИМ-74, от 7,5 до 110,0 ч для *Rhodococcus spp.* ЦГ 4, от 6,7 до 22 ч для *Arthrobacter spp.* ЦГ 1.

Кроме того, кривая развития имела двухфазный характер с псевдолаг-периодом, который разделялся на две части экспоненциального роста. Известно, что двухфазный рост отражает изменение метаболизма культуры микроорганизмов при воздействии токсиканта. Изменения динамического биоиндикатора – продолжительности лаг-фазы – были статистически значимы при $p < 0,05$. Наиболее чувствительным при оценке токсических воздействий по динамическим показателям продолжительности лаг-фазы являлся штамм *Rhodococcus sp.* ЦГ 4. Проведенный корреляционно-регрессионный анализ зависимости биоиндикатора популяции *Rhodococcus sp.* ЦГ 4 в периодической культуре от концентрации токсиканта показал, что корреляции были положительными и высокими по шкале Чеддока ($r > 0,75$). Зависимости описывали с помощью линейной модели с коэффициентом детерминации $R^2 > 0,9$, что близко к функциональной зависимости (рис. 1).

Параллельно с определением динамического индикатора проводили микроскопический контроль культуры. Показано, что действие солей цинка выражалось в замедлении роста колоний,

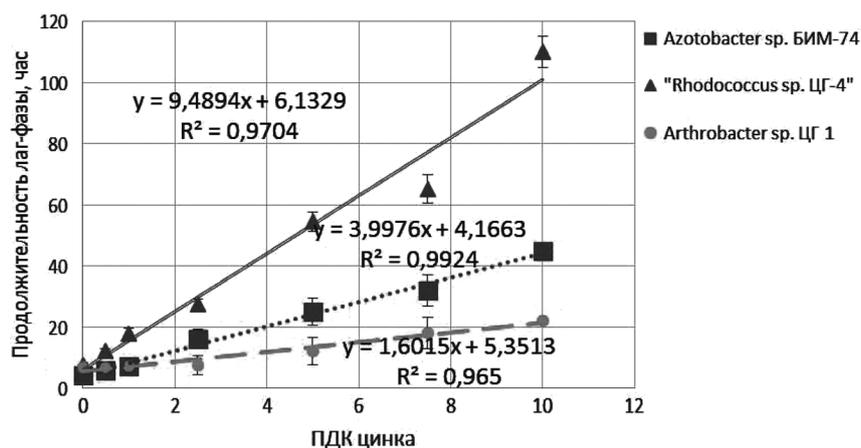


Рис. 1. Изменение продолжительности лаг-фазы развития популяции тест-штаммов в зависимости от концентрации нитрата цинка

Fig. 1. Change in the duration of the lag-phase of the development of a population of test strains depending on the concentration of zinc nitrate

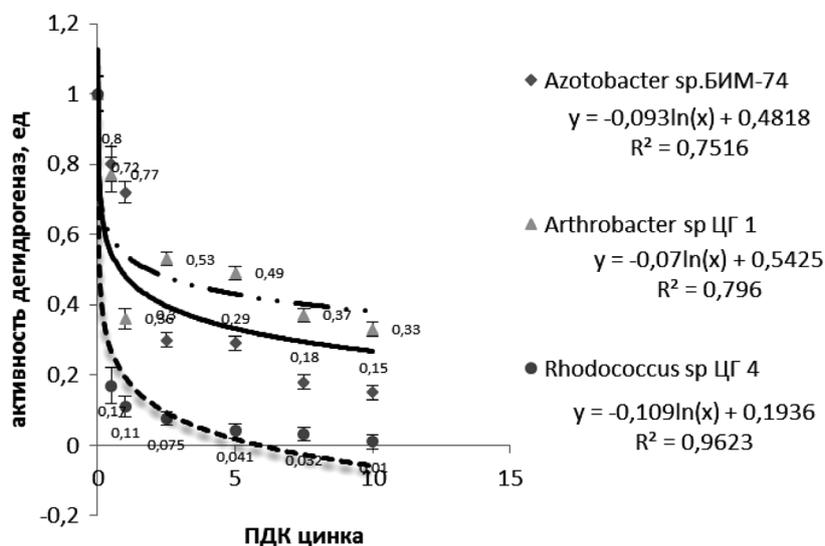


Рис. 2. Изменение активности дегидрогеназ тест-штаммов в зависимости от концентрации нитрата цинка

Fig. 2. Change in the activity of dehydrogenases of test strains as a function of the concentration of zinc nitrate

уменьшении их диаметра, изменении формы, цвета колоний, снижении способности к окрашиванию фиксированных и прижизненных препаратов тест-культур.

Данные о влиянии солей цинка в диапазоне концентраций от 0,5 до 10 ПДК цинка для почв на активность экзогенных дегидрогеназ приведены на рис. 2.

Установлено, что тест-культуры почвенных микроорганизмов имеют различную чувствительность к токсическому воздействию нитрата цинка. Регрессионно-корреляционный анализ позволил выявить, что воздействие солей цинка в указанном диапазоне концентраций ингибирует дегидрогеназную активность тест-культур, при этом зависимость носила отрицательный характер ($0,66 \leq r \leq 0,89$, что, в соответствии со шкалой Чеддока, является заметной/высокой корреляцией). Диапазон коэффициента детерминации R^2 составил 0,75–0,96, наиболее высокие значения получены для тест-модели с *Rhodococcus sp.* ЦГ 4, что подтверждает адекватность модели, которая может быть использована для прогноза содержания цинка в почве, основываясь на изменении дегидрогеназной активности тест-объекта. Высокие корреляционные связи были статистически значимы ($p < 0,05$). Наиболее чувствительным штаммом для оценки токсического действия солей тяжелых металлов по дегидрогеназной активности также являлся *Rhodococcus sp.* ЦГ 4.

В настоящее время общепризнано, что почва представляет собой структурно-экологическую нишу – единую систему с населяющими ее популяциями организмов различного систематического положения. Этот принцип положен в основу биоиндикации почв. Микробиологическая и биохимическая характеристика почв – наиболее сложные разделы почвенной биоиндикации. Почва характеризуется не только составом и численностью разных групп биоты, но и активностью биохимических процессов, обусловленных наличием определенного пула ферментов. При этом активность ферментов может служить показателем потенциальной биологической активности почвы [7]. Полученные нами данные коррелируют с результатами работ [12–15]. Показано, что химические контаминанты существенно влияют на параметры роста исследуемых штаммов микроорганизмов, приводя к сдвигам ростовых показателей, нарушениям клеточного деления, снижению накопления биомассы, появлению атипичных форм отдельных клеток и колоний. На метаболическом уровне токсическое воздействие проявлялось в нарушении энергетического обмена, изменении структуры и физико-химических свойств мембран, что приводило к необратимому разрушению ее архитектуры, вызывая диссоциацию липопротеидов и изменяя активные центры протеинов. Протяженность лаг-фазы роста при токсическом действии увеличивалась и имела выраженный двухфазный характер. Такую задержку объясняют нарушением фаз клеточного цикла, в частности задержкой фазы митоза, в результате чего наблюдается снижение митотической активности.

Изучение активности почвенных ферментов в образцах седиментов и почв из районов нескольких целлюлозоперерабатывающих производств Финляндии [12] показало увеличение активности ряда ферментов по отношению к контрольным пробам, коррелирующее также с изменением показателей микробной биомассы. Авторы предположили, что полученные в результате биосинтеза органические соединения углерода непосредственно увеличивают активность фосфоэстеразы в природных биопленках, что было подтверждено статистически значимыми результатами.

Ряд авторов связывают токсичное действие тяжелых металлов с молекулярными механизмами биотрансформации их как водорастворимых соединений, что приводит к нарушениям в механизмах дыхательной цепи, локализованных в митохондриях клеток (митохондриальные эффекты). Практически все металлы могут конкурировать за места связывания в фосфатных группах с катионами таких биологически значимых ионов, как Са и Mg. Следствием таких процессов могут быть значительные нарушения метаболизма, приводящие к необратимым последствиям и гибели клетки [13–15].

Заключение. Для оценки интегрального токсического действия цинка как одного из наиболее значимых антропогенных контаминантов почвы предложена тест-модель на основе чувствительного почвенного микроорганизма *Rhodococcus spp.* ЦГ 4 с использованием в качестве биомаркера активности экзогенных дегидрогеназ, а в качестве биоиндикатора – динамического показателя продолжительности лаг-фазы развития популяции в условиях контаминации.

Список использованных источников

1. Результаты мониторинга химического загрязнения земель (почв) населенных пунктов в 2014 году [Электронный ресурс] / Государственное учреждение «Республиканский центр по гидрометеорологии, контролю радиоактивного загрязнения и мониторингу окружающей среды» Минприроды РБ. Радиационно-экологический мониторинг. – Режим доступа: <http://rad.org.by/articles/pochva/rezultaty-monitoringa-zagryazneniya-pochv-v-2014-godu.html>. – Дата доступа: 13.03.2017.
2. Состояние природной среды Беларуси : экол. бюл., 2013 г. [Электронный ресурс] / Нац. акад. наук Беларуси, М-во природ. ресурсов и охраны окружающей среды ; под общ. ред. В. Ф. Логинова. – Минск, 2014. – Режим доступа: http://www.minpriroda.gov.by/ru/new_url_349142309-ru. – Дата доступа: 13.03.2017.
3. Рудь, А. В. Загрязнение тяжелыми металлами почв и растительности придорожных полос автодорог Минской области / А. В. Рудь // Вестн. БГУ. Сер. 2, Химия. Биология. География. – 2007. – № 1. – С. 111–114.
4. Перечень предельно допустимых концентраций (ПДК) и ориентировочно допустимых концентраций (ОДК) химических веществ в почв : гигиен. нормативы 2.1.7.12-1-2004 : утв. постановлением Гл. гос. санитар. врача Респ. Беларусь от 25 февр. 2004 г., № 28 / М-во здравоохранения Респ. Беларусь. – Введ. 2004-09-01. – Минск, 2014. – Режим доступа: <http://www.twirpx.com/file/1757308/>. – Дата доступа: 11.03.2017.

5. Позняк, С. С. Содержание тяжелых металлов Pb, Ni, Zn, Cu, Mn, Zr, Cr, Co и Sn в почвах Центральной зоны Республики Беларусь [Электронный ресурс] // Экономика и экологический менеджмент. – 2011. – № 1. – Режим доступа: <http://economics.open-mechanics.com/articles/307>. – Дата доступа: 28.04.2017.
6. Гигиенические критерии интегральной оценки опасности загрязнения почв населенных пунктов / А. И. Котеленец [и др.] // Воен. медицина. – 2008. – № 3. – С. 79–86.
7. Дудчик, Н. В. Использование микробиотестирования при оценке токсичности химических веществ в окружающей среде / Н. В. Дудчик // Гигиена и санитария. – 2009. – № 1. – С. 84–87.
8. Дудчик, Н. В. Кинетические и культурально-морфологические особенности чувствительных культур микроорганизмов при токсическом воздействии / Н. В. Дудчик, В. П. Филонов, И. П. Щербинская // Мед. журн. – 2010. – № 3. – С. 1431–1445.
9. Оценка цитотоксического действия солей свинца с использованием ферментных тест-систем / Н. В. Дудчик [и др.] // Здравоохранение. – 2010. – № 11. – С. 45–48.
10. Дудчик, Н. В. Альтернативные биологические тест-модели в оценке риска воздействия факторов среды обитания / Н. В. Дудчик, Е. В. Дроздова, С. И. Сычик. – Минск : Белорус. науч.-исслед. ин-т трансп. «Транстехника», 2015. – 194 с.
11. Дудчик, Н. В. Экспериментальная оценка интегральной токсичности объектов среды обитания с использованием количественной популяционной тест-модели / Н. В. Дудчик // Здоровье и окружающая среда : сб. науч. тр. / Науч.-практ. центр гигиены. – Минск, 2015. – Т. 1, вып. 25. – С. 32–37.
12. Ahtiainen, J. Microbiological tests and measurements in the assessment of harmful substances and pollution [Electronic resources] / J. Ahtiainen. – Helsinki : Finn. Environment Inst., 2002. – Mode of access: <http://www.ymparisto.fi/eng/orginfo/publica/electro/mb22/mb22.htm>. – Date of access: 28.02.2017.
13. Bispo, A. Toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by poly-cyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) / A. Bispo, M. J. Jourdain, M. Jauzein // Organic Geochemistry. – 1999. – Vol. 30, iss. 8, pt. 2. – P. 947–952.
14. Jo, I. S. Chemical changes in agricultural soils of Korea: data review and suggested countermeasures / I. S. Jo, M. H. Koh // Environmental Geochemistry and Health. – 2004. – Vol. 26, iss. 2/3. – P. 105–117.
15. Metal-induced stress in bivalves living along a gradient of Cd contamination: relating sub-cellular metal distributions to population-level responses / O. Perceval [et al.] // Aquatic Toxicology. – 2004. – Vol. 69, iss. 4. – P. 327–345.

References

1. Results of monitoring of chemical contamination of lands (soils) of settlements in 2014. *Gosudarstvennoe uchrezhdenie “Respublikanskii tsentr po gidrometeorologii, kontroliu radioaktivnogo zagryazneniia i monitoringu okruzhaiushchei sredy” Minprirody RB. Radiatsionno-ekologicheskii monitoring* [State institution “Republican Center for Hydrometeorology, Control of Radioactive Contamination and Environmental Monitoring” of the Ministry of Natural Resources of the Republic of Belarus. Radiation-ecological monitoring]. Available at: <http://rad.org.by/articles/pochva/rezultaty-monitoringa-zagryazneniya-pochva-2014-godu.html> (accessed 13.03.2017) (in Russian).
2. The state of the natural environment of Belarus: the environmental bulletin of 2013, The National Academy of Sciences of Belarus, the Ministry of Natural Resources and Environmental Protection, in V. F. Loginov (ed). http://www.minpriroda.gov.by/ru/new_url_349142309-ru (accessed 13.03.2017) (in Russian).
3. Rud’ A. V. Heavy metals pollution of soils and vegetation of roadsides of motor roads in Minsk region. *Vestnik BGU. Seriya 2, Khimiia. Biologiya. Geografiia* [Bulletin of BSU. Series 2, Chemistry. Biology. Geography], 2007, no. 1, pp. 111–114 (in Russian).
4. *The list of maximum permissible concentrations (MPC) and approximately permissible concentrations (ODC) of chemical substances in soils*: hygienic standards 2.1.7.12-1-2004: approved by the Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Republic of Belarus of February 25, 2004, No. 28, Ministry of Health of the Republic Belarus. Minsk, 2004. Available at: <http://www.twirpx.com/file/1757308/> (accessed 11.05.2017) (in Russian).
5. Poznyak S. S. The content of heavy metals Pb, Ni, Zn, Cu, Mn, Zr, Cr, Co and Sn in the soils of the Central zone of the Republic of Belarus. *Ekonomika i ekologicheskii menedzhment* [Economics and environmental management], 2011, no. 1. Available at: <http://economics.open-mechanics.com/articles/307> (accessed 28.04.2017) (in Russian).
6. Kotelenets A. I., Zen’kevich V. V., Voitovich A. M., Dudchik N. V., Druzhinina E. S., Marusich N. I., Kremko L. A., Gomolko T. N. Hygienic criteria for an integrated assessment of the danger of soil contamination in settlements. *Voennaya medicina* [Military Medicine], 2008, no. 3, pp. 79–86 (in Russian).
7. Dudchik, N. V. Use of microbiotesting to evaluate the toxicity of chemical substances in the environment. *Gigiena i sanitariya* [Hygiene and sanitation], 2009, no. 1, pp. 84–87 (in Russian).
8. Dudchik N. V., Filonov V. P., Shcherbinskaya I. P. Kinetic and cultural-morphological features of sensitive cultures of microorganisms under toxic effects. *Meditniskii zhurnal* [Medical Journal], 2010, no. 3, pp. 1431–1445 (in Russian).
9. Dudchik N. V., Shcherbinskaia I. P., Treilib V. V., Ianetskaia S. A., Budkina E. A., Shedikova O. E. Evaluation of the cytotoxic effect of lead salts using enzyme test systems. *Zdravookhranenie* [Healthcare], 2010, no. 11, pp. 45–48 (in Russian).
10. Dudchik N. V., Drozdova E. V., Sychik S. I. *Alternative biological test-models in the risk assessment of environmental factors*. Minsk, Belarusian Research Institute of Transport “Transtekhnika” Publ., 2015, 194 p. (in Russian).
11. Dudchik N. V. Experimental assessment of integrated toxicity of habitat objects using a quantitative population-based test model. *Zdorov’e i okruzhayushchaya sreda* [Health and Environment], 2015, vol. 1, no. 25, pp. 32–37 (in Russian).

12. Ahtiainen J. *Microbiological tests and measurements in the assessment of harmful substances and pollution*. Helsinki, Finn. Environment Inst., 2002. Available at: <http://www.ymparisto.fi/eng/orginfo/publica/electro/mb22/mb22.htm> (accessed 28.02.2017).

13. Bispo A., Jourdain M. J., Jauzein M. Toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by poly-cyclic aromatic hydrocarbons. *Organic Geochemistry*, 1999, vol. 30, iss. 8, pt. 2, pp. 947–952.

14. Jo I. S., Koh M. H. Chemical changes in agricultural soils of Korea: data review and suggested countermeasures. *Environmental Geochemistry and Health*, 2004, vol. 26, iss. 2/3, pp. 105–117.

15. Perceval O., Couillard Y., Pinel-Alloul B., Giguère A., Campbell P. G. Metal-induced stress in bivalves living along a gradient of Cd contamination: relating sub-cellular metal distributions to population-level responses. *Aquatic Toxicology*, 2004, vol. 69, iss. 4, pp. 327–345.

Информация об авторах

Дудчик Наталья Владимировна – д-р биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. Научно-практический центр гигиены (ул. Академическая, 8, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: n_dudchik@mail.ru.

Сычик Сергей Иванович – канд. мед. наук, доцент, директор. Научно-практический центр гигиены (ул. Академическая, 8, 220012, г. Минск, Республика Беларусь).

Емельянова Ольга Андреевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Научно-практический центр гигиены (ул. Академическая, 8, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lee616@ya.ru.

Information about the authors

Natalia V. Dudchik – D. Sc. (Biol.), Assistant Professor, Head of the Laboratory. Scientific and Practical Center of Hygiene (8, Akademicheskaya Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: n_dudchik@mail.ru.

Sergei I. Sychik – Ph. D. (Med.), Assistant Professor, Director. Scientific and Practical Center of Hygiene (8, Akademicheskaya Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus).

Olga A. Emeljanova – Ph. D. (Biol.), Senior researcher. Scientific and Practical Center of Hygiene (8, Akademicheskaya Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lee616@ya.ru.