



Донерьян Л.Г., Водянова М.А.

Оценка влияния компонентов противогололёдных материалов на одноклеточные организмы на примере *Tetrahymena pyriformis*

ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью»
Федерального медико-биологического агентства, 119121, Москва, Российская Федерация

Введение. Противогололёдные материалы (ПГМ) имеют технические рекомендации по применению с целью обеспечения безопасности дорожного движения, однако не имеют нормативных величин, регламентирующих их допустимые уровни для объектов окружающей среды и здоровья населения, также отсутствуют методические указания по оценке их токсических свойств. В работе показано, что для решения практических целей необходимо научно обосновать методологию гигиенической оценки ПГМ как отдельной группы веществ с учётом их эффективных концентраций, в частности с применением методов биотестирования. ПГМ представляют собой солевые растворы, в связи с чем для прогноза их влияния на биологические объекты стоит рассматривать в качестве модели клетку или одноклеточный организм. Однако методика по оценке токсичности объектов окружающей среды с использованием инфузорий *Tetrahymena pyriformis* утверждена только для вод хозяйственно-питьевого водоснабжения. **Цель исследования** — актуализация методики определения токсичности растворов ПГМ по генеративной функции инфузорий *Tetrahymena pyriformis* с учётом повышенного соледержания, актуальной в рамках комплексной гигиенической оценки реагентов.

Материалы и методы. В работе проводилась экотоксикологическая оценка 2 противогололёдных материалов с различным соотношением хлоридов щелочных и щелочноземельных металлов, а также оценка фактического химического состава этих же реагентов с помощью масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС) и ионной хроматографии.

Результаты. Получены данные, свидетельствующие о менее выраженной токсичности ПГМ с повышенным содержанием ионов кальция. Определены допустимые уровни воздействия ПГМ на изученный тест-объект. Предложен контрольный образец сравнения.

Заключение. Полученные результаты указывают на необходимость расширения перечня контролируемых показателей в существующей методике. Для оценки токсичности солевых растворов с помощью инфузорий актуальными дополнениями являются: изучение морфологии клеток в условиях острого опыта (6 ч), в случае их гибели в течение первого часа необходимо контролировать их вторичное появление.

Ключевые слова: противогололёдные материалы; экотоксикологическая оценка; хлориды; инфузории; простейшие; перифитон; осмотический стресс; ионный стресс

Для цитирования: Донерьян Л.Г., Водянова М.А. Оценка влияния компонентов противогололёдных материалов на одноклеточные организмы на примере *Tetrahymena pyriformis*. *Гигиена и санитария*. 2021; 100 (4): 411-416. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-4-411-416>

Для корреспонденции: Водянова Мария Александровна, канд. биол. наук, учёный секретарь ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, 119121, Москва. E-mail: mvodyanova@cspnmz.ru

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Работа проведена в рамках государственного задания ФГБУ «ЦСП» ФМБА России.

Участие авторов: Донерьян Л.Г. — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материалов, сбор литературных данных, написание текста, редактирование; Водянова М.А. — сбор литературных данных, обработка материалов, написание текста, редактирование. Все авторы — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Поступила 19.10.2020 / Принята к печати 10.03.2021 / Опубликована 18.05.2021

Larisa G. Donerian, Mariia A. Vodyanova

Estimation of the influence of deicing materials influence on single-cell organisms: a case study of *Tetrahymena pyriformis*

Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, FMBA, Moscow, 119121, Russian Federation

Introduction. Deicing materials (DIM) have technical recommendations for the application to ensure road safety. However, they do not have shared values governing their permissible levels for environmental objects and public health. There are no guidelines for assessing their toxic properties either. The research shows that to solve practical goals, it is necessary to scientifically substantiate the methodology of hygienic assessment of DIMs as a separate group of substances, taking into account their effective concentrations bio testing methods. DIM are saline solutions, and therefore it is worth considering a cell or a unicellular organism as a model to predict their effect on biological objects. However, the methodology for assessing environmental objects' toxicity using *Tetrahymena pyriformis* ciliates has been approved only for domestic water supply.

The purpose of this study is to update the methodology for determining the toxicity of DIM solutions by the generative function of *Tetrahymena pyriformis* ciliates. It considers the high salt content appropriate within the framework of a comprehensive hygienic assessment of reagents.

Materials and methods. The research made an ecotoxicological assessment of 2 deicing materials with different ratios of chlorides of alkali and alkaline-earth metals and evaluating the same reagents' actual chemical composition using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and ion chromatography.

Results. The obtained data indicated less pronounced toxicity of DIM with increased content of calcium ions. The permissible levels of DIM influence on the studied test object have been determined. A control comparison sample is provided.

Conclusion. The obtained results specify the need to expand the list of controlled indices in the existing methodology. To assess the toxicity of saline solutions using ciliates, the substantial additions must include studying the morphology of cells in the acute experiment (6 hours), in case of their death within the first hour; it is necessary to control their secondary appearance.

Keywords: deicing materials; ecotoxicological assessment; chlorides; ciliates; protozoa; periphyton; osmotic stress; ionic stress

For citation: Donerian L.G., Vodyanova M.A. Estimating deicing materials influence on single-cell organisms: a case study of *Tetrahymena Pyriformis*. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2021; 100 (4): 411-416. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-4-411-416> (In Russ.).

For correspondence: Mariia A. Vodyanova, MD, Ph.D., Scientific secretary of the Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, 119121, Russian Federation. E-mail: mvodyanova@cspnmz.ru

Information about authors:Donerian L.G., <http://orcid.org/0000-0002-9718-0663>; Vodyanova M.A., <http://orcid.org/0000-0003-3350-5753>**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.**Acknowledgment.** The work was carried out within the framework of the state assignment of the Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, 119121, Russian Federation.**Contribution of the authors:** Donerian L.G. — the concept and design of the study; writing the text; collection and processing of material; a collection of literature data; editing; Vodyanova M.A. — writing the text; collection and processing of material; collection of literature data; editing. All co-authors — approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article..

Received: October 19, 2020 / Accepted: March 10, 2021 / Published: May 18, 2021

Введение

Россия находится на территории, подверженной в зимний период воздействию отрицательных температур. В это время на дорогах возникает зимняя скользкость, связанная с замерзанием воды или влаги из воздуха. Вследствие образования гололёда, инея, уплотнённого снега, неровностей и снежного наката происходит увеличение сопротивления движению, расхода топлива, а также снижение скорости и пропускной способности автомобильных дорог [1]. В связи с этим использование противогололёдных материалов (ПГМ) в крупных городах России целесообразно и всё время возрастает, этому также способствуют увеличение количества и протяжённости магистралей, резкие колебания в температурном режиме и длительности зимнего периода. Все применяемые ПГМ имеют свои положительные и отрицательные стороны. Идеальных реагентов не существует. Выбор оптимального реагента для конкретных условий возможен только после всестороннего анализа его физико-химических свойств и прогноза влияния на объекты окружающей среды, то есть экотоксикологической оценки. Для рекомендации реагента к использованию учитывают его основные технологические характеристики, такие как: температура замерзания, концентрация растворов и ряд других.

Противогололёдные материалы имеют технические рекомендации по применению с целью обеспечения безопасности дорожного движения, однако не имеют нормативных величин, регламентирующих их допустимые уровни для объектов окружающей среды и здоровья населения, также отсутствуют методические указания по оценке их токсических свойств [2]. В связи с этим необходимо научно обосновать методологию гигиенической оценки ПГМ как отдельной группы веществ с учётом их эффективных концентраций, обеспечивающих выполнение требований безопасности дорожного движения.

Эффективными и недорогими противогололёдными реагентами (ПГР) являются хлориды щелочных и щелочноземельных металлов. В частности, широкое распространение получили хлористые соли натрия (NaCl), кальция (CaCl_2) и магния (MgCl_2). Температура замерзания их водных растворов ниже температуры замерзания воды. При рассыпании соли по поверхности ледяного слоя начинается образование плёнок рассола вокруг кристаллов соли, а лёд тает. Основным компонентом тепловыделяющих ПГМ является безводный хлористый кальций CaCl_2 , который имеет преимущества перед NaCl и KCl : наибольшая скорость проникновения соли в лёд при всех температурах от -4 до -18 °C; наибольшая скорость таяния льда. Растворение хлорида кальция происходит быстрее, чем хлорида натрия. Хлорид кальция гигроскопичен, при температуре воздуха от 0 до -9 °C он абсорбирует влагу, пока не растворится при влажности воздуха 42% и выше, в то время как NaCl начинает абсорбировать влагу только при влажности 76% и выше [3]. Следует отметить, что состав ПГМ и физико-химические характеристики принципа его действия должны быть учтены при изучении его биологической активности.

Для каждого объекта окружающей среды существует специфика оценки с учётом механизма поступления токсикантов и их миграционных свойств. Для экотоксикологической оценки, то есть для оценки влияния вещества на элементы окружающей среды, активно используются тест-

организмы (тест-объекты) различного уровня организации [4]. По определению Л.П. Брагинского, «тест-объекты — это «датчики» сигнальной информации о токсичности среды и заменители сложных химических анализов, позволяющие оперативно констатировать факт токсичности (ядовитости, вредности) водной среды, независимо от того, обусловлена ли она наличием одного точно определяемого аналитически вещества или целого комплекса аналитически не определяемых веществ [5].

Поскольку противогололёдные реагенты представляют собой солевые растворы, то для прогноза их влияния на биологические объекты стоит рассмотреть в качестве модели клетку или одноклеточный организм. Водоросли и одноклеточные организмы часто используются в качестве моделей для раскрытия основных биологических процессов, учитывающих осмотическое давление на клеточном уровне [6].

В литературе показаны специфические ответные реакции на влияние солевых растворов со стороны различных биологических объектов [7–9]. Чрезмерная концентрация NaCl в окружающей среде может вызвать неблагоприятное воздействие на растения и микроводоросли. Увеличение солёности даже в небольших концентрациях оказывает тормозящее влияние на рост водорослей *Chlamydomonas reinhardtii* и может приводить к серьёзным повреждениям микробиома. Успешная адаптация растений к длительному стрессу засоления, или ионному стрессу, требует сложных клеточных перестроек на разных уровнях молекулярных, биохимических и физиологических процессов. Установлено, что кратковременное воздействие повышенных концентраций соли не влияет на активность внеклеточного фермента перифитона, но может временно уменьшать его фотосинтетическую активность. Вместе с тем проведённые исследования по оценке влияния ПГМ на процесс митоза в корневой меристеме луков *Allium cepa* позволили выявить биологическое действие на растительную клетку в диапазоне концентраций от 2 до 10 г/л [10].

Также в качестве интегрального тест-организма может быть использована культура ресничных инфузорий *Tetrahymena pyriformis*, тестирование с помощью которой позволяет оценить воздействие токсиканта на объект как на клеточном, так и на организменном уровне. Данный тест зарекомендовал себя в различных исследованиях [11]. Кроме того, использование инфузорий в культуральной стерильной среде сводит к минимуму эффект от воздействий на тест-систему факторов внешней среды. Однако методика по оценке токсичности объектов окружающей среды с использованием инфузорий *Tetrahymena pyriformis* утверждена только для вод хозяйственно-питьевого водоснабжения.

Цель исследования — актуализация методики определения токсичности растворов ПГМ по генеративной функции инфузорий *Tetrahymena pyriformis* с учётом повышенного содержания, актуальной в рамках комплексной гигиенической оценки реагентов.

Материалы и методы

Для определения токсических свойств реагентов по генеративной функции инфузорий необходимо оценить различия в воздействии на одноклеточный организм солевых компонентов ПГМ. Для этого в работе проводилась экотоксикологическая оценка 2 противогололёдных материалов с

Химический состав исследуемых противогололёдных материалов, согласно данным производителя
Chemical composition of the studied deicing materials, according to the manufacturer's data

Наименование образца Sample name	Вид, подгруппа реагента Type, the subgroup of reagent	Агрегатное состояние Aggregate state	Характеристика химического состава (массовая доля вещества в составе ПГМ, %) Chemical characteristics of the composition (mass fraction of the substance in the composition of DIM, %)
ПГМ1 Deicing materials (DIM)1	Химический, хлоридная подгруппа Chemical, chloride subgroup	Твёрдый Solid	Реагент на основе хлористого натрия (NaCl) 75%, хлористого кальция (CaCl ₂) 25% Reagent based on sodium chloride (NaCl) 75%, calcium chloride (CaCl ₂) 25%
ПГМ2 DIM2	Химический, хлоридная подгруппа Chemical, chloride subgroup	Жидкий Liquid	Реагент на основе хлористого натрия (NaCl) 30%, хлористого кальция (CaCl ₂) 70% Reagent based on sodium chloride (NaCl) 30%, calcium chloride (CaCl ₂) 70%

различным соотношением хлоридов щелочных и щёлочно-земельных металлов (далее – ПГМ1 и ПГМ2). Заявленный производителем химический состав исследуемых реагентов представлен в табл. 1. В работе также проводили исследование по оценке фактического химического состава этих же реагентов. Анализ ПГМ проводили с использованием 2 аналитических методов: масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС) и ионной хроматографии^{1,2}.

Для оценки возможного влияния ПГМ на одноклеточный организм был взят расширенный диапазон концентраций от 0,5 до 20 г/л. Максимальная изученная концентрация (20 г/л) соответствует минимальной норме расхода реагента, согласно действующей на территории г. Москвы технологии зимнего содержания дорог³.

Используемый тест-организм относится к классу *Ciliata*, подклассу *Holotriha*, отряду *Hymenostomata*, *Tetrahymena pyriformis*. Клетка имеет равномерный ресниччатый покров, размножается делением каждые 2,5–6 ч. В качестве контроля использовали культуруальную среду УСД (углеводно-солевую дрожжевую), разбавленную в 10 раз.

Генеративная (рост и размножение) функция инфузорий оценивалась в соответствии с Методическими рекомендациями по применению методов биотестирования для оценки качества воды в системах хозяйственно-питьевого водоснабжения⁴.

В пробы объёмом 5 мл помещали по 0,05 мл культуры тетрахимен с исходной концентрацией 100–200 кл./мл. Повторность опыта – трёхкратная; время экспозиции 6 и 48 ч. В течение первых 6 ч наблюдают за выживаемостью инфузорий (острый опыт), в течение остального времени – за приростом количества инфузорий. Критерием токсического влияния является коэффициент токсичности Кт (1), отражающий отставание прироста клеток в пробах по сравнению с контролем. В норме Кт ≥ 50%. Контролем и разбавителем служила культуруальная среда, разбавленная в 10 раз.

¹ ФР.1.31.2008.01738 Методика выполнения измерений массовой концентрации катионов аммония, калия, натрия, магния, кальция и стронция в пробах питьевой, минеральной, столовой, лечебно-столовой, природной и сточной воды методом ионной хроматографии (Свидетельство об аттестации МВИ № 18-08 от 04.03.2008 г.).

² ФР.1.31.2008.01724 Методика выполнения измерений массовой концентрации фторид-, хлорид-, нитрат-, фосфат- и сульфат-ионов в пробах питьевой, минеральной, столовой, лечебно-столовой, природной и сточной воды методом ионной хроматографии (Свидетельство об аттестации МВИ № 19-08 от 04.03.2008 г.).

³ Технология зимней уборки проезжей части, магистралей, улиц, проездов и площадей (объектов дорожного хозяйства г. Москвы) с применением противогололёдных реагентов и гранитного щебня фракции 2–5 мм (на зимние периоды с 2010–2011 гг. и далее).

⁴ МР № ЦОС ПВ Р005-95. Методические рекомендации по применению методов биотестирования для оценки качества воды в системах хозяйственно-питьевого водоснабжения. Утверждён: Госстандарт России, 12.10.1995 г.

$$K_t = \frac{N_{\text{кон}} - N_{\text{нач}}}{K_{\text{кон}} - K_{\text{нач}}} \cdot 100\% \quad (1),$$

где $N_{\text{нач}}$ и $N_{\text{кон}}$ – среднее количество инфузорий в начальный и конечный моменты измерения в опытном варианте, а $K_{\text{нач}}$ и $K_{\text{кон}}$ – среднее количество инфузорий в начальный и конечный моменты наблюдений в контроле.

Статистическую обработку данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты

В соответствии с фактическими данными элементного анализа в составе ПГМ1 в наибольшем количестве содержится натрий (Na⁺ 36,4%), кальций (Ca²⁺ 3,2%) и анион хлора (Cl⁻ 58,8%). Концентрация калия (K⁺) в 1 г ПГМ не более 2 мг (0,2%), серы (S) – 0,1 мг (0,01%). На долю таких металлов, как кремний (Si), магний (Mg), алюминий (Al), цинк (Zn), приходилось менее 0,01%. На долю большей части элементов, относящихся к группе «тяжёлых металлов», приходится не более 0,0001% (As, Cd, Pb, Cr, Ni, Co, Cu).

Исходя из представленных данных, преобладающим компонентом ПГМ1 является хлористый натрий (NaCl, 91%). Второй по массе компонент – хлористый кальций (CaCl₂), на долю которого в 1 г ПГМ1 приходится 8,7%. Содержание хлористого калия (KCl) незначительно – менее 0,5%.

Результаты элементного анализа ПГМ2 свидетельствуют о том, что в составе реагента в количественном отношении преобладающими элементами являются кальций (Ca 7,6%), натрий (Na 3,2%) и хлор (Cl 16,5%), массовая доля Mg²⁺ – 0,01%. На долю тяжёлых металлов (Zn, As, Cr, Ni, Cu, Cd, Pb) приходится менее 0,0001% (по массе).

В табл. 2 представлены концентрации растворов ПГМ1 и ПГМ2, токсичность которых оценивали в рамках экотоксикологических исследований методом биотестирования, а также содержание основных компонентов в виде NaCl и CaCl₂, ионов Na⁺, Ca²⁺, Cl⁻ в тестируемых растворах.

Как видно из табл. 2, инфузории были чувствительны к реагенту ПГМ1 практически во всех концентрациях, прирост клеток и индекс токсичности (Кт) начинали отставать от контроля уже с минимальных концентраций (1 г/л), при этом отрицательный эффект возрастал с увеличением содержания ПГМ1 в растворе. Отставание прироста клеток инфузорий в растворах ПГМ2 отмечали, начиная только с концентрации 5,6 г/л. Максимум токсического воздействия (Кт = 8%) ПГМ2 на прирост клеток инфузорий наблюдали в растворе с концентрацией 20 г/л. Результаты тестирования, представленные в таблице, выявили различное влияние на выбранный тест-организм со стороны 2 ПГМ. Все концентрации раствора ПГМ1 и некоторые разведения ПГМ2 были токсичны для тетрахимен – для их генеративной функции. При этом была высокотоксична максимальная из изученных концентраций обоих ПГМ – 20 г/л.

Таблица 2 / Table 2

Влияние основных компонентов ПГМ на жизнедеятельность инфузорий

Influence of the DIM main components on the vital activity of infusoria

Концентрация раствора ПГМ1, г/л DIM1 solution concentration, g/l	Концентрация, г/л Concentration, g/l					Коэффициент токсичности, Кт, % Toxicity coefficient, Ct, %
	NaCl	CaCl ₂	Na ⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	
0.5	0.46	0.05	0.18	0.02	0.31	51
1	0.91	0.09	0.36	0.03	0.55	45
1.5	1.35	0.14	0.55	0.05	0.91	40
2	1.80	0.19	0.73	0.06	1.20	37
2.5	2.25	0.23	0.91	0.08	1.51	34
5	4.50	0.47	1.82	0.16	2.94	29
10	9.0	0.93	3.64	0.32	3.01	21
20	18.0	1.87	7.28	0.65	12.01	0

Концентрация раствора ПГМ2, г/л The concentration of the DIM2 solution, g/l	Концентрация, г/л Concentration, g/l					Коэффициент токсичности, Кт, % Toxicity coefficient, Ct, %
	NaCl	CaCl ₂	Na ⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	
0.42	0.10	0.32	0.04	0.11	0.26	67
0.56	0.14	0.42	0.06	0.15	0.36	96
0.7	0.20	0.51	0.08	0.19	0.46	96
1.4	0.40	1.03	0.16	0.37	0.90	100
2.8	0.83	2.02	0.33	0.73	1.79	73
5.6	1.63	4.03	0.65	1.45	3.56	46
10	2.90	7.53	1.16	2.71	6.56	40
20	5.70	15.01	2.28	5.40	13.0	8

Токсические эффекты, вызванные воздействием противогололёдного материала ПГМ1, имеют статистически значимые изменения относительно контроля ($p \leq 0,05$) во всём диапазоне изученных концентраций (1–20 г/л) (табл. 3). Для ПГМ2 получены статистически значимые эффекты только в растворе с концентрацией 20 г/л (табл. 4).

Анализ данных позволяет сделать вывод о том, что раствор ПГМ1, начиная с концентрации 1 г/л, содержащий: хлорид натрия 0,91 г/л и хлорид кальция – 0,09 г/л, вызывал торможение прироста клеток инфузорий. Аналогичный раствор ПГМ2, содержащий: хлорид натрия – 0,3 г/л и хлорид кальция – 0,77 г/л, не вызывал отрицательного воздействия на рост инфузорий.

Одинаковые значения показателя токсичности $K_t = 40\%$ наблюдались при разных концентрациях реагентов. В случае ПГМ1 это была концентрация 1,5 г/л (хлорид натрия – 1,35 г/л; хлорид кальция – 0,14 г/л). Для ПГМ2 такое значение K_t достигалось при концентрации реагента 10 г/л (хлорид натрия – 2,9 г/л; хлорид кальция – 7,53 г/л). Максимальная из изученных концентраций реагентов 20 г/л оказывала на ростовую функцию инфузорий крайне негативное воздействие. В растворе ПГМ1, содержащем хлорид натрия на уровне 18 г/л и хлорид кальция – 1,87 г/л, инфузории погибали в течение первого часа наблюдений ($K_t = 0$). В растворе ПГМ2 с содержанием хлорида натрия 5,7 г/л и хлорида кальция – 15 г/л наблюдалось торможение развития инфузорий с очень слабым возвратом к ростовой функции ($K_t = 8$). Из сказанного следует, что хлорид натрия является той составляющей ПГМ, которая определяет токсическое влияние на жизнедеятельность инфузорий, а конкретнее – токсическим воздействием обладают ионы натрия, поскольку содержание ионов хлора не влияло на уровень токсичности (см. табл. 2).

Обсуждение

Традиционная методика по экотоксикологической оценке различных объектов с использованием *Tetrahymena pyriformis* сводится к анализу прироста клеток за определённый интервал времени. Проведённый эксперимент позволил выявить специфические эффекты, вызываемые солевыми растворами.

Известно, что добавление к ростовой среде инфузорий хлорида натрия в низких концентрациях (0,1–0,25 г/л) стимулирует их функциональные процессы, в частности, активацию потребления бактериального корма. Возможным объяснением является то, что в животных клетках хлорид-ион необходим для процессов фагоцитоза и лизирования поглощённых бактерий [12]. Концентрации же хлорида натрия в диапазоне 0,5–9 г/л действуют в разной степени негативно на различные процессы в клетках простейших [13]. Исследованиями зарубежных авторов установлено, что оптимальной для жизнедеятельности инфузорий *Tetrahymena thermophile* концентрацией NaCl в растворе является 2,07 г/л ($Na^+ - 0,8$ г). При концентрации NaCl на уровне 11,8 г ($Na - 4,6$ г) только 2% нормальных клеток *Tetrahymena* толерантны к солевому стрессу и способны к размножению. При этом форма адаптированных клеток в дальнейшем изменяется, становится более сферической, и их размеры уменьшаются. Уменьшение размера клеток, то есть их объёма, может приводить к их гибели, так как именно нормальный объём обеспечивает течение биологических процессов в клетке, ответственных за строительную функцию белковых структур. Инфузории, в нормальном состоянии содержащие Na^+ на уровне 0,3 г, в насыщенных растворах ($Na^+ > 0,8$ г) способны к его накоплению.

Таблица 3 / Table 3

Количественные характеристики токсических эффектов, вызванных ПГМ1, на прирост клеток *Tetrahymena pyriformis*
Quantitative characteristics of DIM toxic effects caused by DIM1 on *Tetrahymena pyriformis* cell growth

Концентрация, г/л Concentration, g/l	Время экспозиции 15 мин Ncp (σ) Exposure time 15 min N _{aver} (σ)	p t-критерий Стьюдента Student's t-test	Время экспозиции 48 ч Ncp (σ) Exposure time 48 hrs N _{aver} (σ)	p t-критерий Стьюдента Student's t-test	Прирост А, ед. Cell growth A, ea	Токсичность Кт, % Toxicity Ct, %
Контроль Control	2 (1)	—	148 (62)	—	145	100
0.5	9 (1)	0.00	83 (6)	0.05	75	51
1	7 (2)*	0.00	72 (13)*	0.03	65*	45*
1.5	7 (3)*	0.01	66 (19)*	0.02	58*	40*
2	5 (1)*	0.01	58 (10)*	0.02	54*	37*
2.5	7 (4)*	0.04	56 (6)*	0.02	49*	34*
5	6 (4)*	0.05	48 (3)*	0.01	42*	29*
10	7 (6)*	0.08	38 (12)*	0.01	31*	21*
20	0*	0.00	0*	0.00	0*	0*

Примечание. Здесь и в табл. 4: Ncp – среднее количество клеток за определённый срок экспозиции, ед.; σ – среднеквадратичное отклонение показателя Ncp; p – уровень статистической значимости отличий между опытной и контрольной группами по t-критерию Стьюдента; А – прирост численности клеток за 48-часовой период экспозиции, ед.; КТ – показатель степени снижения прироста (А) относительно контроля в %; * – значения, отражающие статистически значимые изменения относительно контроля ($p \leq 0,05$).

Note. Here and in table. 4: N_{aver} – average number of cells for a certain period of exposure, units; σ – standard deviation of the Naver index; p – is the level of statistical significance of differences between the experimental and control groups by Student's t-test; A – increase in the number of cells over a 48-hour exposure period, units; Ct – an index of the degree of a decline in gain (A) relative to control in %; * – values reflecting statistically significant changes relative to control ($p \leq 0.05$).

Таблица 4 / Table 4

Количественные характеристики токсических эффектов, вызванных ПГМ2, на прирост клеток *Tetrahymena pyriformis*
Quantitative characteristics of toxic effects caused by DIM2 on *Tetrahymena pyriformis* cell growth

Концентрация, г/л Concentration, g/l	Время экспозиции 15 мин Ncp (σ) Exposure time 15 min N _{aver} (σ)	p t-критерий Стьюдента Student's t-test	Время экспозиции 48 ч Ncp (σ) Exposure time 48 hrs N _{aver} (σ)	p t-критерий Стьюдента Student's t-test	Прирост А, ед. Cell growth A, ea	Токсичность Кт, % Toxicity Ct, %
Контроль Control	10 (4)	—	263 (29)	—	253	100
0.42	3 (1)	0.08	173 (35)	0,0000	171	67
0.56	4 (2)	0.04	251 (26)	0.49	247	97
0.7	4 (1)	0.04	245 (15)	0.00	241	96
1.4	4 (2)	0.08	277 (12)	0.00	273	108
2.8	5 (2)	0.08	200 (24)	0.00	185	73
5.6	8 (3)	0.08	124 (13)	0.00	116	46
10	6 (2)	0.13	108 (11)	0.00	102	40
20	7 (2)*	0.18	26 (6)*	0.000	20*	8*

Поскольку было установлено, что для инфузорий *Tetrahymena thermophile* нормальной в окружающей среде является концентрация хлорида натрия на уровне 2,07 г (натрия при этом 0,8 г), то, следовательно, в наших исследованиях другой вид инфузорий рода *Tetrahymena* оказался более чувствительным к хлориду натрия (при содержании натрия 0,55 г). В растворах с высокими концентрациями натрия (более 0,8 г) воздействие на оба вида инфузорий было схожим по интенсивности деления клеток (*T. pyriformis*) или по интенсивности поглощения бактериального корма (*T. thermophile*).

В проведённом эксперименте сравнительная характеристика негативного влияния ПГМ1 и ПГМ2 на генеративную функцию *Tetrahymena pyriformis* обусловлена различиями в соотношении содержания хлорида натрия и хлорида кальция в изученных реагентах. В частности, выраженная токсичность ПГМ1 наблюдалась начиная с концентрации 1,5 г/л (Na = 0,55 г/л; Ca = 0,05 г/л), для ПГМ2 – с 10 г/л

(Na = 1,16 г/л; Ca = 2,71 г/л) (см. табл. 2), хотя содержание Na⁺ и Ca²⁺ в ПГМ2 при этом значительно выше. Следовательно, ПГМ1 отличается большей токсичностью в связи с высоким содержанием NaCl в составе антигололёдной смеси и незначительным содержанием CaCl₂. Отмечено явное влияние ионов кальция на уменьшение токсического эффекта ПГМ2 по сравнению с ПГМ1. Этот эффект наблюдался и в растворах с максимальной концентрацией ПГМ: в растворе ПГМ1 инфузории погибали в первый час наблюдения, постепенно растворяясь и исчезая; в растворе ПГМ2 они практически переставали делиться, но к 48 ч начинали прорастать вследствие процесса адаптации. Защитная роль кальция была показана в наблюдениях [14–16] за сосуществованием инфузорий и бактерий в морской воде, содержащей ионы кальция и магния, в которых отмечалась большая выживаемость бактерий в связи с угнетением процесса фагоцитоза у простейших.

Данные аспекты целесообразно учитывать в работе биологической очистки сточных вод с помощью активного ила, представляющего собой консорциум простейших организмов. Увеличение концентрации соли с 3 до 10 г/л сказывалось на изменении обилия и разнообразия инфузорий, которое сократилось в 2 раза при дозе хлорида натрия 20 г/л [17–19].

Таким образом, экотоксикологическая оценка солевых растворов должна учитывать осморегуляторные процессы в клетках простейших организмов. Ионный стресс, приводящий к осмотическому, влияет на целостность мембраны, что может приводить к её разрыву и гибели клетки, поскольку мембраны большинства живых клеток являются избирательно проницаемыми, то есть пропускают определённые молекулы или ионы растворённых веществ [19–22].

Полученные в эксперименте результаты свидетельствуют о менее выраженной токсичности ПГМ2, что обусловлено повышенным содержанием ионов кальция и его значимой ролью в регуляции проницаемости клеточных мембран для ионов натрия. В клетках инфузорий поддержание ионного гомеостаза регулируется механизмом количественного взаимобмена поступления натрия в клетку и выхода из неё ионов кальция.

Заключение

Полученные результаты указывают на необходимость расширения перечня контролируемых показателей в существующей методике. Для оценки токсичности солевых растворов с помощью инфузорий актуальными дополнениями являются: изучение морфологии клеток в условиях острого опыта (6 ч), в случае их гибели в течение первого часа необходимо контролировать их вторичное появление. В этом случае необходимо оценивать подвижность, размеры и изменение скорости деления клеток. Опираясь на полученные результаты, предлагаем использовать раствор хлорида натрия в определённой концентрации в качестве контроля в эксперименте по оценке токсичности солевых растворов на одноклеточных организмах. Среда УСД (разбавленная в 10 раз), часто используемая в качестве контроля, содержит натрий в количестве 0,031 г/л. Поскольку в наших исследованиях недействующей концентрацией ПГМ1 была 0,5 г/л с содержанием хлорида натрия 0,46 г/л (Na – 0,18 г/л), то целесообразно именно эту концентрацию раствора NaCl рекомендовать для оценки растворов с повышенным солевым содержанием.

Литература

(п.п. 7–9, 12–14, 16–19, 21, 22 см. References)

- Аржанухина С.П. Сравнительный анализ эксплуатационных свойств противогололедных материалов для зимнего содержания автомобильных дорог. *Дороги и мосты*. 2011; (2): 123–38.
- Крытов И.А., Тонкопий Н.И., Водянова М.А., Русаков Н.В., Донерьян Л.Г., Евсеева И.С. и соавт. Методические подходы к обоснованию гигиенических требований к применению противогололедных материалов. *Гигиена и санитария*. 2014; 93(6): 52–4.
- Аржанухина С.П. Сравнительные демонстрационные испытания противогололедных материалов на основе хлоридов. *Строительные материалы*. 2009; (5): 14–6.
- Донерьян Л.Г., Водянова М.А. Обоснование места альтернативных биологических методов в гигиенических исследованиях. *Гигиена и санитария*. 2018; 97(11): 1093–7. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-11-1093-97>
- Дудчик Н.В., Дроздова Е.В., Сычик С.И. *Альтернативные биологические тест-модели в оценке риска воздействия факторов среды обитания*. Минск: Транстехника; 2015.
- Камкин А.Г., Киселева И.С. *Физиология и молекулярная биология мембран клеток*. М.: Академия; 2008.
- Сбитнев А.В., Водянова М.А., Сычева Л.П., Журков В.С., Крытов И.А., Ахальцева Л.В. Цитогенетическая и фитотоксическая оценка противогололедного материала на модельной тест-системе лук (*Allium cepa*). *Гигиена и санитария*. 2018; 97(2): 144–8. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-2-144-148>
- Долгов В.А., Лавина С.А., Никитченко Д.В. Оценка и взаимосвязь параметров токсичности различных веществ для инфузорий тетрахимена пириформис и белых крыс. *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: агрономия и животноводство*. 2014; (2): 58–65.
- Козел З.Л., Мазлин В.М. Противогололедные материалы. Современные требования. Опыт применения в Москве в 2001–2003 гг. Перспективы развития производства в России. Available at: <http://www.kaluoleg.narod.ru/exe/acemelt/reagent.pdf>
- Звягинцев Д.Г., Зенова Г.М. *Актиномицеты засоленных и щелочных почв*. М.: Университет; 2007.
- Arzhanukhina S.P. Comparative analysis of the performance properties of anti-icing materials for winter maintenance of roads. *Dorogi i mosty*. 2011; (2): 123–38. (in Russian)
- Kryatov I.A., Tonkopyi N.I., Vodyanova M.A., Rusakov N.V., Doner'yan L.G., Evseeva I.S., et al. Methodological approaches to substantiation of hygienic requirements for the application of deicing materials. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2014; 93(6): 52–4. (in Russian)
- Arzhanukhina S.P. Comparative demonstration tests of chloride-based deicing materials. *Stroitel'nye materialy*. 2009; (5): 14–6. (in Russian)
- Doner'yan L.G., Vodyanova M.A. Substantiation of the place of alternative biological methods in hygienic research. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2018; 97(11): 1093–7. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-11-1093-97> (in Russian)
- Dudchik N.V., Drozdova E.V., Sychik S.I. *Alternative Biological Test Models in Assessing the Risk of Environmental Factors Impact [Альтернативные биологические тест-модели в оценке риска воздействия факторов среды обитания]*. Minsk: Trans-tekhnika; 2015. (in Russian)
- Kamkin A.G., Kiseleva I.S. *Physiology and Molecular Biology of Cell Membranes [Fiziologiya i molekulyarnaya biologiya membran kletok]*. Moscow: Akademiya; 2008. (in Russian)
- Atif M., Lima J., Mirahmadi M., Wong B. Chlamydomonas reinhardtii and salinity: the effects of NaCl on population growth. *Expedition, UBC*. 2017; 7. Available at: <https://ojs.library.ubc.ca/index.php/expedition/article/view/190211>
- Sithisarn S., Yokthongwattana K., Mahong B., Roytrakul S., Paemanee A., Phaonakrop N., et al. Comparative proteomic analysis of Chlamydomonas reinhardtii control and a salinity-tolerant strain revealed a differential protein expression pattern. *Planta*. 2017; 246(5): 843–56. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2734-4>
- Leah C. *Effects of road salt on photosynthetic and enzyme activity of stream biofilms*: Diss. Michigan; 2012. <http://commons.emich.edu/theses/410>
- Sbitnev A.V., Vodyanova M.A., Sycheva L.P., Zhurkov V.S., Kryatov I.A., Akhmal'tseva L.V. The cytogenetic and phytotoxic assessment of the anti-icing material on onion assay (*Allium cepa*). *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2018; 97(2): 144–8. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-2-144-148> (in Russian)
- Dolgov V.A., Lavina S.A., Nikitchenko D.V. Comparative evaluation and relationship of toxicity parameters of different substances to Tetrahymena piriformis and white rats. *Vestnik Rossiyskogo universiteta druzhby narodov. Seriya: agronomiya i zhivotnovodstvo*. 2014; (2): 58–65. (in Russian)
- Painter R.G., Wang G. Direct measurement of free chloride concentrations in the phagolysosomes of human neutrophils. *Anal. Chem.* 2006; 78(9): 3133–7. <https://doi.org/10.1021/ac0521706>
- Denis C.H., Pinheiro M.D., Power M.E., Bols N.C. Effect of salt and urban water samples on bacterivory by the ciliate, Tetrahymena thermophila. *Environ. Pollut.* 2010; 158(2): 502–7. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.08.014>
- Blasius B.J., Merritt R.W. Field and laboratory studies of the impact of road salt (NaCl) in the stream of macroinvertebrate communities. *Environ. Pollut.* 2002; 120(2): 219–31. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(02\)00142-2](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(02)00142-2)
- Kozel Z.L., Mazlin V.M. Deicing materials Modern requirements. Application experience in Moscow in 2001–2003 Prospects for the development of production in Russia. Available at: <http://www.kaluoleg.narod.ru/exe/acemelt/reagent.pdf> (in Russian)
- Dunham P.B. The adaptation of Tetrahymena to a high NaCl environment. *Biol. Bull.* 1964; 126(3): 373–90. <https://doi.org/10.2307/1539307>
- Walker C.H. Ecotoxicity testing: science, politics and ethics. *Altern. Lab. Anim.* 2008; 36(1): 103–112. <https://doi.org/10.1177/026119290803600111>
- Hefer T. Animal testing and alternative approaches for the human health risk assessment under the proposed New European chemicals regulation. *Arch. Toxicol.* 2004; 78(10): 549–64. <https://doi.org/10.1007/s00204-004-0577-9>
- Suescún-Bolívar L.P., Thomé P.E. Osmosensing and osmoregulation in unicellular eukaryotes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2015; 31(3): 435–43. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1811-8>
- Zvyagintsev D.G., Zenova G.M. *Actinomyces of Saline and Alkaline Soils [Актиномицеты засоленных и щелочных почв]*. Moscow: Universitet; 2007. (in Russian)
- Salvadó H., Mas M., Menendez S., Gracia M.P. Effects of shock loads of salt on protozoan communities of activated sludge. *Acta Protozool.* 2001; 40(3): 177–85.
- Li C., Li J., Lan C., Liao D. Protozoa inhibition by different salts: Osmotic stress or ionic stress? *Biotechnol. Progress.* 2017; 33(5): 1418–24. <https://doi.org/10.1002/btpr.2510>