

Донерьян Л.Г., Водянова М.А.

ОБОСНОВАНИЕ МЕСТА АЛЬТЕРНАТИВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ГИГИЕНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119121, Москва

Введение. В статье представлен анализ наиболее распространённых методов биотестирования, а также поиск перспективных направлений развития экспресс-диагностики. Рассмотрены достоинства альтернативных биологических методов оценки химических загрязнителей в объектах окружающей среды по изучению их воздействия на живые организмы.

Материал и методы. В работе проведён сравнительный анализ данных о токсичности различных противогололёдных материалов, золошлаков фармацевтических препаратов и пиролизной смеси фильтрационного горения в опытах с использованием животных и гидробионтов. Экотоксикологические исследования проводили с использованием дафний, инфузорий, светящихся бактерий, а также культуры клеток млекопитающих, токсикологические – в остром, подостром экспериментах, в том числе с изучением специфических иммунологических показателей, аллергенного и кожно-раздражающего действия.

Результаты. Для изученных токсикантов определены недействующие концентрации и разведения для биологических моделей, установлены классы опасности. Представлены результаты токсикологических экспериментов.

Обсуждение. Попытки совершенствования методов биотестирования проводятся в направлении создания батареи биотестов, сокращения сроков тестирования и инструментализации исследований. Анализ работ по различным направлениям биологических исследований позволяет говорить о необходимости использования альтернативных методов на предварительных этапах получения результатов. Это может быть применимо к установлению ПДК химических веществ в почве. Для каждого из показателей вредности может быть использован в качестве предварительного биотест: выживаемость дафний – для водно-миграционного показателя, наличие азотобактера – для общесанитарного показателя и т. д. **Заключение.** Избирательность ответных реакций на токсиканты позволяет выявить органы-мишени у теплокровных животных, а также прогнозировать воздействие на объекты окружающей среды посредством моделей-гидробионтов.

Ключевые слова: альтернативные методы; биотесты; токсикология; биологические модели; культуры клеток; простейшие; ПДК химических веществ; токсикант; противогололёдный материал; золошлаки лекарственных средств.

Для цитирования: Донерьян Л.Г., Водянова М.А. Обоснование места альтернативных биологических методов в гигиенических исследованиях. *Гигиена и санитария*. 2018; 97(11): 1093-97. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-11-1093-97>

Для корреспонденции: Донерьян Лариса Григорьевна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. гигиены почвы ФГБУ «ЦСП» Минздрава России. E-mail: dlg54@mail.ru

Donerian L.G., Vodyanova M.A.

SUBSTANTIATION OF THE PLACE OF ALTERNATIVE BIOLOGICAL METHODS IN HYGIENIC RESEARCH

Centre for Strategic Planning, Russian Ministry of Health, Moscow, 119991, Russian Federation

Introduction. The article presents an analysis of the most common methods of biotesting, as well as the search for promising directions for the development of rapid diagnostics. The advantages of alternative biological methods for assessing chemical pollutants in environmental objects to study their effect on living organisms are considered.

Material and methods. The paper compares data on the toxicity of various anti-ice materials, ash and slag pharmaceutical preparations and pyrolysis mixture of filtration combustion in experiments using animals and hydrobionts. Ecotoxicological studies were carried out using daphnia, infusorium, luminous bacteria, as well as the culture of mammalian cells. Toxicological - in acute, subacute experiments, including the study of specific immunological indicators, allergenic and skin-irritating effects.

Results. For the toxicants studied, inactive concentrations and dilutions are determined for biological models, hazard classes are established. The results of toxicological experiments are presented.

Discussion. Attempts to improve the methods of biotesting are carried out in the direction of the creating a battery of biotests, shortening the terms of testing and instrumentalizing studies. The analysis of works on various areas of biological research allows us talking about the need to use alternative methods in the preliminary stages of obtaining results. This may be applicable to the establishment of MPC of chemicals in the soil. For each of the indices of harmfulness can be used as a preliminary biotest: the survival of daphnia - for the water-migration index, the presence of *Azotobacter* - for general health, etc.

Conclusion. The selectivity of the responses to toxicants makes it possible to identify target organs in warm-blooded animals, and also to predict the impact on environmental objects through hydrobiont models.

Key words: alternative methods; biotests; toxicology; biological models; cell cultures; protozoa; maximum permissible concentration (MPC) of chemicals; toxicant; de-icing material; ash and slag medicines.

For citation: Donerian 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): 1093-97. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-11-1093-97>

For correspondence: Larisa G. Donerian, MD, Ph.D., leading researcher of the Laboratory of soil hygiene of the Centre for Strategic Planning, Russian Ministry of Health, Moscow, 119991, Russian Federation. E-mail: dlg54@mail.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 study had no sponsorship.

Received: 02 March 2018

Accepted: 18 October 2018

Введение

В гигиенических исследованиях применяются разнообразные биологические методы с использованием организмов различного уровня. Наиболее значимыми и наиболее информативными, несомненно, считаются биологические модели на высших теплокровных животных: мышах, крысах, морских свинках и т. д. Общеизвестно, что токсикологические методы на теплокровных имеют существенные недостатки: эти методы трудоёмки, длительны, требуют вложения достаточных средств. В ряде случаев, например, для оценки лекарственных средств или веществ, предположительно оказывающих отдалённые последствия на организм, классические токсикологические эксперименты жизненно необходимы, но во многих исследованиях разумный отказ от использования (и, как следствие, от уничтожения) теплокровных животных преследует этические, то есть высоконравственные цели.

Существующие в настоящее время и постоянно развивающиеся альтернативные методы исследований представляют эксперименты на более простых организмах: простейших, бактериях, гидробионтах, генно-инженерных штаммах, культурах клеток. В частности, широко используются в качестве моделей для оценки состояния качества водных экосистем различные виды рыб, которые считаются биоиндикаторами загрязнения окружающей среды [1]. При исследовании различных видов продукции и химических веществ оценку раздражающего действия на конъюнктиву глаз проводят с использованием НЕТ-САМ-теста – метода, основанного на оценке воздействия вещества на хориоаллантоисную мембрану развивающегося куриного эмбриона, а также возможно использование изолированных органов животных, например, глазных яблок [2].

Такие методы объединяются под общим названием – методы биотестирования – и вначале они использовались в основном для оценки состояния поверхностных водоисточников, в которые сбрасывались сточные воды. Методы биотестирования стали применять и для оценки других объектов, таких как химические вещества и их смеси, материалы и изделия, питьевые, подземные и искусственно приоткрытые воды, донные отложения, почвы, отходы производства и потребления, а также отходы промышленных предприятий.

Для всех перечисленных объектов обязательными в исследованиях являются также физико-химические методы, направленные на определение химического состава объекта, но известно, что не все химические соединения поддаются идентификации. Кроме того, далеко не всегда известно, какие именно вещества нужно искать в исследуемом объекте. Токсичность многих химических веществ известна и её можно найти в справочной литературе [3], но иногда токсичность вещества изменяется при взаимодействии с другими веществами. Например, при взаимодействии ионов меди с гумусовыми веществами токсичность вновь образованных комплексных соединений возрастает в 500 раз [4]. Поскольку реакция организма на суммарное воздействие факторов не бывает равной простой сумме реакций на каждый токсикант, то и найденные величины отдельных веществ в объекте не могут отражать реального воздействия на организм человека. Биотестовые модели регистрируют как раз воздействие изучаемого объекта в целом, то есть методы биотестирования являются интегральными. При этом биотесты являются доступными, простыми в осуществлении интегральной оценки, чувствительными и поддающимися инструментализации. Мнения многих исследователей на использование методов биотестирования полярны. Одни исследователи подвергают эти методы жёсткой критике, не находя подтверждения чувствительности биотестов к содержанию химических веществ на уровне их предельно допустимых концентраций (ПДК) [5], другие склонны предложить их в качестве единственного критерия, например, опасности стоков для разрешения их сброса в водные объекты [6]. Рекомендацией к применению методов биотестирования может служить широкое использование их на таких стратегически важных объектах, как Байкальский ЦБК, предприятия химического, йодо-бромного, белково-витаминного, нефтеперерабатывающего и других производств.

Несомненно, что методы биотестирования и тест-организмы должны также подбираться для гигиенической и экологической

оценки исследуемых объектов, как и физико-химические методы и приборная техника [7]. Например, экспериментально установлено, что биотест с аквариумными рыбками гуппи по своей информативности в отношении опасности загрязнения воды для человека не отличается от альтернативных моделей клеточного уровня. Чувствительность тест-организмов к веществам различной природы варьирует в широких пределах. В связи с этим для оценки токсичности (опасности) вещества или объекта окружающей среды необходимо использование нескольких тест-организмов или тест-реакций одного организма для разносторонней оценки объекта организмами различного трофического уровня. Исследователям важно подбирать тест-организмы и тест-реакции, исходя из уже имеющихся в литературе сведений о чувствительности биотестов к известным или предполагаемым поллютантам и возможном соответствии природы тест-организма и среды его обитания [8, 9].

Одними из особенно сложных, с точки зрения гигиенической оценки, являются загрязнённые или антропогенно-изменённые почвы. Почва является сложным гетерогенным объектом окружающей среды, к тому же часто содержащим в себе сложные поликомпонентные загрязнители, например, нефть. Для почвы установлено наименьшее количество ПДК химических веществ по сравнению с другими объектами окружающей среды и вследствие этого считаем актуальным, беря во внимание сложность большинства методик определения химических веществ в почве, применение интегральных методов установления токсичности нарушенных почв.

Сложности возникают и при приготовлении почвенных образцов для биотестирования. Для этих целей используется только водная экстракция, которая не в полной мере отражает наличие имеющихся в почве поллютантов, а, кроме того, в раствор переходят биогенные элементы, маскирующие влияние химических загрязнителей. Бесспорно, для оценки токсичности почвы должны использоваться педобионты – почвенные организмы, но, к сожалению, до сих пор подобные методы в гигиенических исследованиях практически не применяются [10]. Используя в комплексе биотестов представителя гидробионтов, становится возможным контроль за загрязнением сопредельной водной среды (реки, озера, грунтовых вод и т. д.) [11].

Поэтому оценка токсичности почвенных вытяжек и различных токсикантов методами биотестирования с использованием гидробионтов по-прежнему остаётся актуальной и востребованной. В связи с этим целью работы является анализ наиболее распространённых методов биотестирования и их недостатков, а также поиск перспективных направлений развития экспресс-диагностики.

Материал и методы

Проведение гигиенической оценки степени опасности для окружающей среды и здоровья населения актуально для различных отходов промышленных производств, противогололёдных материалов (ПГМ) и пр. Как правило, при проведении токсикологической оценки используют разные показатели и тест-организмы. Исследования, проведённые в рамках диссертационных работ [12–14], включали токсикологические эксперименты на животных, а также биотестирование с использованием гидробионтов. Схема экспериментальных исследований определялась в соответствии с методикой отнесения отхода к классу опасности¹.

При выборе образцов для исследований учитывали химические структурные формулы и их групповую принадлежность. В качестве объектов исследований выбраны различные ПГМ, золошлаки (ЗШ) фармацевтических препаратов и пиролизная смесь фильтрационного горения (ПСФГ). Экотоксикологические исследования проводили с использованием дафний, инфузорий, светящихся бактерий, а также культуры клеток млекопитающих². Токсикологические – в остром, подостром экспериментах,

¹ СП 2.1.7.1386–03 Санитарные правила по определению класса опасности токсичных отходов производства и потребления. ИС «Тех-эксперт: 6 поколение» Интранет.

² МР 2.1.7.2279–07 Экспресс-оценка токсичности отходов производства и потребления на культуре клеток млекопитающих. ИС «Тех-эксперт: 6 поколение» Интранет.

в том числе с изучением специфических иммунологических показателей, аллергенного, кожно-раздражающего действия и пр.

Таким образом, результаты диссертационных работ позволяют объективно оценить сопоставимость данных о токсичности изученных поллютантов в опытах с использованием животных и гидробионтов.

Результаты

Комплексное изучение ПГМ позволило установить недействующие концентрации. Например, для «хлористого кальция модифицированного» в тестированиях с дафниями и инфузориями недействующая концентрация определена на уровне 1 г/л, со светящимися бактериями – на уровне 0,5 г/л, с культурой сперматозоидов быка (КСБ) – 7,5 г/л. По результатам острого опыта величина ЛД₅₀ данного реагента составила 1600 (±286) мг/кг. По параметрам острой токсичности данный препарат отнесен к III классу опасности³, умеренно опасным веществам. Также определены недействующие концентрации по мутагенному и кожно-раздражающему действию – 60 и 15 г/л, соответственно. Для «ацетата калия модифицированного» также определены недействующие концентрации в аналогичных тестированиях: с дафниями и инфузориями – на уровне 2,3 и 2,9 г/л, соответственно, со светящимися бактериями – 50 г/л, с КСБ – 4,8 г/л. По результатам острого опыта величина ЛД₅₀ этого реагента составила 2889 (±478) мг/кг. По параметрам острой токсичности данный препарат также отнесен к III классу опасности, умеренно опасным веществам. В том числе определена недействующая концентрация по кожно-раздражающему действию – 50 г/л.

Максимальные недействующие концентрации «хлористого кальция модифицированного» и «ацетата калия модифицированного» установлены в токсикологическом эксперименте по иммуноотоксическому действию на уровне 128 и 232 мг/л, соответственно.

В свою очередь, изучение острой токсичности водных экстрактов ЗШ ПСФГ, бензилпенициллина натриевой соли и пироксикама позволило установить недействующие разведения. В остром опыте при введении максимальных количеств исходных растворов гибели животных не наблюдалось, что позволило отнести их к IV классу опасности, классу малоопасных веществ. Подострые эксперименты с водными экстрактами выбранных ЗШ показали, что в течение всего срока наблюдений животные не погибали ни в одной из опытных групп. Общее состояние животных, получавших нативные экстракты золотшлаков, не отличалось от состояния крыс в контрольных группах.

Водные экстракты ЗШ-отходов в разведении 1:100 не вызвали изменений по четырём ферментам: глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, *B-N*-ацетил глюкозаминидаза и ацетилэстераза, определяемым в сыворотке крови и в самой печени животных. Наиболее значимо изменялась активность глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы на протяжении всего эксперимента в сыворотке крови и гомогенатах печени у крыс, получавших исходный водный экстракт ПСФГ.

Параллельно определялись недействующие разведения и по экотоксикологическим показателям. Недействующие разведения для всех использованных тест-организмов лежали в интервале 1000–10 000. Наибольшая чувствительность к воздействию экстрактов из изученных ЗШ наблюдалась со стороны дафний. Полученные результаты позволили установить для ЗШ классы опасности II–III.

Из сказанного следует, что избирательность ответных реакций на различные токсиканты позволяет выявить органы-мишени у теплокровных животных, а также прогнозировать воздействие на объекты окружающей среды, в том числе пресноводных гидробионтов. Комплексный подход в предварительной оценке токсических свойств загрязнителей позволяет исключить неблагоприятные последствия для экосистемы в целом.

Обсуждение

Применение биотестирования зарекомендовало себя в разных отраслях науки, однако большинство методик федеральных реестров опирается на оценку самой бесспорной, но и одновременно самой грубой тест-реакции – гибели. Такие оценки просты, не требуют высокой квалификации исполнителя. Поэтому в условиях «поточных» анализов аккредитованной лабораторией выигрывают методики с несложным культивированием тест-организмов и процедурой анализа, низкой себестоимостью, высоким удельным показателем тестируемых проб в единицу времени [15–17].

Тестирование с использованием представителей пресноводного зоопланктона ветвистоусых рачков дафний (*Daphnia magna* Straus)⁴ экономически выгодно, а их относительно большой размер тела, например, в сравнении с другим видом дафний *Ceriodaphnia dubia*, позволяет проводить анализ невооруженным глазом [18, 19]. Чаще всего в гигиенических и экологических исследованиях используют острый опыт на дафниях по наблюдению за выживаемостью рачков в течение контролируемого времени. Являясь по типу питания активными фильтраторами, дафнии пропускают через себя большие объемы жидкости и накапливают имеющиеся в ней химические вещества. Многочисленными исследованиями водных растворов химических ксенобиотиков была найдена сопоставимость для некоторых из них СЛ₅₀ и ПДК на уровне 0,25 для серебра, 0,2 ПДК ДДТ, 0,023 ПДК гидрохинона и т. д. Также показана высокая токсичность биоцидов, используемых в качестве добавок в составе строительных материалов [20]. Но в то же время дафнии нечувствительны к высокотоксичным для человека дихлорэтилену до 131 000 ПДК. Возможна и гипердиагностика к нетоксичным для человека соединениям [21]. В связи с этим тест-объект не должен быть единственным.

Тест с использованием представителя простейших – ресничных инфузорий тетрахимен (*Tetrahymena pyriformis*)⁵ является в настоящее время распространённым и общепринятым, удобным в культивировании и процессе тестирования по двум тест-функциям: хемотаксической (поведенческой) и генеративной (ростовой). Такой тест интересен и важен тем, что ответную реакцию на воздействие извне мы получаем со стороны клетки и организма одновременно. Установлено сходство инфузорий тетрахимен и парамеций с высшими животными по ряду основных параметров обмена веществ. Преимуществами использования простейших являются быстрота анализа, его относительная простота и дешевизна, высокая чувствительность к токсическим факторам и наглядность в проявлении токсического эффекта. В работах В.А. Долгова [22–24] в области ветеринарной санитарии установлена высокая корреляционная связь параметров токсичности различных веществ для одноклеточных инфузорий и белых крыс на уровне $r = 0,77–0,99$, а также ростовой реакции инфузорий с показателями качества белка и других параметров состояния лабораторных крыс и цыплят. Установлено, что с помощью тетрахимен можно изучать биологическую ценность продуктов пчеловодства (пыльцы, перги, прополиса, маточного молочка), потому как высокая ростостимулирующая активность этих продуктов в отношении тетрахимен, проявляется при их достаточной низкой концентрации в среде [25]. В то же время в работах по изучению общей токсичности различных видов кормов свиней, готовых комбикормов и воды с использованием другого вида инфузорий *Colpoda steinii*, показано, что экспресс-биотестирование может быть оперативным инструментом оптимизации кормовой базы свиного комплекса, так как позволяет получить первичные сведения об уровне общей токсичности продукции в лаборатории предприятия в короткие сроки [26].

⁴ ПНД Ф Т 14.1:2.3:4.12-06, Т 16.1:2.2:3.3.9-06. Токсикологические методы контроля. Методика измерений количества *Daphnia magna* Straus для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления методом прямого счета (издание 2014 года). ИС «Техэксперт: 6 поколение» Интранет.

⁵ МР ЦОС ПВ Р 005--95 от 12.10.1995. Методические рекомендации по применению методов биотестирования для оценки качества воды в системах хозяйственно-питьевого водоснабжения. ИС «Техэксперт: 6 поколение» Интранет.

³ ГОСТ 12.1.007--76 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности (с Изменениями № 1, 2). ИС «Техэксперт: 6 поколение» Интранет.

Кроме расширения областей применения и количества самих биотестовых систем применяются и методические приёмы по культивированию организмов, сокращению сроков экспозиции, инструментализации тестирования. Однако с помощью результатов собственных исследований было установлено, что сокращение сроков экспозиции для дафний с 96 до 48 ч приводит к недооценке токсического воздействия на выживаемость рачков, в частности, со стороны отходов лекарственных препаратов (рис. 1, см. на вклейке). Это подтверждается работами по оценке острой токсичности наночастиц серебра (*AgNPs*) и нитрата серебра (*AgNO₃*) [27]: воздействие более 24 ч привело к увеличению токсичности наночастиц серебра вследствие его более интенсивного растворения. Показано, что наноматериалы проявляют эффекты только после длительного воздействия, таким образом при стандартной продолжительности испытания длительностью 48 ч может недооцениваться токсичность многих веществ, особенно наноматериалов.

В случае же установления недействующих доз веществ, непосредственно контактирующих с организмом человека, целесообразна постановка хронических опытов с экспозицией тестовых систем до 30 сут.

Ряд исследователей предлагает также сокращение сроков хронического эксперимента по ростовой функции инфузорий до 6 ч. Собственные исследования позволяют отметить изменения ответной реакции инфузорий (в ростовой функции) после 24 ч (рис. 2, см. на вклейке).

Авторы современных методических рекомендаций в погоне за увеличением экспрессности методов биотестирования не считают нужным включать в качестве контролирующих показателей наблюдение за функциональным состоянием тест-организмов в течение эксперимента (для дафний, например, это ритм движения, у инфузорий – интенсивность прироста клеток в промежуточных интервалах экспозиции). Встречаются зарубежные работы, включающие в качестве тест-реакций для дафний такие показатели, как морфологические изменения в теле рачков или изменения пола под воздействием химических веществ [28, 29].

Вместе с тем, активно внедряются стандарты, адаптированные международным рекомендациям ОЭСР⁶. С учётом оценки воздействия различной химической продукции на репродуктивную функцию *Daphnia magna* становится возможным определение самой низкой эффективной концентрации и, следовательно, неэффективной концентрации. В данном тестировании продолжительность наблюдений составляет 21 день.

Следует отметить, что за счёт инструментализации исследований – внедрения новых приборных разработок – ответные реакции можно регистрировать в автоматическом режиме, содержать культуры в оптимальных условиях круглосуточно, но и в этих условиях нужно использовать новое применительно к исследуемым образцам. Так, в климатостате, в устройстве для экспонирования рачков, во время эксперимента предусмотрено наклонное положение пробирок с дафниями и их вращение для насыщения растворов кислородом воздуха. При тестировании вод, загрязнённых нефтяными углеводородами, дафнии, находясь в верхней части раствора, при вращении пробирок прилипают к стеклянной поверхности и их гибель наступает вследствие этих методических недостатков.

Таким образом, планируя экспериментальные исследования по оценке экотоксичности различных объектов методами биотестирования, необходимо учитывать специфику объекта, цель и длительность опыта, критерии оценки тест-реакций, а также способ представления результатов.

Кроме того, применение методов биотестирования может быть актуальным при обосновании нормативных величин химических веществ в почве. Одним из основных показателей вредности, определяемых экспериментально, является транслокационный метод перехода химических веществ из почвы в растения. Предварительным этапом в таком случае является

фитотестирование с проростками семян высших растений, что позволяет корректно смоделировать схему эксперимента по транслокации. По аналогии, считаем целесообразным проводить предварительные серии опытов с применением водных организмов – гидробионтов перед планированием эксперимента по оценке миграционного водного показателя вредности. Такой подход позволит установить оптимальные рабочие концентрации исследуемых веществ и усовершенствовать действующий алгоритм постановки эксперимента.

Заключение

Различные методы биотестирования применяются в лабораторной практике более 40 лет [30]. Современные требования научных изысканий, безусловно, видоизменяют подходы к проведению тестирования, принципы обработки данных и культивирования тест-организмов. Тем не менее, предпочтение в алгоритме исследований по оценке токсичности должно быть отдано приоритетному тесту в зависимости от свойств изучаемого токсиканта и путей его поступления в организм человека.

Проведение токсикологических исследований на теплокровных животных рекомендовано при отсутствии ПДК нормируемых веществ в контактирующих с почвой средах. В противном случае, токсикологические эксперименты не предусмотрены, а в качестве дополнительной оценки токсикантов могут быть предложены методы *in vitro* с использованием клеточных культур.

Такие подходы позволяют пересмотреть и актуализировать действующие методические рекомендации по обоснованию ПДК химических веществ в почве и возобновить нормирование приоритетных токсикантов.

Финансирование. Работа не имеет финансовой поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

(п.п. 1, 8, 9, 16, 18, 19, 27–29 см. References)

- Зарицкая Е.В., Полозова Е.В., Шилов В.В., Богачева А.С. Современные альтернативные методы исследования, используемые для оценки безопасности продукции. *Экология человека*; 2017; 3: 21–25.
- Лазарев Н.В. Левина Э.Н., ред. Вредные вещества в промышленности. Справочник для химиков, инженеров и врачей. 1976; Т.1 Органические вещества: 592.
- Пожаров А.В., Рахманин Ю.А., Шелемотов С.А., Михайлова Р.И. Прикладные аспекты аппаратного биотестирования воды. *Гигиена и санитария*; 1994; 8: 18–21.
- Красовский Г.Н., Рахманин Ю.А., Егорова Н.А. *Экстраполяция токсикологических данных с животных на человека*. Москва; ОАО «Издательство «Медицина»; 2009. 208.
- Красовский Г.Н., Егорова Н.А. Недостатки биотестирования при гигиенической оценке сточных вод. *Гигиена и санитария*; 2005; 3: 10–13.
- Бальбухов К.С., Капранов С.В. Экологическая и гигиеническая оценка качества производственных сточных вод и открытых водоёмов в промышленном городе с использованием метода биотестирования. *Вода і водоочисні технології. Науково-технічні вісті*; 2012; 8 (2): 30–39.
- Терехова В.А. Биотестирование почв: подходы и проблемы; *Почвоведение*. 2011; 2: 190–198.
- Маячкина Н.В., Чугунова М.В. Особенности биотестирования почв с целью их экотоксикологической оценки; *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского*. 2009; 1: 84–93.
- Русakov Н.В., Мухамбетова Л.Х., Крятов И.А., Коганова З.И., Фадеева И.И., С.Б. Чудакова и др. Оценка степени опасности химических веществ, загрязняющих почву, при воздействии на организм экспериментальных животных. *Гигиена и санитария*. 2007; 2: 68–69.
- Евсеева И.С. Эколого-гигиеническая оценка термической технологии уничтожения лекарственных средств, подлежащих утилизации; Дис... канд. мед. наук. М. 2006: 204.
- Чудакова С.Б. Токсиколого-гигиеническая оценка степени опасности антигололедных реагентов; Дис... канд. мед. наук. М. 2006: 191.
- Олькова А.С. Биотестирование в научно-исследовательской и

⁶ ГОСТ 32367–2013. Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Угнетение репродуктивной способности Дафнии магна. ИС «Техэксперт: 6 поколение» Интранет.

- природоохранной практике России. *Успехи современной биологии*. 2014; 134 (6): 614-622.
17. Яковишина Т.Ф. Экотоксикологическая оценка городских почв методами биотестирования. Универсум: Химия и биология: электрон. научн. журн. 2015. 16 (8). URL: <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/2491> (дата обращения: 13.11.2018).
 20. Рыкунова М.Д., Нелюбова В.В., Карнаухова М.Д. Экотоксикологические исследования биоактивных компонентов; Инновации в строительстве 2017; Изд-во: ФГБОУ ВО «Брянский государственный инженерно-технологический университет» (Брянск). Материалы международной научно-практической конференции Инновации в строительстве; 2017; Брянск, 20-22 ноября 2017: 121-126.
 21. Красовский Г.Н., Егорова Н.А. Методические ошибки при использовании биотестирования в гигиенических исследованиях. *Гигиена и санитария*. 2000; 4: 63-66.
 22. Долгов В.А. Методические аспекты и практическое применение ускоренной биологической оценки кормов, продуктов животноводства и других объектов ветеринарно-санитарного и экологического контроля; Автореф. Дис. ... д-ра наук. М. 1992: 41.
 23. 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.
 24. Долгов В.А., Лавина С.А., Арно Т.С., Семенова Е.А., Островская А.В. Био-тестовая оценка качества и безопасности продуктов, кормов и объектов окружающей среды. *Российский журнал. Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии*. 2015; 2 (14): 20-27.
 25. Долгов В.А., Лавина С.А. Методологические аспекты ветеринарно-санитарной экспертизы продовольственного сырья и пищевой продукции. *Российский журнал. Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии*. 2016; 3(19): 11-19.
 26. Стрижак Т.А., Сидашова С.А., Палагута А.В. Методика экспресс-исследований токсикологических профилей кормовой базы свиноводческих предприятий. *Научно-технический бюллетень института животноводства национальной академии аграрных наук Украины*. 2016; 116: 151-160.
 30. Захаров И.С., Алёшин И.В.; Методы и средства микробиотестирования токсичности водных сред. *Фундаментальная и прикладная гидрофизика*. 2015; 8 (2): 75 – 95.
 10. Terekhova V.A. Soil biotesting: approaches and problems. *Pochvovedenie*. 2011; 2: 190-198 (in Russian).
 11. Mayachkina N.V., Chugunova M.V. Peculiarities of soil biotests to evaluate soil ecotoxicity. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo*. 2009; 1: 84-93 (in Russian).
 12. Rusakov N.V., Mukhambetova L.K.H., Kryatov I.A., Koganova Z.I., Fadeeva I.I., CHudakova S.B. and al. Assessment of the degree of danger of chemicals polluting the soil when exposed to the body of experimental animals. *Gigiena i Sanitaria*. 2007; 2: 68-69 (in Russian).
 13. Evseeva I.S. Ecological and hygienic assessment of the thermal technology for the destruction of medicinal products subject to disposal; Dis.... kand. med. nauk. M. 2006: 204 (in Russian).
 14. CHudakova S.B. Toxicological and hygienic evaluation of the degree of danger of ice-reagents; Dis.... kand. med. nauk. M. 2006: 191. (in Russian).
 15. Olkova A.S. Bioassay in research and environmental practices of Russia. *Uspekhi sovremennoj biologii*. 2014; 134 (6): 614-622. (in Russian).
 16. Evsyunina E.V., Taran D.O., Stom D.I., Saksonov M.N., Balayan A.E., Kirillova M.A., Esimbekova E.N., Kratasyuk V.A. Comparative assessment of toxic effects of surfactants using biotesting methods. *Inland Water Biology*. 2016; 9 (2): 196 – 199.
 17. YAKovishina T.F. Ecotoxicological assessment of urban soils using biotesting methods; Универсум: Chemistry and Biology: electronic science. 2015. №8 (16). URL: <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/2491> (appeal date: 13.11.2018) (in Russian).
 18. Jonczyk E., Gilron G. (2005) Acute and Chronic Toxicity Testing with *Daphnia Sp.* In: Blaise C., Férard J.F. (eds) Small-scale Freshwater Toxicity Investigations. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/1-4020-3120-3_11.
 19. Arystarkhova E. Express-assessment of potential hazard of water by method of biotesting using *Daphnia magna* S. *Bulletin of Agrarian Science*; 2017; (2): 50–54.
 20. Rykunova M.D., Nelyubova V.V., Karnaukhova M.D. Ecotoxicological studies of bioactive components; Innovations in construction - 2017; Publishing house: FGBOU VO “Bryansk State Engineering and Technology University” (Bryansk). Materials of the International Scientific and Practical Conference Innovations in Construction; 2017; Bryansk, November 20-22, 2017: 121-126 (in Russian).
 21. Krasovskij G.N., Egorova N.A. Methodological errors in the use of biotesting in hygiene studies. *Gigiena i Sanitaria*. 2000; (4): 63-66 (in Russian).
 22. Dolgov V.A. Methodical aspects and practical application of the accelerated biological assessment of fodder, livestock products and other objects of veterinary-sanitary and ecological control. Avtoref. Dis. ... d-ra nauk. M. 1992: 41 (in Russian).
 23. Dolgov V.A., Lavina S.A., Nikitchenko D.V. Comparative evaluation and relationship of toxicity parameters of different substances to *Tetrahymena pyriformis* and white rats. *Vestnik rossijskogo universiteta družby narodov*. Series: agronomy and livestock; 2014; 2: 58-65. (in Russian).
 24. Dolgov V.A., Lavina S.A., Arno T.S., Semyonova E.U., Ostrovskaya A.V. Bioassay of quality and safety of feed, food and the environmental objects. *Rossijskij zhurnal. Problemy veterinarnoj sanitarii, gigieny i ehkologii*. 2015; 2 (14): 20-27 (in Russian).
 25. Dolgov V.A., Lavina S.A. Methodological aspects of veterinary-sanitary expertise of food raw materials and food products. *Rossijskij zhurnal. Problemy veterinarnoj sanitarii, gigieny i ehkologii*. 2016; 3(19): 11-19 (in Russian).
 26. Strizhak T.A., Sidashova S.A., Palaguta A.V. The method express research on toxicological profile of feed base of pig farms. *Nauchno-tekhnicheskij byulleten' instituta zhivotnovodstva nacional'noj akademii agrarnyh nauk Ukrainy*; 2016; 116: 151-160 (in Ukrainian).
 27. Baumann, J., Sakka, Y., Bertrand C. et al. *Environ Sci Pollut Res*. 2014; 21: 2201. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2094-y>.
 28. Ignace D.D., Dodson S.I., Kashian D.R. Identification of the critical timing of sex determination in *Daphnia magna* (Crustacea, Branchiopoda) for use in toxicological studies. *Hydrobiologia*. 2011; 688 (1): 117–123.
 29. Robinson S.E., Capper N.A., Klaine S.J. The effects of continuous and pulsed exposures of suspended clay on the survival, growth, and reproduction of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology*. 2010; 29 (1).
 30. Zakharov I.S., Aleshin I.V. Methods and Means for Microscale Biotesting Toxicity of Aquatic Environments. *Fundamental and applied hydrophysics*. 2015; 8 (2): 75–95 (in Russian).

References

1. Viana, L.F., Suárez, Y.R., Cardoso C.A.L. et al. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2018; 75: 476. <https://doi.org/10.1007/s00244-018-0551-9>.
2. Zaritskaya E.V., Polozova E.V., SHilov V.V., Bogacheva A.S. Present alternative study methods used in product safety assessment. *Ehkologiya cheloveka*; 2017; 3: 21-25 (in Russian).
3. Lazarev N.V. Levina E.H.N., ed. Harmful substances in industry. A Handbook for Chemists, Engineers and Physicians; 1976; 1; Organic matters: 592 (in Russian).
4. Pozharov A.V., Rakhmanin YU.A., SHEmotov S.A., Mikhajlova R.I. Applied aspects of instrumental biotesting of water. *Gigiena i Sanitaria*. 1994; 8: 18-21 (in Russian).
5. Krasovskij G.N., Rakhmanin YU.A., Egorova N.A.: Extrapolation of toxicological data from animals to humans: Moscow: Meditsina Publishers, 2009. 208 p. (in Russian).
6. Krasovskij G.N., Egorova N.A. Disadvantages of biotesting in the hygienic assessment of wastewater. *Gigiena i Sanitaria*. 2005; 3: 10-13 (in Russian).
7. Bal'uhov K.S., Kapranov S.V. Environmental and hygienic assessment of the quality of industrial wastewater and open reservoirs in an industrial city using the biotesting method; *Water and water treatment technology. Scientific and Technical Fields*. 2012; 8 (2): 30-39 (in Russian).
8. Matorin D.N., Bratkovskaya L.B., Yakovleva O.V., Venediktov P.S. Biotesting of water toxicity according to the ratio of microalgae consumption by daphnia detected with chlorophyll fluorescence. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*. 2009; 64 (3): 115-120. DOI: 10.3103/S0096392509030067.
9. Mushunina A.S., Azarova S.V., Yazikov E.G., Parygina I.A. Biotesting of modeled drilling mud as an indicator of environmental risk; IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 2016; 43. DOI: 10.1088/1755-1315/43/1/012047.

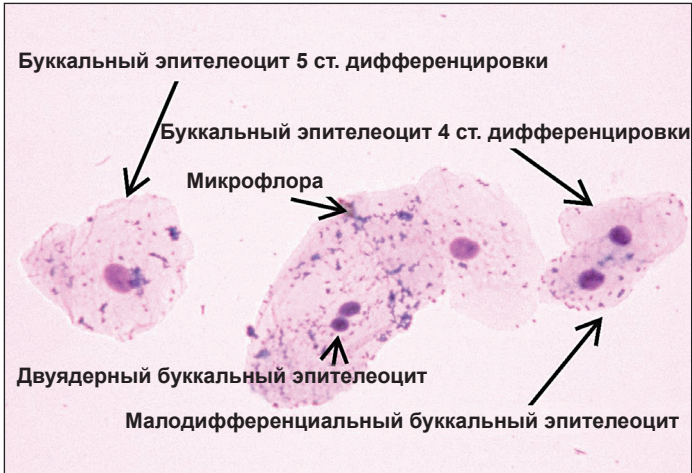


Рис. 1. Буккальные эпителиоциты разной степени дифференцировки с микрофлорой.
 Окраска Май-Грюнвальдом с Азур-эозином. Увеличение 10×40 .

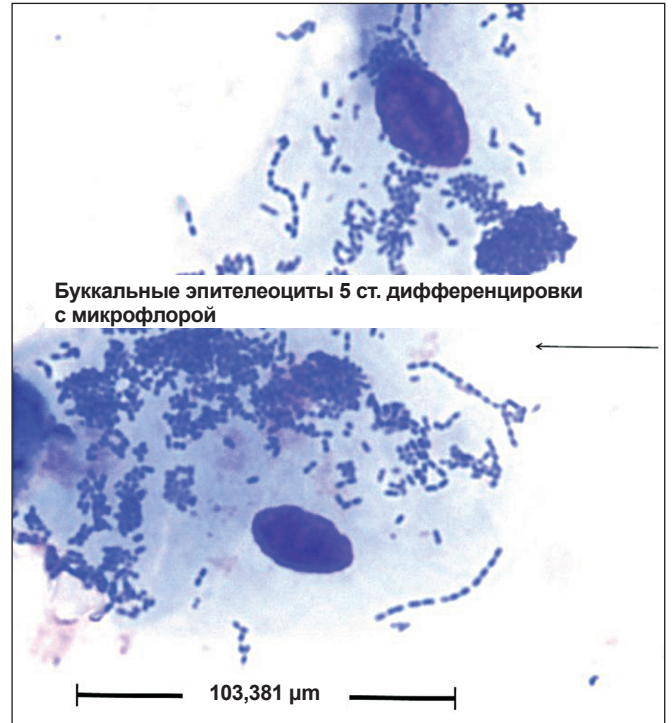


Рис. 2. Микрофлора.
 Окраска Май-Грюнвальдом. Увеличение 10×100 .

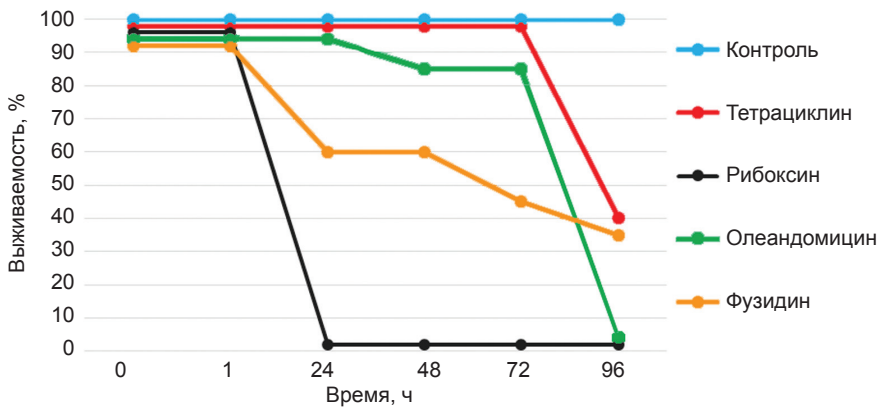


Рис. 1. Изучение влияния отходов фармацевтической промышленности по динамике выживаемости дафний в течение 96 ч.

Рис. 2. Изучение влияния отходов фармацевтической промышленности по динамике размножения инфузорий в течение 48 ч.

