

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ И.В. Гаевский
12.12.2012
Регистрационный № 021-1112

**ОЦЕНКА ИНТЕГРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ
ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ МЕТОДАМИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический центр
гигиены»

АВТОРЫ: канд. биол. наук, доц. Н.В. Дудчик, канд. мед. наук, доц. Е.В. Дроздова,
В.В. Трейлиб, Е.А. Будкина, В.В. Бурая, Т.О. Козлова, Л.Л. Ушкова

Минск 2012

ГЛАВА 1 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая Инструкция по применению «Оценка интегральной токсичности объектов окружающей среды методами биотестирования» (далее — инструкция) устанавливает методы оценки токсического действия отходов, сточных вод, природных объектов — природных вод, донных отложений, почв, а также продуктов, содержащих химические вещества и др. (далее — объекты исследования) с использованием про- и эукариотических организмов в качестве тест-культур. Настоящая инструкция позволяет применять предложенные методы для оценки интегральной токсичности объектов окружающей среды как самостоятельно, так и в батарее тестов.

Преимуществом применения методов биотестирования является соответствие современным требованиям: исключение из эксперимента высокоорганизованных животных, сокращение сроков исследования.

2. Настоящая инструкция предназначена для специалистов учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор, иных учреждений, проводящих оценку токсичности и безвредности для организма человека объектов окружающей среды.

3. Результаты оценки интегральной токсичности объектов окружающей среды методами биотестирования, изложенными в настоящей инструкции, учитывают при определении уровня их возможного прямого или косвенного отрицательного влияния на здоровье человека и прогнозе их безопасности и безвредности для человека.

4. Предложенные в инструкции альтернативные тест-культуры могут быть представлены заинтересованным организациям ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены».

ГЛАВА 2 ОЦЕНКА ИНТЕГРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ В БАТАРЕЕ ТЕСТОВ

1. Для оценки интегральной токсичности объектов окружающей среды рекомендуется использовать «батареи тестов» (наборы тестов), состоящие из нескольких тест-систем, поскольку отдельно взятый тест не позволяет получить репрезентативные объективные данные о токсичности.

2. При составлении батареи тестов необходимо учитывать следующие основополагающие критерии:

- биотесты должны дополнять друг друга по чувствительности к различным группам химических веществ, точности, диапазону оценки токсичности и др.;

- батарея тестов для оценки интегральной токсичности объектов окружающей среды должна включать тест-объекты, различные по степени эволюционной степени организации, — от молекулярных структур до изолированных органов и неживых систем;

- биотесты должны основываться на различных принципах детекции

токсического воздействия и критериях оценки токсического воздействия (например, биохимические, физиологические, репродуктивные, поведенческие параметры жизнедеятельности).

3. При составлении батареи тестов необходимо также учитывать следующие дополнительные критерии:

- обязательно в батарею тестов при тестировании любых сред должны входить ракообразные;

- при тестировании вод (питьевых, природных, сточных) в батарею тестов должны обязательно входить как водоросли, так и ракообразные;

- при тестировании сред, в которых потенциально присутствуют кислородсодержащие органические вещества, батарея тестов должна обязательно включать представителей всех трофических уровней;

- при тестировании водных вытяжек из продукции достаточно исследования на нескольких видах ракообразных, при этом в батарею тестов обязательно рекомендуется включить дафнии (желательно *Daphnia magna* или *Daphnia pulex*) и представителей отряда *Ostracoda* — *Cypridopsis vidua* или *Heterocypris incongruens*;

- при тестировании отходов, почв в батарею тестов должны обязательно входить ракообразные, при этом в первую очередь рекомендуется использовать представителей отряда *Ostracoda*: *H. incongruens* (почвы, органосодержащие отходы), *C. vidua* (металлосодержащие отходы);

- при тестировании сред, потенциально содержащих металлы, при тестировании с использованием водорослей рекомендуется в батарею тестов включать краткосрочный тест на водорослях *Chlorella vulgaris* из биоценоза Республики Беларусь с применением флуориметрического метода (поскольку некоторые металлы стимулируют развитие водорослей при более длительной экспозиции, интерпретация результатов затруднена);

- при тестировании хлорорганических соединений однозначно наибольшей чувствительностью обладают ракообразные, причем с учетом на порядок большей чувствительности остракод, сравнимой с ПДК, в батарею тестов потенциально содержащих такие вещества (поверхностные воды, отходы, почвы), целесообразно включать *C. vidua* или *H. incongruens*.

4. Рекомендуемые батареи тестов для тестирования различных объектов окружающей среды представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Батареи тестов для оценки интегральной токсичности

Методы, входящие в батарею	Область применения
----------------------------	--------------------

Ростовой тест на <i>Pseudomonas spp.</i> с импедиметрической детекцией	Вода, поверхностные воды, сточные воды, вода питьевая водопроводная, колодезная
Флуориметрический краткосрочный тест на водорослях <i>Chlorella vulgaris</i> из биоценоза Республики Беларусь	
Иммобилизационный тест на остракодах — <i>C. vidua</i> или <i>H. incongruens</i>	
Ростовой тест на почвенных микроорганизмах с импедиметрической детекцией	Почва, седименты
Дегидрогеназный тест на культуре почвенных микроорганизмов	
Иммобилизационный тест на ракообразных <i>C. vidua</i> или <i>D. magna</i>	
Дегидрогеназный тест на культуре почвенных микроорганизмов	Отходы производств
Ростовой тест на <i>Pseudomonas spp.</i> с импедиметрической детекцией	
Иммобилизационный тест на остракодах — <i>C. vidua</i> или <i>H. incongruens</i>	

ГЛАВА 3 ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ

Оборудование:

Анализатор потенциометрический (рН-метр)	Нормативная документация (СТБ, ГОСТ, ТУ и др.)
Автоклав вертикальный	ГОСТ 25.7416.0171
Аппарат для встряхивания	ГОСТ 9586
Бактерицидные лампы	
Баня водяная с терморегулятором	
Весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г	ГОСТ 24104
Весы лабораторные 4-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 1000 г	ГОСТ 24104
Гигрометр психрометрический тип ВИТ-1	
Дистиллятор	
Климатостат	
Колориметр фотоэлектрический или спектрофотометр	
Ламинарный шкаф для культуры клеток (класс I)	
Ламинарный шкаф (класс II)	
Лупа с увеличением 5–10	ГОСТ 8309
Люминоstat с освещением рабочей зоны 2000–	

3000 лк от ламп дневного света	
Микробиологический анализатор с электрохимическим (импедансным) принципом детекции	
Микроскоп световой биологический с увеличением 900–1000	ГОСТ 8284
Морозильная камера бытовая, обеспечивающая замораживание ($-18\pm 3^{\circ}\text{C}$)	
Спектрофотометр или фотоэлектроколориметр лабораторный	
Стандарт мутности на 5 ед.	
Сушильный электрический шкаф	ГОСТ 13474
Термолюминоста́т, поддерживающий температуру воды ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$), освещенность (500 ± 100) лк	
Термостат электрический с диапазоном рабочих температур $28\text{--}55^{\circ}\text{C}$ с погрешностью $+ 1\text{ C}$	
Термометр лабораторный $0\text{--}55^{\circ}\text{C}$, цена деления шкалы — $0,5^{\circ}\text{C}$	ГОСТ 215
Термометр лабораторный, цена деления шкалы $0,1^{\circ}\text{C}$	ГОСТ 215
Холодильник бытовой, обеспечивающий поддержание температуры ($+4\pm 2^{\circ}\text{C}$)	ГОСТ 16317
Флуориметр лабораторный	
Термометр с ценой деления шкалы 1°C	ГОСТ 112-78
Центрифуга лабораторная медицинская	
Шкаф сушильный электрический общелабораторного назначения (для стерилизации и сушки посуды)	
Материалы:	
Автоматические пипетки переменного объема 500–5000; 1000-10000 мкл и наконечники к ним	
Бумага фильтровальная	ГОСТ 12026
Бюксы или стаканчики для взвешивания, диаметром 30, 40 мм	
Воронки разные лабораторные	ГОСТ 25336
Груши резиновые разные	
Камера счетная Горяева (ТУ 42-816) или Нажотта (ТУ 64-1-816)	
Колбы мерные вместимостью 0,5 и 1,0 л, 2-го класса точности	ГОСТ 1770
Колбы плоскодонные конические вместимостью 250 мл	ГОСТ 25336
Марля для изготовления ватно-марлевых пробок	

Мешалка лабораторная	
Микрокомпрессор аквариумный	
Оксиметр с погрешностью измерения не более 0,5 мг О ₂ /дм ³	
Пипетки автоматические (дозаторы любого типа) объемом 0,02–0,5 мл ± 1,0%	
Пипетки вместимостью 0,5; 1,0; 5,0; 10,0 мл	ГОСТ 29227
Плитка электрическая	ГОСТ 14919
Покровные стекла	ГОСТ 6672
Предметные стекла	ГОСТ 9284
Спиртовка	
Стаканчики для взвешивания (бюксы) диаметром 30, 40 мм	ГОСТ 7148
Стаканы стеклянные лабораторные вместимостью 10, 50 мл	ГОСТ 25336
Стекла предметные	ГОСТ 9284
Стекла покровные	ГОСТ 6672
Петля бактериологическая	
Пинцеты медицинские	ГОСТ 21241-89
Планшеты для культивирования клеток стерильные	
Посуда для культур клеток — стерильные культуральные флаконы, планшеты, пробирки, пипетки и пр.	
Посуда стеклянная вместимостью 1 л (для транспортирования и хранения проб воды)	
Пробирки стеклянные, вместимостью 10 мл	ГОСТ 25336
Ступка фарфоровая	
Шпатель микробиологический пластиковый	
Чашки Петри пластиковые микробиологические, стерильные	ГОСТ 23932
Флаконы и банки стеклянные с навинчивающейся крышкой или с притертой пробкой для отбора и хранения проб вместимостью 10; 50; 100 мл	
Фильтры мембранные № 4	
Фильтровальный аппарат	
Цилиндры вместимостью 25 и 50 мл 2-го класса точности	ГОСТ 1770
Цилиндры мерные вместимостью 0,1; 0,5 и 1,0 л, 2-го класса точности	ГОСТ 1770
Реактивы:	
Агар микробиологический	ФС 42-188ВС-90
Бихромат калия	ГОСТ 2652-78

Вода дистиллированная	ГОСТ 6709
Вода питьевая	СанПиН 10-124 РБ 99
Глюкоза, х.ч.	ГОСТ 6038-79
Дрожжевой экстракт	ГОСТ 171-81
Железа хлорид	ГОСТ 4147-74
Калий азотнокислый	ГОСТ 4217-78
Калий двухромовокислый	ГОСТ 4220-75
Калия гидроксид	ГОСТ 9285-78
Калий сернокислый, х.ч. или ч.д.а.	ГОСТ 4145-74
Кальций углекислый, х.ч. или ч.д.а.	ГОСТ 4530-76
Калий фосфорнокислый двухзамещенный 3-водный, х.ч. или ч.д.а.	ГОСТ 2493-75
Кислота серная	ГОСТ 4204
Кислота соляная	ГОСТ 3118
Магний сернокислый семиводный, ч.д.а.	ГОСТ 4523-77
Метиленовый синий	
Мясопептонный агар	
Натрия гидроокись	ГОСТ 4328
Натрий хлористый, х.ч. или ч.д.а.	ГОСТ 4233-77
Ортофосфорная кислота 85%	ГОСТ 6552
Пептон сухой ферментативный бактериологических целей	для ГОСТ 13805-76
Спирт этиловый, х.ч.	ТУ 6-091710
2-тиобарбитуровая кислота	
Трис	
ЭДТА	

Допускается использование оборудования и материалов с аналогичными по назначению техническими и метрологическими характеристиками для проведения исследований в соответствии с настоящей инструкцией. При их применении следует руководствоваться рекомендациями изготовителя.

ГЛАВА 4 ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ, РЕАКТИВОВ И ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

1. Вся посуда, применяемая для микробиологического анализа, должна быть стерильной.

2. Среда R1 для культивирования *Rhodococcus spp.* (на 1000 мл воды): пептон — 7,0 г; дрожжевой экстракт — 3,5 г; глюкоза — 10,0 г; натрий хлористый — 5,0 г; рН = 7,2–7,4. Стерилизация автоклавированием при 121°C в течение 30 мин.

3. Среда Самойленко для культивирования *Arthrobacter spp.* (на 1000 мл воды): пептон — 10,0 г; дрожжевой экстракт — 5,0 г; глюкоза — 5,0 г; хлористый натрий — 5,0 г; гидрофосфат натрия — 4 г; дигидрофосфат калия — 1 г; рН = 7,2–

7.4. Стерилизация автоклавированием при 121°C в течение 30 мин.

4. Среда для культивирования *Pseudomonas spp.* (на 1000 мл воды): глюкоза — 3,2 г, кукурузный экстракт — 1,5 г; пептон — 0,5 г; хлористый натрий — 5,0 г; рН = 7,2–7,4. Вода дистиллированная — до 1000 мл, рН = 6,8. Стерилизация автоклавированием при 121°C в течение 30 мин.

5. Приготовление красителя метиленового синего для окрашивания. Готовят раствор из расчета 10 г метиленового синего на 100 мл воды. Раствор стоек и может храниться не менее 1 мес.

6. Приготовление 0,002% красителя метиленового синего для оценки дегидрогеназной активности. Готовят раствор из расчета 0,002 г метиленового синего на 100 мл воды. Раствор стоек и может храниться не менее 1 мес.

7. Приготовление 0,4% глюкозы для оценки дегидрогеназной активности. Готовят раствор из расчета 0,4 г глюкозы на 100 мл воды.

8. Приготовление буфера состава: 5 мМ ЭДТА, 150 мМ NaCl, 50 мМ Трис – HCl.

8.1. 1 М Трис рН=7,5. Растворить 121,1 г Трис в 800 мл воды. Довести рН до 7,5 добавлением HCl, а объем до 1 л. Раствор простерилизовать.

8.2. 0,5 М ЭДТА рН=8,0. К 186,1 г ЭДТА добавить 800 мл воды. Довести рН до 8,0 NaOH.

8.3. 5 М NaCl. 29,22 г NaCl растворить в 80 мл воды и довести объем до 100 мл, простерилизовать.

8.4. Для приготовления буфера: добавить 5 мл 1 М Трис рН=7,5, 0,1 мл 0,5 М ЭДТА рН=8,0 и 3,3 мл 5 М NaCl и довести до 100 мл дистиллированной водой.

9. Приготовление буфера состава 50 мМ Трис, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, рН 7,4.

9.1. 1 М Трис рН 7,5. Растворить 121,1 г Трис в 800 мл воды. Довести рН до 7,5 добавлением концентрированной HCl, а объем до 1 л. Раствор простерилизовать.

9.2. 0,5 М ЭДТА рН=8,0. К 186,1 г ЭДТА добавить 800 мл воды. Довести рН до 8,0 NaOH.

9.3. 5 М NaCl. 29,22 г NaCl растворить в 80 мл воды и довести объем до 100 мл, простерилизовать;

9.4. Для приготовления буфера: добавить 5 мл 1 М Трис рН=7,5, 0,2 мл 0,5 М ЭДТА рН=8,0 и 2 мл 5 М NaCl довести до 100 мл дистиллированной водой и установить рН=7,4.

10. Приготовление физиологического раствора NaCl. 8,5 г NaCl растворяют в 1 л водопроводной воды. Стерилизация автоклавированием при 121°C в течение 30 мин.

11. Приготовление 2% раствора ортофосфорной кислоты. К 2,6 г 75% ортофосфорной кислоты добавить 100 мл дистиллированной воды.

12. Приготовление 0,8% раствора тиобарбитуровой кислоты. К 0,8 г тиобарбитуровой кислоты добавить 100 мл дистиллированной воды.

ГЛАВА 5 ПОДГОТОВКА ПРОБ К АНАЛИЗУ И УСЛОВИЯ

ПРОВЕДЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ

1. Предварительная подготовка к отбору проб и тестированию должна обеспечивать подготовку посуды, мест хранения отобранных проб, а также подготовку рабочего места для обработки доставленных в лабораторию проб и исследования их на токсичность. Все процедуры предварительной подготовки должны исключить попадание токсичных, органических и каких-либо других веществ в исследуемую пробу.

2. В помещении, где содержатся лабораторные культуры тест-объектов, не должны храниться летучие вещества и проводиться работы с их применением, лабораторные помещения не должны обрабатываться инсектицидами.

3. Тестирование проводят при температуре окружающего воздуха в лаборатории от 18 до 25°C. Относительная влажность воздуха — 80±5%; атмосферное давление — 84–106 кПа (630–800 мм рт. ст.). Воздушная среда помещения не должна содержать токсичных паров и газов.

Температура воздуха в лаборатории при биотестировании на ракообразных должна быть 20±2°C, на водорослях — 21–25°C, при этом для каждого метода установлены свои температурные оптимумы, но для каждого отдельного теста должна быть постоянной в пределах ±1°C.

4. Освещение помещения при биотестировании на ракообразных и водорослях может быть естественным или искусственным. Не допускается попадание прямых солнечных лучей на тест-объект. Световой период: желательно проводить тест с чередованием циклов света и темноты 16 ч:8 ч либо 12 ч:12 ч с 15–30-минутным переходным периодом. Для поддержания светового режима рекомендуется использовать термолюминодат; температурного и светового – климатостат.

5. При использовании электроприборов частота переменного тока 50±1 Гц, напряжение сети — 220±10 В.

6. Для отбора, хранения проб и биотестирования пользуются посудой из стекла. Для культивирования тест-культур допускается также использование пластиковой посуды.

Посуда для отбора проб и биотестирования должна быть химически чистой. Ее промывают смесью бихромата калия и серной кислоты (хромовой смесью). Стенки посуды смачивают хромовой смесью, после чего на 2–3 ч посуду оставляют, затем тщательно промывают водопроводной водой, нейтрализуют раствором пищевой соды и промывают 3–4 раза дистиллированной водой. Для мытья посуды не разрешается пользоваться синтетическими поверхностно-активными веществами и органическими растворителями. Посуду для отбора проб сушат на воздухе, а используемую для тестирования (за исключением мерной) — в сушильном шкафу при 105°C в течение 1 ч.

7. Химически чистую посуду для тестирования хранят с закрытыми стеклянными притертыми пробками или завинчивающимися крышками в защищенных от пыли ящиках лабораторного стола либо на закрытых полках, стеллажах и т.п.

8. Для отбора и хранения проб используют стеклянную посуду, которую

заполняют под пробку и плотно закрывают. Объем пробы воды для определения интегральной токсичности должен быть в 2 раза больше требуемого для хранения дубликата пробы до конца тестирования.

9. Биотестирование проб воды проводят не позднее 6 ч после отбора, а при отсутствии такой возможности допускается биотестирование проб воды, которые хранились в темноте в доверху наполненной плотно закрытой посуде при температуре $4\pm 2^\circ\text{C}$ не более 72 ч.

10. Не допускается консервирование и замораживание проб, предназначенных для исследования на токсичность.

11. Перед биотестированием пробы воды перемешивают и фильтруют через фильтровальную бумагу. Если того требует цель биотестирования, пробы воды не фильтруют.

12. Извлечение водорастворимых форм химических соединений из твердых объектов. В сосуд помещают пробу или ее часть и заливают 5-кратным объемом (5 мл на 1 г пробы) дистиллированной воды ($\text{pH}=7,0-7,4$) и выдерживают в течение 24 ч; полученный экстракт тестируют на токсичность.

13. При тестировании объектов окружающей среды готовят разведения вод (сточных, питьевых и т. д.) и разведения водных вытяжек в последовательном ряду разведений, например: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, исходя из сведений о предполагаемой токсичности.

В дополнение к серии разведений тестируемых субстратов обязательна параллельная постановка контроля (разбавляющая вода).

14. Обязательна проверка лабораторных культур на пригодность для биотестирования. Для этого проводят тестирование растворов эталонных (референсных) веществ, на основании чего рассчитывают ЭК_{50} . Тест-объект должен реагировать на воздействие таких веществ в установленном диапазоне. Референсное вещество, длительность теста и стандартный диапазон реагирования на референсное вещество установлены для каждого метода индивидуально. Если полученная величина ЭК_{50} находится в установленном диапазоне реагирования тест-объекта, культура тест-объектов пригодна для биотестирования. В противном случае проверяют условия культивирования тест-объекта. При необходимости культуру заменяют.

15. Рекомендуемая форма отчета при тестировании на ракообразных и водорослях установлена в приложении 1 к настоящей инструкции.

Графический способ определения эффективных концентраций (ЭК_x), в т. ч. ЭК_{50} методом пробит-анализа с использованием программы Excel предложен в приложении 2 к инструкции.

ГЛАВА 6

МЕТОД ОЦЕНКИ ИНТЕГРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ПО ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЛАГ-ФАЗЫ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ

1. Ограничением при тестировании природных объектов с использованием

микроорганизмов как тест-моделей является высокая начальная контаминация объекта. При тестировании химических веществ и их смесей ограничением является их бактериостатическое действие.

2. Для приготовления рабочей культуры *Pseudomonas spp.* тест-штамм отсеивают на мясопептонный бульон и инкубируют в термостате при 30°C в течение 10 ч. Готовят суспензию тест-штамма в физиологическом растворе хлорида натрия и доводят содержание клеток до 10⁵ КОЕ/мл, используя стандарт мутности на 5 единиц. Подтверждение содержания клеток в рабочей культуре проводят путем высева на питательные агаризованные среды.

3. *Проведение испытания.* Приготовленную по п. 4, гл. 4 инструкции среду культивирования инокулируют рабочей культурой *Pseudomonas spp.*, разливают по 10 мл в ячейки анализатора с импедиметрическим принципом детекции. Подготовленные образцы стерильной пипеткой вносят в приготовленные культуральные среды. Тщательно перемешивают внесенные вещества по всему объему среды. В контрольные среды вместо образца вносят равный объем растворителя. Приготовленную среду разливают в измерительные ячейки анализатора по 10–15 мл, инокулируют 0,1–0,5 мл рабочей суспензии тест-штамма и инкубируют в термоинкубаторе при 28–30°C для определения продолжительности лаг-фазы роста культуры по показателю *DT*. Исследования проводят не менее чем в трех повторностях для каждого разведения.

4. Для оценки роста тест-штамма выбирают параметр детекции таким образом, чтобы кривая роста тест-культур на соответствующих питательных средах имела характерный вид: стабильную базовую линию, выраженную фазу быстрого роста культуры и значительные изменения электрохимических показателей среды.

5. Величину лаг-периода (длительность начальной фазы роста) определяют с использованием показателя *DT* микробиологического анализатора.

6. Для оценки интегральной токсичности пробы рассчитывают коэффициент *I* (степень ингибирования) по формуле:

$$T_i = \frac{DT_2}{DT_1},$$

где *T_i* — показатель интегральной токсичности;

DT₁ — время детекции в контроле (без исследуемой пробы);

DT₂ — время детекции в опыте (с исследуемой пробой).

По значению *T_i* судят об интегральной токсичности пробы:

- при *T_i* = 1 — проба не обладает токсичными свойствами;

- при *T_i* = 1,1–1,4 — степень интегральной токсичности пробы незначительная;

- при *T_i* ≥ 1,5 — степень интегральной токсичности пробы значительная.

7. Метрологические характеристики теста должны составлять: сходимость результатов определения параметра *T_i* — 5%, воспроизводимость результатов определения параметра *T_i* — 5%.

8. Параллельно проводится оценка токсического воздействия на тест-культуру по морфологическим маркерам. Готовят фиксированные препараты тест-культур для простого окрашивания метиленовым синим из контроля и опыта, микроскопируют не менее 5 полей зрения. Наличие атипичных клеточных форм свидетельствует о токсическом воздействии на культуру.

ГЛАВА 7

МЕТОД ОЦЕНКИ ИНТЕГРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВОДНЫХ РАКООБРАЗНЫХ *HETEROCYPRIS INCONGRUENS*

1. Метод оценки интегральной токсичности объектов окружающей среды с использованием водных ракообразных *Heterocypris incongruens* (Ramdohr, 1808) (Cyprididae, Crustacean) позволяет более объективно установить интегральную токсичность объектов окружающей среды, высокочувствителен к присутствию в окружающей среде таких загрязнителей, как тяжелые металлы, органические поллютанты, в частности хлорорганические пестициды.

2. Метод заключается в экспонировании ракообразных *H. incongruens* водными растворами тестируемых веществ либо их смесей в различных концентрациях в течение 72 ч. Интегральная токсичность исследуемых субстратов оценивается по их влиянию на подвижность животных за период экспозиции. В качестве иммобилизации животных расценивается отсутствие подвижности в течение 15 с после легкого встряхивания исследуемого субстрата.

Оценка интегральной токсичности основывается на установлении средней эффективной кратности разбавления вод (вытяжек), вызывающей иммобилизацию 50% тест-объектов за 72-часовую экспозицию (ЭКР₅₀₋₇₂), и безвредной кратности разбавления контролируемой воды (вытяжек), вызывающей иммобилизацию не более 10% тест-объектов за 72-часовую экспозицию (БКР₁₀₋₇₂).

3. Характеристика, условия поддержания лабораторной культуры и подходы к манипулированию установлены в протоколе поддержания культуры в приложении 3 к настоящей инструкции.

4. На этапе подготовки к тестированию проводят:

- сбор имеющейся доступной информации о тестируемом субстрате (происхождение, физическое состояние (жидкость, твердое), предполагаемые загрязнители, растворимость в воде и т. д.);

- разработку схемы исследований на основании анализа полученной информации (в зависимости от стойкости вещества выбор тест-системы (статической, проточной или полустатической);

- адаптацию культуры тест-организмов к тестовым условиям (температура, вода того же состава, что и используемая в тесте в качестве растворителя) в течение не менее 48 ч. Для исключения необходимости периода акклиматизации культивационная вода должна иметь сходный состав (рН, жесткость) с водой, используемой для теста;

- отбор животных для тестирования;

- не реже 1 раза в полгода проводят контроль чувствительности культуры

тестированием с референсным веществом (дихромат калия).

5. Целью тестирования является построение кривой «концентрация – ответ» на основании полученных данных и установление значения ЭК₅₀. В течение 72 ч тест-организмы экспонируют тестируемыми растворами (вытяжками) в диапазоне разведений (разведений вытяжек), не менее 20 животных на концентрацию, разделенных на группы по 10 особей.

6. Подбор тестируемых концентраций осуществляется в зависимости от целей исследования, вида исследуемой среды, наличия ориентировочной информации о степени токсичности. Как правило, при тестировании токсичности сточных вод используют концентрации 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,5; 0,78% от исходной; если предварительно известно, что концентрации обладают высокой токсичностью, их снижают.

7. В течение опыта животных не кормят. Учет реакции проводится через 24; 48 и 72 ч после начала тестирования. Учитываемый эффект — иммобилизация, ее определяют визуально или в световом микроскопе при увеличении в 2–7 раз.

8. Тестирование проводят в стеклянных химических стаканах объемом 250 мл.

9. Тест считается действительным, если иммобилизация в контроле не превышает 10%.

10. На основании результатов параллельных определений в контроле и опыте находят средние арифметические количества иммобилизованных животных в контроле (опыте). Тест действителен, если иммобилизация в контроле не превышает 10 %. Затем рассчитывают (%) количество иммобилизованных животных в опыте по отношению к контролю по формуле:

$$A = \frac{\bar{X}_k - \bar{X}_{on}}{\bar{X}_k} \cdot 100,$$

где \bar{X}_k — среднее арифметическое количество иммобилизованных животных в контроле;

\bar{X}_{on} — среднее арифметическое количество иммобилизованных животных в опыте.

11. Вывод о наличии или отсутствии острой токсичности пробы делают на основании величины А. Если величина $A \leq 10\%$, тестируемая проба не оказывает острого токсического действия (безвредная кратность разбавления). При $A \geq 50\%$ животных и более считают, что анализируемая проба проявляет острую токсичность, и для количественной оценки токсичности устанавливают ЭКР за 72 ч.

ГЛАВА 8

МЕТОД ОЦЕНКИ ИНТЕГРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВОДОРОСЛИ *CHLORELLA VULGARIS* ФЛЮОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

1. Метод оценки интегральной токсичности объектов окружающей среды с использованием водорослей флуориметрическим методом основан на регистрации

различий величины относительного показателя замедленной флуоресценции (ОПЗФ) тест-культуры водорослей *Chlorella sp.*, выделенной в естественных условиях на территории Республики Беларусь (представляющей собой не изолированную культуру водорослей, а смесь нескольких видов рода *Chlorella* (в т. ч. *Chlorella vulgaris*, *pyrenoidosa*, *kesslery*, *fuska*).

Использование предложенного способа позволяет: значительно сократить время исследований (в известном способе длительность экспозиции составляет 72 ч, в предложенной модификации — 1 ч); расширить перечень используемых методов оценки токсичности.

2. Характеристика тест-объекта: *Chlorella vulgaris* — широко распространенная одноклеточная зеленая пресноводная водоросль. Для биотестирования используется лабораторная культура ЦГ-4, полученная и содержащаяся в рабочей коллекции ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены».

3. Характеристика, условия поддержания лабораторной культуры и подходы по манипулированию установлены в протоколе поддержания культуры в приложениях 4 и 5 к настоящей инструкции.

4. Не реже 1 раза в месяц культуру водорослей проверяют на пригодность для биотестирования. Для этого устанавливают ЭК₅₀₋₄₈ раствора эталонного вещества К₂Сг₂О₇, биотестирование продолжается 48 ч, рассчитывают процент снижения численности клеток водорослей в протестированных растворах по сравнению с контролем и определяют концентрацию К₂Сг₂О₇, вызывающую уменьшение численности водорослей на 50% за 48 ч (ЭК₅₀₋₄₈). Диапазон реагирования тест-объекта должен быть ЭК₅₀₋₄₈ = 1,3–2,5 мг/дм³ К₂Сг₂О₇.

5. В ходе эксперимента тест-организмы экспонируют тестируемыми растворами (вытяжками) в диапазоне разведений (разведений вытяжек), выбранных в геометрической прогрессии с отношением между ними от 1,5 до 2. Подбор тестируемых концентраций осуществляется в зависимости от целей исследования, вида исследуемой среды, наличия ориентировочной информации о степени токсичности. Как правило, при тестировании токсичности сточных вод используют концентрации 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,5 и 0,78% от исходной; если предварительно известно, что они обладают высокой токсичностью, концентрации снижают.

6. Используют альгологически чистую тест-культуру водоросли, находящуюся в экспоненциальной стадии роста. Приготовленная культура водоросли вносится по 2 мл в 6 стаканов с 18 мл контрольной и тестируемых проб воды. При этом в результате 10-кратного разбавления засеваемой культуры содержание элементов питания в тестируемой воде, необходимых для обеспечения роста клеток водоросли, будет соответствовать 1% среде Тамия, а исходная оптическая плотность тест-культуры водоросли будет равна 0,040±0,002. Содержимое каждого стакана разливается по 4 мл во флаконы-реакторы (по 4 флакона на каждый вариант тестируемой воды, включая контрольную пробу).

7. В ходе эксперимента регистрируются различия в величине ОПЗФ тест-культуры водоросли, экспонируемой в течение 1 ч в среде, не содержащей токсических веществ (контроль), и тестируемых пробах воды (сточной, грунтовой,

питьевой и т. д.), а так же вытяжках.

8. Величина ОПЗФ суспензии водорослей в виде соотношения индукционных максимумов замедленной флюоресценции (послесвечения), регистрируемых в течение нескольких секунд при импульсном возбуждении светом высокой и низкой интенсивности, позволяет оперативно выявлять различия в фотосинтетической активности тест-организма в контрольном и опытном вариантах острого токсикологического эксперимента. Поскольку ОПЗФ параметр относительный, его величина не зависит от мутности и цветности тестируемых сред. В то же время при подавлении загрязняющими веществами фотосинтетической функции водоросли значение ОПЗФ многократно снижается, а при стимуляции — возрастает.

9. Критерием токсичности пробы является уменьшение величины ОПЗФ на 25% и более или увеличение на 25% и более при экспонировании суспензии водоросли в течение 1 ч в тестируемой среде по сравнению с этим показателем в контрольной среде, приготовленной на дистиллированной воде.

ГЛАВА 9

МЕТОД ОЦЕНКИ ИНТЕГРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ПО ИЗМЕНЕНИЮ ДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ТЕСТ-КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

1. Оценка интегральной токсичности объектов окружающей среды по изменению дегидрогеназной активности тест-культуры микроорганизмов основана на способности клеток тест-штамма *Arthrobacter spp.* ЦГ-2 восстанавливать метиленовый синий в микроаэрофильных условиях при добавлении раствора глюкозы.

2. Метиленовый синий играет в этой системе роль одновременно акцептора водорода и индикатора, позволяющего судить о повреждающем действии токсикантов на клеточные дегидрогеназы.

3. Критерием токсического действия является увеличение времени обесцвечивания метиленового синего в исследуемой пробе (параметр В) по сравнению с таковой для пробы с раствором, не содержащим токсических веществ (B_0). Количественную оценку токсического эффекта проводят по индексу токсичности «Т».

Для приготовления рабочей культуры *Arthrobacter spp.* ЦГ-2 тест-штамм отсеивают на питательную среду по п. 3 (гл. 4) и инкубируют в термостате при 30°C в течение 10 ч. Готовят суспензию тест-штамма в физрастворе и доводят содержание клеток до 10^5 КОЕ/мл, используя стандарт мутности на 5 ед. Подтверждают содержание клеток в рабочей культуре путем высева на питательные агаризованные среды.

4. Для определения рабочей дозы готовят суспензию клеток тест-культуры со скошенного агара, используя 10 мл физиологического раствора хлорида натрия. За рабочую дозу принимали такую концентрацию клеток тест-культуры, которая приводит к обесцвечиванию 0,002% красителя метиленового синего в течение 1 ч при температуре 26–28°C в микроаэрофильных условиях при добавлении 0,4% глюкозы.

5. Полученную суспензию клеток титруют путем последовательных двукратных разведений в физиологическом растворе (объем 5 мл). Отбирают по 1 мл полученных разведений, пробирки встряхивают и термостатируют при 28°C в течение 3 ч для стабилизации ферментативной активности. Затем для создания микроаэрофильных условий в каждую пробирку вносят по 2 мл расплавленного и охлажденного до температуры (45±3)°C 1% питательного агара, содержащего 0,002% красителя метиленового синего и 0,4% глюкозы. Пробирки после встряхивания термостатируют при оптимальной температуре в течение 1 ч, после чего учитывают результат. Дыхательные ферменты бактериальных клеток тест-культур восстанавливают метиленовый синий в микроаэрофильных условиях, что выражается в обесцвечивании. Наибольшее разведение тест-культуры, вызвавшее обесцвечивание, принимают за рабочую дозу.

6. При проведении испытания пробы стерильной пипеткой вносят в пробирки с рабочей дозой тест-культур. Тщательно перемешивают внесенные пробы по всему объему среды. В контрольные среды вместо пробы вносят равный объем растворителя. Затем для создания микроаэрофильных условий в каждую пробирку вносят по 2 мл расплавленного и охлажденного до температуры (45±3)°C 1% питательного агара, содержащего 0,002% красителя метиленового синего и 0,4% глюкозы.

7. Для оценки токсического действия пробирки после встряхивания термостатируют при оптимальной температуре в течение 1 ч, после чего учитывают результат, используя параметр В (ч). За В принимают время, в течение которого произошло полное обесцвечивание метиленового синего в пробирке, содержащей рабочую дозу тест-штамма.

8. Количественная оценка параметра тест-реакции выражается в виде безразмерной величины — индекса токсичности «Т», равного отношению:

$$T_i = 100 (B_0 -) / B_0,$$

где B_0 и В соответственно время обесцвечивания метиленового синего в контроле и опыте при фиксированной рабочей дозе тест-штамма.

9. Метод допускает три пороговых уровня индекса токсичности:

- допустимая степень токсичности пробы: индекс токсичности T_i менее 20;
- проба токсична: индекс T_i равен или более 20 и менее 50;
- проба сильно токсична: индекс токсичности T_i равен или более 50.

ГЛАВА 10

МЕТОД ОЦЕНКИ ИНТЕГРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ ТЕСТ-ОБЪЕКТОВ РАКООБРАЗНЫХ *DAPHNIA MAGNA*

1. Метод основан на определении иммобилизации дафний *Daphnia magna* (*Cladocera*, *Crustacea*) при воздействии химических веществ, присутствующих в исследуемой водной среде, по сравнению с контрольной культурой в пробах, не

содержащих токсических веществ (контроль).

2. Интегральная токсичность объектов окружающей среды определяется по иммобилизации животных за определенный период экспозиции нативными водами (сточными, природными) или водными вытяжками из проб (отходы, почва и т.д.). Критерием острой токсичности служит иммобилизация 50% и более животных за 48 ч в исследуемом образце при условии, что в контрольном эксперименте иммобилизация не превышает 10%.

3. В эксперименте по определению острого токсического действия устанавливают среднюю эффективную концентрацию отдельных веществ ($ЭК_{50}$) и среднюю эффективную кратность разбавления вод ($ЭКР_{50}$), безвредную кратность разбавления вод ($БКР_{10}$).

4. Температура воздуха в лаборатории при биотестировании должна составлять $20 \pm 2^\circ\text{C}$, но для каждого отдельного теста она постоянна в пределах $\pm 1^\circ\text{C}$.

5. Культивирование тест-культуры

5.1. В качестве тест-объектов используют лабораторные культуры дафний — *Daphnia magna* (*Cladocera*, *Crustacea*).

5.2. Культуры выращивают в стеклянной посуде.

5.3. Для культивирования используют питьевую водопроводную воду, которую предварительно отстаивают (для дехлорирования и насыщения кислородом) не менее 3 сут либо бутилированную питьевую воду.

5.4. Кормление осуществляется 1 раз в 1 сут, используют комбинированное дрожже-водорослевое питание.

В качестве водорослевого корма рекомендуется использовать зеленые протококковые водоросли *Chlorella vulgaris*, вносимые в культуру ракообразных из расчета поддержания концентрации 10^5 кл./мл. Суспензию водорослей получают центрифугированием культуры водорослей. Надосадочную жидкость сливают, а осадок разбавляют дистиллированной водой и используют в качестве корма. Хранение суспензии осуществляется в холодильнике (от $+2$ до $+4^\circ\text{C}$) не более недели, не допуская замораживания. Перед кормлением температуру водорослевой суспензии доводят до комнатной.

Для приготовления дрожжевой суспензии 1 г свежих или 0,5 г сухих хлебопекарных дрожжей заливают 100 см^3 дистиллированной воды. После набухания дрожжей суспензию тщательно перемешивают и отстаивают в течение 30 мин. Надосадочную жидкость добавляют в посуду с дафниями в количестве 3 см^3 на 1 дм^3 воды 1–2 раза в неделю.

5.5. В лаборатории содержат два вида культуры *D. magna*: маточную (массовую), используемую как источник для возобновления в периоды потери культуры синхронизированной, и синхронизированную одновозрастную, применяемую непосредственно в эксперименте.

Маточная культура поддерживается в одном или двух сосудах, ее плотность 20–25 особей в 1 л (дафнии). Не допускается использование молоди маточной культуры для биотестирования.

Биотестирование проводят только на синхронизированных культурах. Синхронизированной является одновозрастная культура, полученная от одной самки путем ациклического партеногенеза в 3-м поколении. Она генетически однородна.

Для получения такой культуры дафний самку средних размеров с выводковой камерой, заполненной эмбрионами, помещают в химический стакан объемом 250 мл и вносят корм. Появившаяся молодь переносится в культиватор (стеклянная посуда емкостью 2,0 л) и культивируется указанным способом. Для получения необходимого количества тест-объектов 20–30 самок дафний из 2-го поколения с выводковыми камерами, полными яиц или зародышей, за 1 сут до биотестирования отсаживают в стеклянную посуду емкостью 0,5–1,0 л и вносят корм. После появления молоди (каждая самка может выметать от 10 до 40 молодых дафний) взрослые особи удаляют. Полученная молодь (3-я генерация) является синхронизированной культурой и может быть использована для биотестирования в возрасте 6–24 ч.

5.6. Пересаживают животных при помощи стеклянной трубки внутренним диаметром 5–7 мм (дафнии), чтобы их не травмировать. Конец трубки помещают под поверхность воды и держат до тех пор, пока животные не перейдут в трубку.

5.7. В течение 1 мес. до и в период постановки эксперимента в культуре не должно наблюдаться признаков стресса: высокой смертности, присутствия мужских особей, эффипий (для дафний), аномального поведения животных.

6. Не реже одного раза в 6 мес. культуры проверяют на пригодность к биотестированию с использованием в качестве эталонного вещества двуххромовокислого калия ($K_2Cr_2O_7$).

С этой целью устанавливают ЭК₅₀ за 24 ч (ЭК_{50–24}). Для дафний диапазон реагирования тест-объекта равен 0,6–1,7 мг/л $K_2Cr_2O_7$.

7. Для исключения необходимости периода акклиматизации культуры перед биотестированием рекомендуется, чтобы вода, в которой культивируется тест-организм, имела сходный состав (рН, жесткость) с водой, используемой в качестве разбавляющей для теста. В противном случае культуру адаптируют к тестовым условиям (температура, вода того же состава, что и разбавляющая в тесте) в течение не менее 48 ч.

8. Приготовление разведений из вытяжек тестируемых объектов заданных концентраций:

8.1. Для биотестирования готовят исходный раствор путем разведения исследуемых вытяжек. Для этих целей может использоваться бутилированная питьевая, дехлорированная водопроводная либо восстановленная вода. Рекомендуемыми параметрами качества воды, применяемой в этих целях, являются: жесткость (по $CaCO_3$) не более 180 мг/л, химическая потребность в кислороде не более 5 мг/дм³, содержание взвешенных частиц не более 20 мг/л, остаточного хлора — не более 3 мкг/л, общих фосфор-органических пестицидов — не более 50 нг/л, органического хлора — не более 25 нг/л, органических веществ в пересчете на углерод — не более 2 мг/л.

8.2. Восстановленную воду готовят в соответствии с ИСО 6341.

8.3. Выбранные разведения готовятся разведением исходных сточных, природных вод либо вытяжек из тестируемых объектов.

Для определения медианной эффективной кратности разбавления пробы воды (ЭКР₅₀) готовят серию (не менее пяти) разбавлений пробы воды.

8.4. Если используется вспомогательное вещество, все тестируемые растворы должны содержать его в равных количествах. Обязательно введение дополнительного контроля, содержащего эквивалентное используемому в сериях разведений количество вспомогательного вещества. Концентрации данных веществ должны быть минимальными, но в любом случае не превышающими 100 мг/л.

9. В ходе эксперимента ракообразные в течение 48 ч (*D.magna*) подвергаются воздействию растворенного в воде вещества в диапазоне концентраций.

10. Посуда для проведения опытов: 250-миллиметровые стеклянные химические стаканы.

11. Загрузка: в каждый опытный и контрольный сосуд помещают по 10 животных. Повторность в опыте и контроле 3-кратная.

12. Тест-организмы: молодь *D. magna* в возрасте 6–24 ч.

13. Кормление: в течение теста животных не кормят, последнее кормление — за 2–3 ч до начала биотестирования.

14. Температура: должна быть $20 \pm 2^\circ\text{C}$, но для каждого отдельного теста она постоянна в пределах $\pm 1^\circ\text{C}$.

15. Учет результатов: через 24, 48 ч подсчитывают количество иммобилизованных животных. Иммобилизация определяется визуально в проходящем свете после легкого встряхивания исследуемого субстрата, а при необходимости — микроскопированием. Иммобилизованных животных удаляют из сосудов после регистрации наблюдений.

16. Тест заключается в экспонировании животных пятью и более разведениями вод (водных вытяжек) в концентрациях 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,5 и 0,78% от исходной. Если предварительно известно, что воды (водные вытяжки) обладают гипертоксичностью, исследуемые разведения уменьшаются до 10; 3; 0,3 и 0,1%. Цель метода — на основании полученных данных построить кривую зависимости «концентрация – ответ» и установить ЭК₅₀ за 48 ч.

17. Результаты испытания могут считаться достоверными при следующих условиях:

- иммобилизация в контроле не превышает 10%;
- значение рН варьирует не более чем на 1 единицу;
- содержание растворенного кислорода, определенное в конце эксперимента, не ниже 2 мг/л.

18. На основании результатов трех параллельных определений в контроле и опыте находят средние арифметические количества иммобилизованных животных в контроле (опыте). Затем рассчитывают (%) количество иммобилизованных животных в опыте по отношению к контролю по формуле:

$$A = \frac{\bar{X}_k - \bar{X}_{on}}{\bar{X}_k} \cdot 100,$$

где \bar{X}_k — среднее арифметическое количество иммобилизованных животных в контроле;

\bar{X}_{on} — среднее арифметическое количество иммобилизованных животных в опыте.

Вывод о наличии или отсутствии токсичности пробы воды, вещества (смеси веществ) делают на основании величины A .

Если величина $A \leq 10\%$, тестируемая проба не оказывает токсического действия (безвредная кратность разбавления). При $A \geq 50\%$ животных и более считают, что анализируемая проба проявляет токсичность.

19. Если проба проявляет токсичность, то для количественной оценки токсичности анализируемой пробы воды устанавливают ее среднее эффективное разбавление за 48 ч биотестирования (ЭКР₅₀₋₄₈).

20. Если экспериментально не удалось получить точные значения кратности разбавления, вызывающие 10 и 50%-й эффект за 48-часовую экспозицию, то для получения ЭКР₅₀, ЭК₅₀ и БКР₁₀ без дополнительных экспериментов их определяют графическим способом для каждого из рекомендуемых периодов наблюдения (24, 48, 96 ч) в соответствии с приложением 2 к настоящей инструкции.

21. Отчет о проведении теста должен включать информацию, указанную в приложении 1 к настоящей инструкции.

22. Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности проводят в объеме 5% от количества текущих измерений по данным двух определений токсичности анализируемых проб воды, разведений вытяжек, полученных в условиях воспроизводимости (ЭКР₁, ЭКР₂ или ЭК₁, ЭК₂).

23. Решение об удовлетворительности воспроизводимости определений принимается при условии:

$$\frac{2|ЭК_1 - ЭК_2|}{ЭК_1 + ЭК_2} \cdot 100\% \leq D,$$

где D — норматив оперативного контроля воспроизводимости — 94%.

ГЛАВА 11

МЕТОД ОЦЕНКИ ИНТЕГРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ПО ИЗМЕНЕНИЮ СОДЕРЖАНИЯ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА В ТЕСТ-КУЛЬТУРЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

1. При оценке интегральной токсичности объектов окружающей среды в качестве маркера, характеризующего течение деструктивных окислительных процессов и перекисного окисления липидов, используют определение малонового диальдегида в культуре микроорганизма *Rhodococcus spp.* Это дает возможность выявлять механизм интегрального токсического воздействия.

2. Метод основан на реакции малонового диальдегида с 2-тиобарбитуровой кислотой, в ходе которой при высокой температуре и кислом значении pH образуется окрашенный триметиновый комплекс, содержащий 1 молекулу малонового диальдегида и 2 молекулы 2-тиобарбитуровой кислоты. Далее

триметиновый комплекс определяют спектрофотометрически.

Для приготовления рабочей культуры *Rhodococcus spp.* ЦГ-4 тест-штамм отсеивают на питательную среду по п. 2, гл. 4 и инкубируют в термостате при 30°C в течение 10 ч. Готовят суспензию тест-штамма в физрастворе и доводят содержание клеток до 10⁵ КОЕ/мл, используя стандарт мутности на 5 единиц. Подтверждение содержания клеток в рабочей культуре проводят путем высева на питательные агаризованные среды.

3. *Ход определения.* В реакционную смесь, содержащую 3 мл 2% раствора ортофосфорной кислоты и 1 мл 0,8% раствора тиобарбитуровой кислоты, вносят 0,1 мл культуры тест-штамма *Rhodococcus spp.*, разведенной в 10 раз буфером (5 мМ ЭДТА, 150 мМ NaCl, 50 мМ Tris – HCl). Смесь инкубируют 45 мин на водяной бане. Затем смесь охлаждают до комнатной температуры и экстрагируют окрашенный продукт 4 мл бутанола при встряхивании в течение 1 мин. После экстракции бутанол отделяют, для растворения посторонних примесей в бутанол добавляют 50 мкл этилового спирта. Для приготовления стандартной пробы в реакционную смесь добавляют 0,1 мл 5 мкМ 1,1,3,3-тетраметоксипропана в бутаноле. Оптическую плотность органической фракции с учетом оптической плотности холостой пробы измеряют на спектрофотометре при длине волны 532 нм.

4. Содержание малонового диальдегида в пробе (X, нмоль/мл) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D_{\text{проба}}}{D_{\text{стандарт}}} \times \frac{50}{V},$$

где D_{проба} — оптическая плотность пробы;

D_{стандарт} — оптическая плотность стандарта;

50 — коэффициент пересчета на мл;

V — объем разведенной культуры в пробе, мл.

5. Рассчитывают коэффициент токсичности T по формуле:

$$T = 100(X_0 - X) / X_0,$$

где X₀ и X — содержание малонового диальдегида в пробе контроля и опыта соответственно.

6. Метод допускает три пороговых уровня индекса токсичности:

- допустимая степень токсичности пробы: индекс токсичности T_i менее 20;
- проба токсична: индекс T_i равен или более 20 и менее 50;
- проба сильно токсична: индекс токсичности T_i равен или более 50.

ГЛАВА 12

МЕТОД ОЦЕНКИ ИНТЕГРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-КУЛЬТУРЫ ВОДОРΟΣЛЕЙ *SCENEDESMUS SUBSPICATUS*

1. Метод биотестирования с использованием тест-культуры пресноводных одноклеточных протококковых водорослей *Scenedesmus subspicatus* основан на установлении различия между интенсивностью роста водорослей в анализируемой пробе (опыт) и культуральной среде (контроль).

Критерием острого токсического действия исследуемой пробы является снижение на 50% и более численности клеток водорослей в опыте по сравнению с контролем за 72 ч биотестирования при условии, что в контрольном эксперименте снижение численности клеток не превышает 10%.

Для количественной оценки токсичности пробы раствора устанавливают среднюю эффективную концентрацию за 72 ч ($ЭК_{50-72}$) или безвредную (не вызывающую эффекта острой токсичности) кратность разбавления вод (БКР₁₀).

2. Тест-объект.

Для биотестирования используют лабораторную альгологически чистую культуру одноклеточных протококковых водорослей *Scenedesmus subspicatus*, находящуюся в экспоненциальной стадии роста (3-суточную). Для поддержания экспоненциальной стадии роста водорослей пересев осуществляется регулярно 1 раз в 7 сут. Поддержание лабораторной культуры, методика приготовления питательных сред для культур водорослей, техника подсчета плотности культуры изложены в приложениях 4–6 к инструкции.

3. Процедура биотестирования и измерения.

В ходе эксперимента тест-объект в течение 72 ч подвергается воздействию растворенного в воде вещества в диапазоне концентраций.

В конические колбы вместимостью 250 мл разливают по 100 мл среды Прата (контроль), в другие колбы — исследуемые пробы воды (водной вытяжки), бурового раствора (опыт). Заполнение опытных колб (в различных разбавлениях) проводят следующим образом:

- без разбавления — 100 мл исследуемой пробы;
- разбавление в 2 раза — 50 мл исследуемой пробы и 50 мл среды;
- разбавление в 10 раз — 10 мл пробы и 90 мл среды;
- разбавление в 100 раз — 1 мл пробы и 99 мл среды;
- разбавление в 1000 раз — 0,1 мл пробы и 99,9 мл среды.

В опытные колбы вносят исследуемую пробу, затем питательную среду. После в опытные и контрольные колбы вносят по 0,5 мл исходной культуры водорослей в экспоненциальной фазе роста численностью около 5×10^6 кл./мл (при этом численность клеток водорослей в опытных и контрольных колбах в начале биотестирования должна составлять не менее 30×10^3 кл./мл при подсчете в счетной камере и не менее 50×10^3 кл./мл — при подсчете оптическим методом).

В контроль кроме водорослей ничего не вносят. Колбы закрывают ватно-марлевыми пробками, встряхивают. Экспонируют, соблюдая вышеуказанные условия. Содержимое каждой колбы перемешивают 1–2 раза/сут. По ходу

эксперимента численность клеток считают ежедневно, тщательно перемешивая содержимое колб. Через 72 ч биотестирование прекращают. В каждой колбе подсчитывают численность клеток водорослей.

4. Статистическая обработка данных.

На основании результатов подсчета клеток в каждой капле рассчитывают численность клеток водорослей (кл./мл) в контроле и опыте, для каждого параллельного определения в опыте и контроле вычисляют среднее арифметическое численности клеток водорослей в 1 мл. Рассчитывают численность клеток водорослей в опыте (%) от их численности в контроле по формуле:

$$P = \frac{\bar{X}_{оп}}{\bar{X}_к} \cdot 100,$$

где P — численность клеток водорослей в опыте, %;

$\bar{X}_{оп}$ — среднее арифметическое численности клеток водорослей в опыте, кл./мл;

$\bar{X}_к$ — среднее арифметическое численности клеток водорослей в контроле, кл./мл.

Проба считается токсичной, если величина P составляет 50% и менее.

Для количественной оценки токсичности вод (водных вытяжек) устанавливают ЭК₅₀ за 72 ч биотестирования. Методика расчета ЭК₅₀, ЭК₁₆ и ЭК₈₄ описана в приложении 2 к инструкции.

5. Норматив оперативного контроля воспроизводимости метода составляет 45%.

ГЛАВА 13

МЕТОД ОЦЕНКИ ИНТЕГРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ В КАЧЕСТВЕ ТЕСТ-ОБЪЕКТОВ РАКООБРАЗНЫХ *CYPRIDOPSIS VIDUA*

1. Метод основан на использовании в качестве тест-объекта низших ракообразных *Cypridopsis vidua* (*Ostracoda*, *Crustacea*) и определении их иммобилизации при воздействии химических веществ, присутствующих в исследуемой водной среде, по сравнению с контрольной культурой в пробах, не содержащих токсические вещества (контроль).

2. Токсическое действие исследуемых объектов окружающей среды выявляется по иммобилизации животных за определенный период экспозиции нативными водами (сточными, природными) или водными вытяжками из проб (отходы, почва и т. д.). Критерием острой токсичности служит иммобилизация 50% и более животных за 96 ч экспозиции в исследуемой пробе при условии, что в контрольном эксперименте иммобилизация не превышает 10%.

3. В эксперименте по определению острого токсического действия устанавливают:

- среднюю эффективную кратность разбавления вод (водных вытяжек) — ЭКР₅₀;

- безвредную (не вызывающую эффекта острой токсичности) кратность разбавления вод (БКР₁₀).

4. Способ обработки и оценки результатов биотестирования основан на стандартных и широко используемых в отечественной и международной практике методах статистической обработки экспериментальных данных.

5. Культивирование тест-культуры

5.1. В качестве тест-объектов используют лабораторные культуры ракообразных *Cypridopsis vidua* (Ostracoda, Crustacea).

5.2. Для культивирования используют питьевую водопроводную воду, которую предварительно отстаивают (для дехлорирования и насыщения кислородом) не менее 3 суток либо бутилированную питьевую воду.

5.3. Кормление осуществляется один раз в сутки, питание — водорослевое. В качестве водорослевого корма рекомендуется использовать зеленые протококковые водоросли *Chlorella vulgaris*, вносимые в культуру ракообразных из расчета поддержания концентрации 10⁵ кл./мл. Суспензию водорослей получают центрифугированием культуры водорослей. Надосадочную жидкость сливают, а осадок разбавляют дистиллированной водой и используют в качестве корма. Хранение суспензии осуществляется в холодильнике (от +2 до +4°C) не более недели, не допуская замораживания. Перед кормлением температуру водорослевой суспензии доводят до комнатной.

5.4. В лаборатории содержат два вида культуры *C. vidua*: маточную (массовую), используемую как источник для возобновления в периоды потери культуры синхронизированной, и синхронизированную одновозрастную, применяемую непосредственно в эксперименте.

Маточная культура поддерживается в одном или двух сосудах, ее плотность 30–50 особей в 1 л. Не допускается использование молоди маточной культуры для биотестирования.

Биотестирование проводят только на синхронизированных культурах. Синхронизированной является одновозрастная культура, полученная от одной самки путем ациклического партеногенеза в третьем поколении. Такая культура генетически однородна.

Для получения синхронизированной культуры *C. vidua* в стеклянную посуду вместимостью 1 л помещают 30–50 взрослых особей с яйцом в выводковой камере. Каждую последующую неделю взрослых особей отсаживают в посуду со свежей водой. Из молодой культуры в возрасте 1–2 недель за 1 сут до эксперимента в отдельный сосуд отбирают подвижных юных особей, из которых для опыта берут животных размером не более 0,3 мм. Размер определяется по длине раковинки. Для биотестирования используют молодь *C. vidua* не старше 2 недель и размером не более 0,3 мм.

5.5. Пересаживают животных при помощи стеклянной трубки внутренним диаметром 2–3 мм так, чтобы их не травмировать. Для этого конец трубки помещают под поверхность воды и держат до тех пор, пока животные не перейдут в трубку.

5.6. В течение 1 мес. до и в период постановки эксперимента в культуре не должно наблюдаться признаков стресса: высокой смертности, присутствия мужских

особей, аномального поведения животных.

5. Не реже одного раза в 6 мес. культуры проверяют на пригодность к биотестированию с использованием в качестве эталонного вещества двуххромовокислого калия ($K_2Cr_2O_7$).

С этой целью устанавливают среднюю эффективную концентрацию за 96 ч биотестирования ($ЭК_{50-96}$). Диапазон реагирования определяется для лаборатории, в которой содержится культура.

6. Для исключения необходимости периода акклиматизации культуры перед биотестированием рекомендуется, чтобы вода, в которой культивируется тест-организм, имела сходный состав (рН, жесткость) с водой, используемой в качестве разбавляющей для теста. В противном случае культуру адаптируют к тестовым условиям (температура, вода того же состава, что и применяемая в тесте разбавляющая) в течение не менее 48 ч.

7. Выбранные тестовые концентрации готовятся разведением исходных сточных, природных вод либо водной вытяжки из тестируемого субстрата.

Для определения средней эффективной кратности разбавления пробы воды ($ЭКР_{50}$) готовят серию (не менее 5) разбавлений пробы воды (водных вытяжек).

При тестировании сточных вод *C. vidua* экспонируют сточными водами в концентрациях 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,5 и 0,78% от исходной. Если предварительно известно, что сточные воды (водные вытяжки) обладают гипертоксичностью, исследуемые концентрации уменьшаются до 10; 3; 0,3 и 0,1%.

8. В качестве разбавляющей воды при приготовлении серии разведений может использоваться бутилированная питьевая, дехлорированная водопроводная либо восстановленная вода.

8.1. Рекомендуемые параметры качества воды, используемой в этих целях: жесткость (по $CaCO_3$) не более 180 мг/л, химическая потребность в кислороде не более 5 мг/л, содержание взвешенных частиц не более 20 мг/л, остаточного хлора — не более 3 мкг/л, общих фосфорорганических пестицидов — не более 50 нг/л, органического хлора — не более 25 нг/л, органических веществ в пересчете на углерод — не более 2 мг/л.

8.2. Восстановленную воду готовят в соответствии с ИСО 6341.

8.3. Посуда для проведения опытов: 250-миллилитровые стеклянные химические стаканы.

9. В ходе эксперимента ракообразные в течение 96 ч экспонируются 5 и более концентрациями вод (разведений водных вытяжек). Цель биотестирования — на основании полученных данных построить кривую зависимости «концентрация — ответ» и установить значения $ЭК_{50}$ за 96 ч экспозиции.

10. Условия проведения эксперимента

10.1. Загрузка: в каждый опытный и контрольный сосуд помещают по 10 животных.

10.2. Повторность в опыте и контроле 3-кратная.

10.3. Тест-организмы: молодь *C. vidua* не старше 2 недель и размером не более 0,3 мм.

10.4. Кормление: в течение теста животных не кормят, последнее кормление — за 2–3 ч до начала биотестирования.

10.5. Температура: должна быть $20 \pm 2^\circ\text{C}$, но для каждого отдельного теста она постоянна в пределах $\pm 1^\circ\text{C}$.

10.6. Учет результатов: через 24, 48 и 96 ч подсчитывают количество иммобилизованных животных.

Определение иммобилизации проводится визуально в проходящем свете после легкого встряхивания исследуемого субстрата, а при необходимости – микроскопированием. Иммобилизованных животных удаляют из сосудов после регистрации наблюдений.

11. Сразу же после учета эксперимента определяют концентрацию растворенного кислорода в экспериментальных сосудах, соответствующих самой низкой концентрации, при которой все животные становятся неподвижными (при необходимости для этого соединяют содержимое сосудов, соответствующих такой концентрации, в один сосуд, соблюдая необходимые требования предосторожности, чтобы не изменить концентрацию растворенного кислорода).

12. Результаты испытания могут считаться достоверными при следующих условиях:

- иммобилизация в контролях не превышает 10%;
- значение рН варьирует не более чем на 1 единицу;
- содержание растворенного кислорода, определенное в конце эксперимента не ниже 2 мг/л.

13. На основании результатов трех параллельных определений в контроле и опыте находят средние арифметические количества иммобилизованных животных в контроле (опыте). Затем рассчитывают (%) количество иммобилизованных животных в опыте по отношению к контролю по формуле:

$$A = \frac{\bar{X}_k - \bar{X}_{on}}{\bar{X}_k} \cdot 100,$$

где \bar{X}_k — среднее арифметическое количество иммобилизованных животных в контроле;

\bar{X}_{on} — среднее арифметическое количество иммобилизованных животных в опыте.

Вывод о наличии или отсутствии токсичности пробы делают на основании величины А.

Если величина $A \leq 10\%$, тестируемая проба не оказывает острого токсического действия (безвредная кратность разбавления). При $A \geq 50\%$ животных и более считают, что анализируемая проба проявляет интегральную токсичность.

14. Если проба проявляет токсичность, то для количественной оценки токсичности анализируемой пробы устанавливают ее среднее эффективное разбавление за 48 ч биотестирования (ЭКР_{50-48}).

15. Если экспериментально не удалось получить точные значения кратности разбавления, вызывающие 10 и 50%-й эффект за 48/96-часовую экспозицию, то для получения значений ЭКР_{50} , ЭК_{50} и БКР_{10} без выполнения дополнительных

экспериментов их определяют графическим способом для каждого из рекомендуемых периодов наблюдения (24; 48 и 96 ч) в соответствии с приложением 2 к настоящей инструкции.

16. Значения $ЭК_x$ должны быть выражены в процентах либо в $см^3/л$ в случае использования сточных вод.

17. Отчет о проведении теста должен включать информацию, указанную в приложении 1 к настоящей инструкции.

18. Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности проводят в объеме 5% от количества текущих измерений по результатам двух расчетов токсичности анализируемых проб воды, разведений вытяжек, полученных в условиях воспроизводимости ($ЭКР_1$, $ЭКР_2$ или $ЭК_1$, $ЭК_2$).

19. Решение об удовлетворительности воспроизводимости определений принимается при условии:

$$\frac{2|ЭК_1 - ЭК_2|}{ЭК_1 + ЭК_2} \cdot 100\% \leq D,$$

где D — норматив оперативного контроля воспроизводимости — 94%.

**Рекомендуемая форма отчетности при тестировании
на ракообразных и водорослях**

№ п/п	Данные
1.	Информация о тестовых организмах: научное название, штамм, его источник, методика культивирования, метод кормления, любые манипуляции со штаммом в период подготовки к тестированию
2.	Все необходимые данные для идентификации проб или исследуемого вещества
3.	3.1. Методы приготовления проб: для сточных вод — способ и длительность хранения проб, условия, при которых в случае необходимости осуществляется осветление или фильтрация проб и размораживание для водных вытяжек — метод приготовления 3.2. Вода для разведения: ее характеристики (рН, температура, жесткость) 3.3. Перечень использовавшихся концентраций (разведений)
4.	Перечень оборудования, применяемого для проведения исследований
5.	Использовавшиеся методы химического анализа, полученные результаты
6.	Условия биотестирования: световой режим, концентрация растворенного кислорода, значения рН и температур тестовых растворов
7.	Результаты теста с эталонными веществами, если он проводился
8.	Результаты контрольного теста (если он проводился)
9.	Таблица, отражающая эффект на каждой концентрации (разведения), контроля со вспомогательными веществами (если используются) на каждый из рекомендуемых периодов наблюдения. Кривая концентрация/эффект
10.	Результат эксперимента в виде: ЭК ₅₀ (ЭКР ₅₀) для каждого из рекомендуемых периодов наблюдения (если возможно) и доверительный интервал БКР ₁₀ для каждого из рекомендуемых периодов наблюдения (если возможно) — для сточных и природных вод По возможности: наибольшая из протестированных концентраций, не вызвавшая иммобилизации, и наименьшая из протестированных концентраций, приведшая к иммобилизации 100% за время экспозиции Статистические процедуры, использовавшиеся для расчета параметров токсичности
11.	Всякое anomальное поведение животных в условиях эксперимента Любые отклонения от процедуры тестирования с указанием их причин, описание наблюдений, несвойственных обычному ходу эксперимента, представляющие интерес при интерпретации полученных результатов
12.	Заключение о токсичности

**Установление средней эффективной концентрации (ЭК₅₀)
и среднего эффективного разбавления (экр)**

Графический способ определения эффективных концентраций (ЭК_x), в т. ч. ЭК₅₀, предполагает их расчет методом пробит-анализа с использованием программы Excel. При расчете необходимо следовать следующему алгоритму.

1. На основании полученных в эксперименте результатов заполняют графы 1, 2 и 3 таблицы 1.

Таблица 1

Тестируемая концентрация вещества (С), мг/л либо концентрация сточных вод, %	Десятичный логарифм концентрации (lgC)	Эффект (количество иммобилизованных животных), %	Эффект (количество иммобилизованных животных), пробиты
1	2	3	4

2. Используя таблицу 2 для экспериментально установленных процентов иммобилизации животных, находят значения пробитов и заполняют графу 4.

3. В программе Excel строят точечный график, где по оси абсцисс откладывают десятичные логарифмы концентраций, а по оси ординат — соответствующий им эффект в пробитах.

4. Добавляют линейную линию тренда с выдачей уравнения регрессии.

5. Из уравнения регрессии рассчитывают значения x , соответствующие $y = 3,72$ (10% эффекта) и $y = 5$ (50% эффекта).

Учитывая, что $x = \lg C$, логарифмы концентраций переводят в концентрации и получают их значения, соответствующие эффекту 10 и 50% (БКР₁₀, ЭКР₅₀), определяют доверительный интервал ($p = 0,05$).

Таблица 2 — Перевод процентов в пробиты

Эффект, %	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,35	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,83	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,4	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33

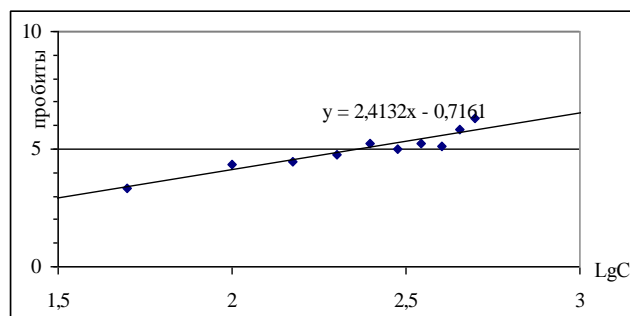


Рисунок — Установление ЭК₅₀ графическим способом

Если наклон кривой концентрация/процент ответа слишком крутой для расчета ЭК₅₀ (ЛК₅₀), достаточно графического определения этой величины. Если 2 последовательные концентрации, выбранные в геометрической прогрессии, дают 0 и 100% эффект, эти 2 величины достаточны для установления диапазона, в который попадает Э(Л)К₅₀.

6. Методика расчета ошибки (S_x):

$$S_x = \pm \frac{2\delta}{\sqrt{2N}},$$

где $2\delta = \text{Э(Л)К}_{84} - \text{Э(Л)К}_{16}$;

N — общее число животных, использованных для испытания доз, эффект которых лежит между 16% (4 пробита) и 84% (6 пробитов).

7. Определение доверительного интервала

Доверительный интервал Э(Л)К₅₀ находится в границах

$$\text{Э(Л)К}_{50} \pm S_x t,$$

где S_x — ошибка;

t — критерий Стьюдента, равный 1,96.

Протокол поддержания культуры водных ракообразных *Heterocypris incongruens* ЦГ-3

Характеристика тест-объекта

Heterocypris incongruens (Ramdohr, 1808) – водные ракообразные класса *Ostracoda*, таксономическая принадлежность и фенотипические признаки вида представлены на рис. 1. Для биотестирования используется лабораторная генетически однородная культура *Heterocypris incongruens* ЦГ-3, полученная и поддерживаемая в рабочей коллекции ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены».

Класс *Ostracoda*

Отряд *Podocopida*

Семейство *Cypridoidea*

Род *Heterocypris*

Вид *Heterocypris incongruens*
(Ramdohr, 1808)



Рисунок — *Heterocypris incongruens* (Ramdohr, 1808)

Морфология. Тело животных заключено в двустворчатую раковину длиной 1,4–1,6 мм (женские особи — до 1,8 мм) с латерально расположенными створками. Раковинка более высокая сзади и с более выпуклым длинным краем, чем спереди, спинной край спускается почти по прямой линии. Наибольшая высота находится несколько впереди задней 1/3 раковинки. Передний край широко закруглен. Задний край выше переднего и более узко закруглен. Брюшной край в средней части слабо вогнут. Сверху раковинка узко-яйцевидна, с закругленным задним и заостренным передним концом, причем передний край левой створки явственно превосходит передний край правой, снабженный шиповидными округленными бугорками. Наибольшая ширина раковинки едва достигает S длины ее и находится несколько позади ее середины. Окраска раковинки от грязно-желтого до темнокрасновато-коричневого цвета.

2. Условия содержания лабораторной культуры

Лабораторные условия:

- ✓ температура воздуха — $20 \pm 2^\circ\text{C}$;
- ✓ освещение помещения: естественное или искусственное, не допускается попадание прямых солнечных лучей на тест-объект;
- ✓ световой период: чередование циклов света и темноты 16 ч:8 ч либо 12 ч:12 ч с 15–30-минутным переходным периодом;
- ✓ для поддержания светового и температурного режима рекомендуется использовать термолюминодат.

Посуда для культивирования: инертная (стеклянная) посуда — стеклянные стаканы.

Манипуляции: для пересадки животных используют стеклянные трубки внутренним диаметром 2–3 мм. Для того чтобы не травмировать животных, конец трубки помещают под поверхность воды и держат до тех пор, пока животные не перейдут в трубку.

Среда для культивирования: питьевая водопроводная вода, предварительно отстоявшаяся (для дехлорирования и насыщения кислородом) не менее 3 сут либо бутилированная питьевая вода, где содержание растворенного кислорода не ниже 2 мг/дм³.

Кратность кормления: не реже 1 раза/сут.

Вид питания: водорослевое. В качестве водорослевого корма рекомендуется использовать зеленые протококковые водоросли *сценедесмус* или *хлореллу*. Водоросли должны вноситься в культуру ракообразных из расчета поддержания концентрации 10⁵ кл./мл (на 2-литровую емкость примерно 1 мл суспензии водорослей плотностью 3×10⁸ кл./мл). Суспензию водорослей получают центрифугированием культуры водорослей. Надосадочную жидкость сливают, а осадок разбавляют дистиллированной водой и используют в качестве корма. Хранение суспензии осуществляется при температуре +2 до +4°С не более недели, не допуская замораживания. Перед кормлением температуру водорослевой суспензии доводят до комнатной.

Виды культуры: в лаборатории должны содержаться 2 вида культуры ракообразных: *маточная* (используемая как источник для возобновления в периоды потери культуры синхронизированной) и *синхронизированная* (используемая непосредственно в эксперименте, — генетически однородная одновозрастная культура, полученная от одной самки путем ациклического партеногенеза в 3-м поколении).

Маточная культура поддерживается в 1 или 2 сосудах, ее плотность 30–50 особей в 1 л. Не допускается использование молоди маточной культуры для биотестирования.

Синхронизацию культуры осуществляют механическим методом:

- в стеклянную посуду вместимостью 2,0 л помещают 25–30 взрослых особей *Heterocypris incongruens* с яйцом в выводковой камере;
- каждую неделю взрослые особи отсаживают в посуду со свежей водой;
- из молодой культуры в возрасте 1–2 недель за сут до проведения эксперимента в отдельный сосуд отбирают подвижные юные особи размером 0,1–0,2 мм.

3. Оценка пригодности тест-культуры для биотестирования

В течение 1 мес. до и в период постановки эксперимента в культуре не должно наблюдаться признаков стресса: высокой смертности, присутствия мужских особей, аномального поведения животных.

Не реже 1 раза в 6 мес. культуру проверяют на пригодность к биотестированию с использованием в качестве эталонного вещества двухромовокислого калия (K₂Cr₂O₇).

С этой целью устанавливают среднюю эффективную концентрацию за 96 ч биотестирования (ЭК₅₀₋₉₆). Если полученный ЭК₅₀₋₉₆ находится в экспериментально установленных диапазонах реагирования тест-объектов, культуры пригодны для

биотестирования. Если нет — проверяют условия культивирования тест-объекта. При необходимости культуру заменяют новой.

Диапазон реагирования культуры Heterocypris incongruens ЦГ-3 должен находиться в пределах от 0,5 до 2 мг/л $K_2Cr_2O_7$.

4. Акклиматизация тест-культуры. Культуру необходимо адаптировать к тестовым условиям (температура, вода того же состава, что и используемая в тесте разбавляющая вода) в течение не менее 48 ч. Для исключения необходимости периода акклиматизации культуры перед биотестированием рекомендуется, чтобы вода для культивирования имела сходный состав (рН, жесткость) с водой, используемой в качестве разбавляющей для теста.

Протокол поддержания культуры водорослей *Chlorella vulgaris* ЦГ-4

1. Характеристика тест-объекта

Chlorella vulgaris — широко распространенная одноклеточная зеленая пресноводная водоросль, таксономическая принадлежность и фенотипические признаки вида представлены на рисунке. Для биотестирования используется лабораторная культура ЦГ-4.

Отдел *Chlorophyta*

Класс *Euchlorophyceae*

Порядок *Chlorococcales*

Семейство *Chlorellaceae*

Подсемейство *Chlorelloideae*

Род *Chlorella*

Вид *Chlorella vulgaris*

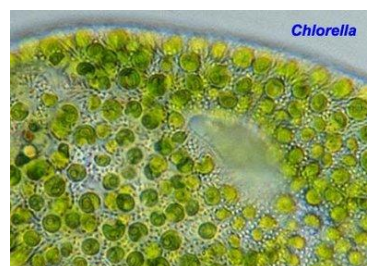


Рисунок — *Chlorella vulgaris*

Морфология: клетки шаровидные или эллиптические диаметром 2–10 мкм (иногда больше), с тонкой оболочкой без слизи, одним или двумя ядрами и одним чашеобразным хлоропластом.

Размножение: бесполое автоспорами, образующимися в результате деления содержимого материнской клетки. Количество автоспор от 2 до 32 в зависимости от условий выращивания. Деление происходит, как правило, 1 раз/сут, однако в условиях интенсивной культуры она способна и к более активному размножению (4–6 делений/сут). В таких условиях регулярно пересеваемая культура водоросли хлорелла за счет опережающего рост ее клеток может на протяжении длительного времени сохраняться альгологически чистой без применения специальных приемов очистки и стерилизации.

2. Лабораторные условия содержания культуры:

✓ культивирование осуществляют в люминостате в конических плоскодонных колбах объемом 250–300 мл;

✓ температура воздуха — $2 \pm 2^\circ\text{C}$;

✓ интенсивность освещения: не менее 2000–3000 лк;

✓ световой период: чередование циклов света и темноты 12 ч:12 ч;

✓ культуру водорослей продувают воздухом либо встряхивают 1–2 раза/сут;

✓ используют химически чистую стеклянную посуду: посуду промывают хромовой смесью, затем тщательно водопроводной водой и 3–4 раза дистиллированной водой, стерилизуют в сушильном шкафу при 160°C в течение 1,5 ч (за исключением мерной);

✓ не разрешается пользоваться для мытья посуды синтетическими поверхностно-активными веществами и органическими растворителями, рекомендуется питьевая сода.

3. Питательные среды

Лабораторную культуру водорослей выращивают на питательной среде Тамийя, в среду можно добавлять растворы солей железа или микроэлементов.

Состав раствора микроэлементов по Арнону

Растворы А и В готовят отдельно:

раствор А: H_3BO_3 — 2,86 мг/л, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 1,81 г/л, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,222 г/л,

раствор В: (MoO_3) — 17,64 мг/л, NH_4VO_3 — 22,96 мг/л.

4. Посев культуры водорослей

При культивировании необходимо периодически обновлять культуру водорослей, пересевая ее на свежую питательную среду с периодичностью не реже 1 раза в 10 дней.

Количество культуры водорослей, нужное для получения в опытном и контрольном объеме питательной среды необходимой плотности клеток, устанавливают расчетным путем; как правило, это 0,5–1 мл культуры водорослей.

5. Подсчет плотности культуры водорослей

Подсчет количества клеток водорослей производят оптическим методом в счетной камере Горяева, фотоэлектроколориметрически или спектрофотометрически.

6. Проверка пригодности тест-культуры для биотестирования

Не реже 1 раза в мес. культуру водорослей проверяют на пригодность для биотестирования. Для этого устанавливают ЭК₅₀₋₄₈ раствора эталонного вещества $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$:

✓ готовят исходный раствор $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ концентрацией 1 г/л на дистиллированной воде;

✓ из исходного раствора готовят серию растворов с концентрациями $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ от 1 до 3 мг/л с интервалом 0,5 мг/л на среде Тамийя (опыт), контроль — среда без токсиканта;

✓ в опытные и контрольные колбы добавляют водоросли в экспоненциальной фазе роста плотностью 30×10^3 кл/мл;

✓ биотестирование этих растворов проводят продолжительностью 48 ч;

✓ рассчитывают снижение численности клеток водорослей в протестированных растворах по сравнению с контролем и определяют концентрацию $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, вызывающую уменьшение численности водорослей на 50% за 48 ч (ЭК₅₀₋₄₈).

Диапазон реагирования тест-объекта: должен быть ЭК₅₀₋₄₈ = 1,3–2,5 мг/л $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

Если полученная величина ЭК₅₀₋₄₈ находится в установленном диапазоне реагирования тест-объекта, культура водорослей пригодна для биотестирования. Если нет – проверяют условия культивирования тест-объекта. При необходимости культуру заменяют.

Методики приготовления питательных сред для культур водорослей и подсчета плотности культуры

Таблица 1 — Состав питательных сред для культивирования водорослей

Компоненты среды	Концентрация	
	в среде для культивирования, г/л	концентрированные растворы для приготовления среды, г/100 мл
<i>Питательная среда Успенского № 1</i>		
KNO_3	0,025	2,5
$Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$	0,025	2,5
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	0,144	14,4
$KH_2PO_4 \cdot 3H_2O$	0,025	2,5
K_2CO_3	0,0345	3,45
<i>Питательная среда Прата</i>		
KNO_3	0,10	10,0
$Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$	0,01	1,0
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0,01	1,0
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,001	0,1
<i>Питательная среда Таммийя</i>		
KNO_3	5,0	0,5
$Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$	2,5	0,25
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1,25	0,125
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,003	0,0003
ЭДТА	0,044	0,0044
Раствор микроэлементов по Арнону	1 мл	0,1 мл
KNO_3	5,0	0,5

1. Приготовление питательных растворов

Питательные растворы готовят на дистиллированной воде, полученной из стеклянного перегонного аппарата (допускается приготовление питательной среды на бидистиллированной воде, но нельзя пользоваться аппаратами с ионообменными смолами).

Чтобы избежать образования осадка в питательной среде, каждый ее компонент предварительно готовится в концентрированном виде отдельно в 100 см³ дистиллированной воды. Полученные исходные концентрированные растворы солей кипятят на водной бане каждый по 10–15 мин; после охлаждения их можно использовать для приготовления среды в течение 1 мес. при условии хранения в холодильнике при температуре от +2 до +4°С. В случае помутнения растворов их заменяют свежими. Каждый сосуд с питательными веществами должен быть

подписан с указанием состава, концентрации, времени приготовления и плотно закрыт притертой пробкой во избежание высыхания и концентрирования.

Для приготовления питательной среды для культивирования водорослей добавляют по 1 мл каждого концентрированного раствора (кроме солей железа) в колбу на 1 л, заполненную до половины дистиллированной водой, поочередно в последовательности их расположения в таблице. Доводят до метки 1 л дистиллированной водой, тщательно перемешивают, кипятят раствор 30 мин, охлаждают и после этого добавляют 1 мл концентрированного раствора и отдельно приготовленные растворы микроэлементов. Процедура приготовления описана ниже.

2. Процедура приготовления растворов микроэлементов

Растворы А и В готовят отдельно:

раствор А (H_3BO_3 — 2,86 мг/л, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 1,81 г/л, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,222 г/л);

раствор В (MoO_3 — 1,81 мг/л, NH_4VO_3 — 22,96 мг/л).

Затем отдельно стерилизуют каждый раствор 30-минутным кипячением, охлаждают, плотно закрывают притертой пробкой и хранят в холодильнике при температуре от +2 до +4°C до 3 мес.

Растворы солей железа или микроэлементов можно добавлять во все среды независимо от того, указано это в прописи их состава.

3. Посев культуры водорослей

При культивировании необходимо периодически обновлять культуру водорослей, пересевая ее на свежую питательную среду с периодичностью не реже 1 раза в 10 дней.

Алгоритм пересева:

✓ в стерильную колбу объемом 250-300 мл со свежей питательной средой объемом 150 мл наливают 15-20 мл верхнего слоя исходной культуры (содержимое исходной культуры при этом не перемешивают) над пламенем спиртовки.

Начальная плотность клеток в новой колбе составляет примерно $100-150 \times 10^3$ кл./мл, что дает светло-зеленую окраску. В случае ослабления интенсивного роста клеток в культуре к питательной среде добавляют витамин B_{12} ;

✓ колбу с культурой водорослей закрывают стерильной ватно-марлевой пробкой и бумажным колпачком, перемешивают и помещают в люминостат для подращивания культуры. В процессе культивирования культуру водорослей периодически перемешивают, встряхивая 1-2 раза/сут;

✓ через 3 сут подсчитывают численность клеток (должна быть ≈ 5 млн кл./мл).

Количество культуры водорослей, нужное для получения в опытном и контрольном объеме питательной среды необходимой плотности клеток, устанавливают расчетным путем; как правило, это 0,5-1 мл культуры водорослей.

4. Плотность культуры водорослей

Количество клеток водорослей подсчитывают оптическим методом в счетной камере Горяева, фотоэлектроколориметрически или спектрофотометрически.

При биотестировании исходную численность клеток определяют в каждой колбе. Она должна составлять не менее 30×10^3 кл./мл в случае подсчета в счетной камере и не менее 50×10^3 кл./мл в случае подсчета оптическим методом.

Подсчет количества клеток водорослей в счетной камере Горяева:

✓ пипеткой отбирают суспензию водорослей из колбы, наносят по одной капле на сетки в счетной камере Горяева;

✓ камеру накрывают покровным стеклом, которое притирают по бокам до появления колец интерференции;

✓ через 1–2 мин просчитывают число водорослей в 5 больших или 80 малых квадратах, расположенных по диагонали сетки счетной камеры, или в 25 больших квадратах всей камеры при малой плотности водорослей.

Из каждой колбы производят подсчет не менее 3 капель;

✓ на основании результатов подсчета клеток в каждой капле определяют численность клеток водорослей в 1 мл в образце по формуле 1:

$$X_{k(он)ij} = \frac{m_{k(он)ij}}{nV} \cdot 1000, \dots\dots\dots(1)$$

где $m_{k(он)ij}$ — количество подсчитанных клеток водорослей в камере в контроле (опыте) для i -й капли и j -го параллельного определения;

i — номер капли суспензии;

j — номер параллельного определения;

V — объем части камеры, имеющей площадь маленького квадрата;

n — количество подсчитанных квадратов.

✓ Для каждого параллельного определения в опыте и контроле вычисляют среднее арифметическое численности клеток водорослей в 1 см³ по формуле 2:

$$\bar{X}_{k(он)j} = \frac{\sum_{i=1}^I X_{k(он)ij}}{I}, \quad (2)$$

где I — количество капель суспензии.

✓ На основании результатов 3 параллельных определений численности клеток водорослей находят средние арифметические численности клеток водорослей в образце по формуле 3:

$$\bar{X}_{k(он)} = \frac{\sum_{j=1}^J \bar{X}_{k(он)j}}{J}, \quad (3)$$

где J — количество параллельных определений численности клеток водорослей в контроле (опыте); $J = 3$.

Определение численности клеток фотоэлектроколориметром, спектрофотометром, прибором для измерения флюоресценции водорослей (быстрой или замедленной) с дальнейшим определением численности клеток по калибровочной кривой.

Построение калибровочной кривой для определения численности клеток водорослей проводят следующим образом:

✓ исходную культуру водорослей последовательно разбавляют питательной средой в 2, 4, 6... n раз;

✓ численность клеток в каждой колбе подсчитывают в счетной камере не менее 3 раз и вычисляют среднее значение;

✓ на фотоэлектроколориметре определяют соответствующую этой численности клеток оптическую плотность или уровень флюоресценции.

Для измерения оптической плотности или флюоресценции водорослей используют кюветы 10 мм толщиной (или другие), длина волны измерения оптической плотности на КФК-3 составляет 360 нм;

✓ по результатам измерений строят калибровочную кривую по формуле 4:

$$E = f(N), \quad (4)$$

где E — оптическая плотность;

N — численность клеток в 1 мл культуры.

✓ Периодически, 1 раз/мес., проверяют калибровочную кривую.

Протокол поддержания лабораторной культуры водорослей *Scenedesmus subspicatus*

1. Морфологические особенности

Scenedesmus subspicatus — пресноводные одноклеточные протококковые водоросли. Морфологические признаки представлены на рисунке.



Рисунок — Водоросли вида *Scenedesmus subspicatus*

2. Условия содержания *Scenedesmus subspicatus*

Культивирование водорослей осуществляется в конических плоскодонных колбах объемом 250–300 мл в люминостате с интенсивностью освещения не менее 2000–3000 лк при температуре $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ и световом периоде 12–16 ч. В течение 1 сут культуру водорослей встряхивают 1–2 раза.

Для культивирования и биотестирования водорослей используют химически чистую стеклянную посуду. Для этого ее промывают смесью бихромата калия и серной кислоты (хромовой смесью), затем тщательно водопроводной водой и 3–4 раза дистиллированной водой. Посуду, используемую для культивирования и биотестирования, за исключением мерной, стерилизуют в сушильном шкафу при 160°C в течение 1,5 ч. Не разрешается пользоваться для мытья посуды синтетическими поверхностно-активными веществами и органическими растворителями. Можно пользоваться пищевой содой.

3. Питательные среды

Лабораторную культуру водорослей выращивают на питательной среде Прата или Успенского. Если в экспериментах на водорослях часто наблюдается явление стимуляции, во избежание этого следует использовать для выращивания и экспериментов более концентрированную среду Успенского.

4. Посев культуры водорослей

Колбу с культурой водорослей закрывают стерильной ватно-марлевой пробкой и бумажным колпачком, перемешивают и помещают в люминостат. В процессе культивирования культуру водорослей периодически перемешивают, встряхивая 1–2 раза/сут.

Для пересева в стерильную колбу с питательной средой объемом 150 мл приливают из исходной культуры водорослей верхний слой клеток (около 15–20 мл); колбу ставят в люминостат для подрачивания культуры. Через 3-е сут

подсчитывают численность клеток, она должна составлять около 5 млн кл./мл.

Количество культуры водорослей, нужное для получения в опытном и контрольном объеме питательной среды необходимой плотности клеток (по 30 тыс. кл./мл), устанавливают расчетным путем; как правило, это 0,5–1 мл культуры водорослей.

5. Подсчет плотности культуры водорослей

Для подсчета количества клеток водорослей используют счетную камеру Горяева (либо другую), допустимо также применять фотоэлектроколориметр, спектрофотометр или прибор для измерения флюоресценции водорослей (быстрой или замедленной) с дальнейшим расчетом численности клеток по калибровочной кривой.

При биотестировании исходную численность клеток определяют в каждой колбе. Она должна составлять не менее 30×10^3 кл./мл при подсчете в счетной камере и не менее 50×10^3 кл./мл — оптическим методом.

6. Проверка пригодности тест-культуры для биотестирования

Не реже одного раза в месяц культуру водорослей проверяют на пригодность для биотестирования. Для этого устанавливают ЭК₅₀ за 48 ч раствора эталонного вещества калия двухромовокислого.

Готовят исходный раствор $K_2Cr_2O_7$ с концентрацией 1 г/л, используя дистиллированную воду. Далее из исходного раствора готовят серию растворов с концентрациями $K_2Cr_2O_7$ от 1 до 3 мг/л с интервалом 0,5 мг/л, используя среду Прата (опыт). Для контроля берут среду Прата без токсиканта. Затем в опытные и контрольные колбы добавляют водоросли в экспоненциальной фазе роста плотностью 30×10^3 кл./мл. Биотестирование этих растворов проводят продолжительностью 48 ч. На основании полученных результатов рассчитывают процент снижения численности клеток водорослей в протестированных растворах по сравнению с контролем и определяют концентрацию $K_2Cr_2O_7$, которая вызывает снижение численности водорослей на 50% (ЭК₅₀ за 48 ч). Диапазон реагирования тест-объекта должен быть в пределах ЭК₅₀₋₄₈ = 1,3–2,5 мг/л $K_2Cr_2O_7$.

Если полученная величина ЭК₅₀ за 48 ч находится в экспериментально установленном диапазоне реагирования тест-объекта (1,3–2,5 мг/л $K_2Cr_2O_7$), культура водорослей пригодна для биотестирования. Если ЭК₅₀ за 48 ч $K_2Cr_2O_7$ не находится в указанном диапазоне реагирования, то проверяют условия культивирования тест-объекта, чтобы выяснить причины ухудшения состояния культуры. При необходимости культуру заменяют.