

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра,
Главный государственный
санитарный врач

_____ В.И. Качан
24 ноября 2009 г.
Регистрационный № 063-1109

**ТРЕБОВАНИЯ ПО ОЦЕНКЕ ТОКСИЧНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ
ВЕЩЕСТВ И ИХ СМЕСЕЙ ДЛЯ ВОДНОЙ СРЕДЫ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. мед. наук И.А. Застенская, канд. мед. наук Е.В. Дроздова,
канд. мед. наук В.И. Ключенович, В.В. Бурая, В.А. Рудик

Минск 2009

ГЛАВА 1. НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящая Инструкция по применению устанавливает методики определения острой токсичности химических веществ и их смесей, природных и сточных вод в лабораторных условиях с использованием в качестве тест-объектов пресноводных водорослей *Scenedesmus subspicatus* и аквариумных рыб *Poecilia reticulata*.

Область применения: оценка острой токсичности водорастворимых химических веществ, их смесей, природных и сточных вод, установление нормативных требований к качеству вод, контроль над соблюдением нормативов допустимых сбросов химических веществ в водные объекты в комплексе с физико-химическими методами; мониторинг водных объектов, прежде всего, в районах расположения источников антропогенного воздействия; оценка состояния водных экосистем.

Настоящая Инструкция по применению предназначена для использования в учреждениях Министерства здравоохранения Республики Беларусь, Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь их подведомственными организациями, научно-исследовательскими, проектными, производственными организациями, имеющими разрешение на проведение работ по биотестированию в соответствии с установленными требованиями.

ГЛАВА 2. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей Инструкции по применению используются следующие термины и определения:

- безвредная концентрация отдельных веществ (BK_{10}) или кратность разбавления вод (BKP_{10}) — экспериментально полученное значение концентрации химического вещества в воде или кратности разбавления вод, соответственно, вызывающей изменение тест-реакции не более чем у 10% особей тестируемой популяции при краткосрочном воздействии в течение заданного срока наблюдений;
- биологическое тестирование воды (раствора химического вещества) — экспериментальное определение токсичности воды (раствора химического вещества) по изменению определенного показателя жизнедеятельности тест-объекта;
- вещество — химические элементы и их соединения, находящиеся в естественном состоянии либо полученные в результате антропогенной деятельности, за исключением растворителя;
- воспроизводимость результатов биотестирования — характеристика качества биотестирования, отражающая близость результатов, полученных по одной методике, на одном и том же эталонном веществе, но в различных условиях (разными операторами, в разных лабораториях или в разное время);
- исходный раствор — концентрированный водный раствор исследуемого вещества, из которого готовят растворы с разными концентрациями этого вещества для последующего тестирования;

- критерий токсичности — установленное значение изменения выбранного показателя жизнедеятельности тест-объекта, на основании которого делают вывод о токсичности тестируемого объекта;
- медианная эффективная концентрация или кратность разбавления вод ($ЭК_{50}/ЭКР_{50}$) — экспериментально полученное значение концентрации химического вещества (смеси) в воде или кратности разбавления вод, вызывающей изменение тест-реакции у 50% особей тестируемой популяции при краткосрочном воздействии в течение заданного срока наблюдения;
- медианная летальная концентрация или кратность разбавления вод ($ЛК_{50}/ЛКР_{50}$) — экспериментально полученное значение концентрации химического вещества (смеси) в воде или кратности разбавления вод, вызывающей гибель 50% особей тестируемой популяции при краткосрочном воздействии в течение заданного срока наблюдений;
- острая токсичность — присущее химическому веществу (смеси) свойство наносить ущерб организму при краткосрочном на него воздействии;
- полустатическая (статически возобновляемая) тест-система — статическая система, в которой тестируемый раствор обновляется каждые 24 ч;
- предельно допустимый сброс — масса химического вещества в сточных водах, максимально допустимая к отведению с установленным режимом в данном пункте водного объекта в единицу времени с целью обеспечения норм качества воды в контрольном пункте;
- проточная тест-система — тест-система, при которой происходит непрерывный или периодический пассаж тестируемого раствора без рециркуляции через емкость, в которой проводится эксперимент или культивирование тест-организма;
- смесь — два или более вещества, в твердом виде или находящиеся в растворенном состоянии при условии, что они не вступают в реакции друг с другом;
- сточная вода — вода, отводимая после использования ее в хозяйственно-бытовой и производственной деятельности (кроме дренажной, карьерной, шахтной, рудничной), а также отводимая с застроенной территории, на которой она образовалась;
- статическая тест-система — тест-система, при которой тестируемый раствор не возобновляется в ходе эксперимента;
- тест-объект(ы) — водный(ые) организм(ы), чувствительный(е) к действию токсических веществ и специально подготовленный(е) в лабораторных условиях к биотестированию;
- тест-реакция — изменение выбранного показателя жизнедеятельности тест-объекта под воздействием токсического вещества;
- токсичность — свойство воды (водной вытяжки, раствора химического вещества), обусловленное наличием в ней токсических веществ и характеризующее ее способность нарушать жизнедеятельность водных организмов;

- токсический эффект — результат воздействия токсиканта на водный организм, проявляющийся в изменении показателей его жизнедеятельности;
- уровень токсичности воды (раствора химического вещества) — количественная характеристика токсичности, определяемая через минимальную кратность разбавления, при котором токсичность воды уже не проявляется.

ГЛАВА 3. УСЛОВИЯ БЕЗОПАСНОГО ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТ

При работе с реактивами и приборами соблюдают требования безопасности, установленные в технических нормативных правовых актах:

- предельно допустимые концентрации токсичных, едких и легковоспламеняющихся веществ, применяемых при работе в воздухе рабочей зоны не должны превышать значений, указанных в ГОСТ 12.1.005-88 «Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны» (далее — ГОСТ 12.1.005-88) и Санитарных правилах и нормах 11-19-94 «Перечень регламентированных в воздухе рабочей зоны вредных веществ», утвержденных Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 09.03.94;
- параметры микроклимата на рабочих местах должны соответствовать требованиям Санитарных правил и норм 9-80 РБ 98 «Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений», утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь № 12 от 25.03.99 и ГОСТ 12.1.005-88;
- безопасность при работе с электроустановками обеспечивается по ГОСТ 12.1.019-79 «Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты» и в соответствии с требованиями инструкций к оборудованию;
- помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004-91 «Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования» и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009-83 «Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание»;
- организация обучения работающих безопасности труда по ГОСТ 12.0.004-90 «Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения».

ГЛАВА 4. ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ЛИЦ, ПРОВОДЯЩИХ ИССЛЕДОВАНИЯ

К выполнению исследований допускаются лица, освоившие методические приемы токсикологии, с квалификацией «техник», «лаборант», «научный сотрудник», «врач-лаборант», «биолог», изучившие требования безопасности и настоящую Инструкцию по применению.

ГЛАВА 5. УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Биотестирование проводится в нормальных лабораторных условиях, в помещении, где не хранятся летучие вещества и не выполняются работы с их применением. До эксперимента и в ходе его лабораторные помещения не обрабатывают инсектицидами.

Температура воздуха в лаборатории при биотестировании должна быть 21–25 °С (для каждой методики установлены свои температурные оптимумы), но для каждого отдельного теста — быть постоянной в пределах ± 1 °С.

Освещение помещения: естественное или искусственное. Используют рассеянный свет, 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 термолюминостаг.

Оборудование, контактирующее с тестируемыми растворами, должно быть сделано предпочтительно полностью из стекла или других инертных материалов. Перечень необходимого оборудования, материалов и реактивов представлен в приложении 1 настоящей Инструкции по применению.

ГЛАВА 6. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ И СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

1. Принципиальная схема проведения биотестирования включает 3 основных этапа:

- подготовка к тестированию: сбор имеющейся доступной информации о химическом веществе, предполагаемом составе сточных вод; анализ собранной информации и разработка схемы исследования; культивирование тест-культуры; приготовление растворов тестируемых веществ заданных концентраций, отбор проб анализируемых образцов окружающей среды (поверхностных вод, сточных вод, отходов и т. д.) и приготовление вытяжек;

- непосредственно эксперимент, проводимый в 2 фазы: тест на установление границ исследования и окончательный тест; при необходимости дополнительно проводят ограничительный тест;

- обработка и оценка полученных результатов.

2. Подготовка к тестированию:

- необходимо собрать следующую информацию о веществе: растворимость в воде, давление насыщенного пара, химическая устойчивость, константы диссоциации, биоразлагаемость. Дополнительные данные, которые следует принимать во внимание при планировании эксперимента и интерпретации полученных результатов: структурная формула, степень чистоты, происхождение и процентное содержание значимых примесей, присутствие добавок и их количество, коэффициент распределения n-октанол/вода.

На основании анализа собранной информации разрабатывается схема исследования, она включает:

- выбор тест-системы (статической, полустатической, проточной) в зависимости от стойкости вещества;
- выбор вспомогательных веществ для тестирования веществ с низкой водорастворимостью: органический растворитель, эмульгатор или дисперсант; допускается использование метода ультразвуковой дисперсии. Рекомендуемые органические растворители: триэтиленгликоль, диметилформамид, этанол, ацетон;
- выбор наиболее соответствующего цели исследования тест-объекта (при наличии информации о чувствительности того или иного вида к отдельным классам веществ).

Культивирование тест-культур производят в соответствии с требованиями, изложенными в конкретных методиках (приложения 6 и 9 к настоящей Инструкции по применению).

С периодичностью, определенной каждой конкретной методикой, но не реже 1 раза в полгода, тест-культуры проверяют на пригодность к биотестированию путем оценки чувствительности к эталонному (рефересному) веществу двухромовокислому калию ($K_2Cr_2O_7$). Тест-объекты должны реагировать на воздействие эталонного агента в оговоренном методикой диапазоне (п. 6 приложения 6, п. 5 приложения 9 к настоящей Инструкции по применению).

Удовлетворительные результаты, полученные при проверке диапазона реагирования тест-организмов на модельный токсикант, не обеспечивают гарантии адекватного реагирования организмов на другие вещества и их смеси, однако регулярно проводимая проверка позволяет выявить ошибки при приготовлении исследуемых смесей и растворов, а также нарушения, допускаемые в процессе культивирования организмов и условиях проведения опытов.

Если чувствительность культуры не удовлетворяет установленным требованиям, анализируют возможные причины снижения чувствительности, проводят соответствующую корректировку условий их культивирования. При необходимости культуру заменяют новой.

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

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

Отбор проб поверхностных вод осуществляют согласно ГОСТ 17.1.5.05-85 «Общие требования к отбору проб поверхностных и морских

вод, льда и атмосферных осадков», сточных вод — инструкции «Инструкция по отбору проб для анализа сточных и поверхностных вод», утвержденной Госкомитетом Республики Беларусь по экологии 16.02.94.

Для отбора и хранения проб используют стеклянную посуду, которую заполняют под пробку и плотно закрывают. Объем пробы воды для определения острой токсичности должен быть в 2 раза больше требуемого для хранения дубликата пробы до конца тестирования. Пробы, отобранные для биотестирования, не подлежат консервированию химическими веществами и замораживанию.

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 ± 2 °С не более 72 ч.

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

Приготовление растворов тестируемых химических веществ, их смесей, природных и сточных вод заданных концентраций

Для выполнения биотестирования готовят серию (не менее 5) растворов, содержащих исследуемое вещество (смесь веществ) в разных концентрациях, или серию (не менее 5) разбавлений тестируемой пробы воды (сточной, природной).

Выбранные тестовые концентрации сточных, природных вод, вытяжек готовятся разведением исходных сточных, природных вод, вытяжек до требуемой концентрации по отношению к исходной.

Выбранные тестовые концентрации химического вещества (смеси веществ) готовятся разведением исходного (маточного) раствора тестируемого вещества (смеси веществ). Если тестируются высокие концентрации, вещество может быть растворено в разбавляющей воде непосредственно.

Химические соединения должны тестироваться до предела растворимости в воде. Для веществ, имеющих низкую растворимость в воде, допустимо использовать для тестирования насыщенный раствор, чтобы была достигнута максимально возможная концентрация. Важно чтобы эта концентрация не нарушала тест-систему другим способом (например, образование пленки на поверхности раствора предотвращает насыщение воды кислородом).

Если используется вспомогательное вещество, все тестируемые растворы должны содержать его в равных количествах. Концентрации данных веществ должны быть минимальными, но в любом случае не превышать 100 мг/дм^3 .

Обязателен контроль концентрации веществ и их смесей после приготовления тестируемых растворов, если это невозможно — используют номинальные концентрации.

В дополнение к серии разведений тестируемого вещества обязательна параллельная постановка контроля (разбавляющая вода без вещества). Если в ходе эксперимента применяются вспомогательные вещества, необходим дополнительный контроль (разбавляющая вода, содержащая растворитель в максимально используемой концентрации).

В качестве разбавляющей воды может использоваться бутилированная питьевая, водопроводная (дехлорированная и насыщенная кислородом путем отстаивания в течение не менее 3 сут) либо восстановленная вода (готовят в соответствии с ИСО 6341, один из примеров приведен в приложении 2). Рекомендованными параметрами качества воды, используемой в этих целях, являются: жесткость (по CaCO_3) не более 180 мг/дм^3 , химическая потребность в кислороде не более 5 мг/дм^3 , содержание взвешенных частиц не более 20 мг/дм^3 , остаточного хлора — не более 3 мкг/м^3 , общих фосфорорганических пестицидов — не более 50 нг/дм^3 , органического хлора — не более 25 нг/дм^3 , органических веществ в пересчете на углерод — не более 2 мг/дм^3 .

Растворы тестовых концентраций должны готовиться непосредственно перед внесением тест-организмов. Эксперимент должен начаться не позднее чем через 30 мин с момента приготовления растворов.

Рекомендуется контроль концентрации тестируемых веществ и их смесей в начале и конце теста действующими методами определения содержания химических веществ в воде (титриметрический, газохроматографический и др.).

3. В ходе эксперимента тест-объекты в течение определенного методикой промежутка времени подвергаются воздействию растворенного в воде вещества (смеси веществ, вод, вытяжек из объектов окружающей среды) в диапазоне концентраций.

Повторность в опыте и контроле трехкратная (в ориентировочном эксперименте допускается одно- или двукратная).

Температура определяется методикой, но для каждого отдельного теста должна быть постоянной в пределах $\pm 1 \pm \text{C}$.

В контроле и тестовых растворах рН должен измеряться в начале и конце теста. Тест должен выполняться без корректировки рН. Если есть доказательства заметных изменений рН, рекомендуется повторение теста после коррекции. Для этих целей предпочтительно использовать $0,1 \text{ N}$ растворы HCl и NaOH . Корректировка рН должна быть проведена таким образом, чтобы концентрация тестируемого вещества в исходном растворе значительно не менялась. Если данная процедура вызвала химические реакции или осаждение тестируемого вещества, это должно быть отражено в результатах теста.

Световой период: рекомендуется проводить тест с чередованием циклов света и темноты $16 \text{ ч} : 8 \text{ ч}$ либо $12 \text{ ч} : 12 \text{ ч}$ соответственно с 15–30-минутным переходным периодом.

По окончании эксперимента в каждом сосуде определяют рН, содержание тестируемого вещества, а также концентрацию растворенного

кислорода в экспериментальных сосудах, соответствующих самой низкой концентрации, вызывающей 100%-й токсический эффект (при необходимости для этого соединяют содержимое сосудов, соответствующих такой концентрации, в один сосуд, соблюдая необходимые требования предосторожности, чтобы не изменить концентрацию растворенного кислорода).

Тест на установление границ исследования — ориентировочный (1-й этап биотестирования)

Проводится с целью установления диапазона концентраций для окончательного тестирования. При этом тест-объекты экспонируют концентрациями в широком диапазоне, например, с разницей в порядок: 1, 10, 100 мг/дм³. Экспозиция может быть укорочена, если данные получены за более короткий период времени.

Окончательный тест (2-ой этап биотестирования)

Заключается в экспонировании тест-объектов пятью и более концентрациями в установленном диапазоне реагирования тест-объекта на тестируемый субстрат, выбранном в геометрической прогрессии с отношением между ними от 1,5 до 2 (например, 2, 4, 8, 16, 32 и 64 мг/дм³). Цель — на основании полученных данных построить кривую зависимости «концентрация – ответ» и установить значения Э(Л)К₅₀, Э(Л)К₁₆ и Э(Л)К₈₄, а также Э(Л)К₀ (наибольшую из протестированных концентраций, не вызвавшую гибель (эффект) за период экспозиции) и Э(Л)К₁₀₀ (наименьшую из протестированных концентраций, вызвавшую иммобилизацию 100% за период экспозиции).

При тестировании сточных вод тест-объекты экспонируют сточными водами в концентрациях 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,5; 0,78% от исходной концентрации. Если предварительно известно, что сточные воды обладают гипертоксичностью, концентрации снижают до 10; 3; 0,3; 0,1%.

Контрольный (ограничительный) тест

Выполняют, если полученное значение Э(Л)К₅₀ при тестировании химического вещества или смеси выше 100 мг/дм³. При этом тест-объекты экспонируют веществом в концентрации 100 мг/дм³ в течение полного периода экспозиции, чтобы показать, что Э(Л)К₅₀ выше 100 мг/дм³. Если концентрация вещества 100 мг/дм³ в воде не может быть достигнута, ограничительный тест должен быть выполнен на концентрации эквивалентной растворимости вещества (или максимальной концентрации, образующей устойчивую дисперсию) в используемом тестовом субстрате.

4. Результаты испытаний могут считаться достоверными, если были соблюдены следующие критерии качества:

- в течение теста концентрация тестируемого вещества должна поддерживаться в пределах 80% от исходной. Для веществ, которые легко растворяются в контрольной среде, образуя устойчивые растворы, за исходную концентрацию может быть принята эквивалентная номинальная концентрация. Для веществ, которые плохо растворимы в контрольной среде, способны образовывать устойчивые эмульсии и суспензии либо неустойчивы

в водных растворах, за исходную концентрацию должна приниматься концентрация, измеренная в начале теста непосредственно в растворе (если это технически невозможно, то измеренная в водяном столбе). Концентрацию следует определять после установления равновесия, но до внесения тест-организмов.

- токсический эффект в контролях не превышает 10%;
- значение pH варьирует не более чем на 1 единицу;
- содержание растворенного кислорода, рассчитанное в конце эксперимента, не ниже 2 мг/дм³.

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

Вывод о наличии или отсутствии острой токсичности пробы воды, вещества (смеси веществ) делают на основании величин А (для водорослей) или Р (для рыб), алгоритм их расчета описан в соответствующих разделах каждой методики:

- если величина $A(P) \leq 10\%$ — тестируемая проба не оказывает острого токсического действия (безвредная кратность разбавления);
- при $A(P) \geq 50\%$ считают, что анализируемая проба проявляет острую токсичность.

Если проба проявляет острую токсичность, то для количественной оценки устанавливают ее среднее эффективное (летальное) разбавление за 72/96 ч биотестирования (Э(Л)КР_{50}). Для количественной оценки токсичности вещества (смеси веществ) устанавливают медианную эффективную (летальную) концентрацию за полный период экспозиции (Э(Л)К_{50-96} или ЭК_{50-72}) и ее доверительный интервал ($p=0,05$), а также Э(Л)К_{16} и Э(Л)К_{84} .

Значения Э(Л)К_0 (наибольшая из протестированных концентраций, не вызвавшая эффект (гибель) через 72/96 ч) и Э(Л)К_{100} (наименьшая из протестированных концентраций, вызвавшая эффект (гибель) 100% через 72/96 ч) определяют непосредственно из результатов эксперимента.

Рекомендуется установить Э(Л)К_{50} (Э(Л)КР_{50}), Э(Л)К_{16} и Э(Л)К_{84} для каждого из периодов наблюдения — 24, 48, 72 и 96 ч.

Если экспериментально не удалось получить точные значения Э(Л)К_{50} (Э(Л)КР_{50}), Э(Л)К_{16} и Э(Л)К_{84} , то для получения данных значений без выполнения дополнительных экспериментов их определяют графическим способом в соответствии с приложением 3 к настоящей Инструкции по применению. Также может быть использован метод пробит-анализа по Литчфильду—Вилкоксоу.

Результат токсикологического анализа в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде:

$\text{Э(Л)К}_{50} \pm S_x t$, где S_x — ошибка, t — критерий Стьюдента.

Методика расчета ошибки и доверительного интервала с использованием критерия Стьюдента приведена в приложении 3.

Значения Э(Л)К_x должны быть выражены в процентах либо в $\text{см}^3/\text{дм}^3$ в случае использования сточных вод; в $\text{мг}/\text{дм}^3$ в случае тестирования химических веществ.

Интерпретация полученных токсикометрических данных для веществ и смесей должна проводиться в соответствии с критериями, приведенными в Согласованной на глобальном уровне системе классификации и маркировки химических веществ (далее — СГС), изложенными в приложении 4.

6. Отчет о проведении теста должен включать информацию, указанную в приложении 5.

7. Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности проводят в объеме 5% от количества текущих измерений по результатам двух определений токсичности анализируемой пробы воды, раствора вещества (смеси веществ), полученных в условиях воспроизводимости (Э(Л)КР_1 , Э(Л)КР_2 или Э(Л)К_1 , Э(Л)К_2).

Решение об удовлетворительности воспроизводимости определений принимается при условии:

$$\frac{2|\text{Э(Л)К}_1 - \text{Э(Л)К}_2|}{\text{Э(Л)К}_1 + \text{Э(Л)К}_2} \cdot 100\% \leq D, \quad (1)$$

где D — норматив оперативного контроля воспроизводимости (его значение определено для каждой отдельно взятой методики).

ГЛАВА 7. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-КУЛЬТУРЫ ВОДОРОСЛЕЙ *SCENEDESMUS SUBSPICATUS*

1. Принцип методики

Изложенная в настоящей Инструкции методика биотестирования с использованием тест-культуры пресноводных одноклеточных протококковых водорослей *Scenedesmus subspicatus* основана на установлении различия между интенсивностью роста водорослей в анализируемой пробе (опыт) и культуральной среде (контроль).

Критерием острого токсического действия исследуемого образца является снижение на 50% и более численности клеток водорослей в опыте по сравнению с контролем за 72 ч биотестирования («острая токсичность») при условии, что в контрольном эксперименте снижение численности клеток не превышает 10%.

Для количественной оценки токсичности пробы раствора устанавливают медианную эффективную концентрацию за 72 ч (ЭК_{50-72}) или безвредную (не вызывающую эффекта острой токсичности) кратность разбавления вод (далее — БКР_{10}).

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. Техника поддержания лабораторной культуры описана в приложении 6, методика приготовления питательных сред для культур водорослей изложена в приложении 7.

Перед пересевом в начале биотестирования исходная культура водорослей сгущается до образования суспензии путем центрифугирования (5 мин при 6 тыс. об/мин), и определяется исходная численность клеток суспензии водорослей, чтобы рассчитать необходимый объем добавки суспензии, обеспечивающий нужную плотность клеток при пересеве. Техника подсчета плотности культуры водорослей приведена в приложении 8.

Для подсчета в камере Горяева суспензия разбавляется питательной средой, и с учетом разведения подсчитывается количество клеток водорослей. Затем суспензия добавляется в контрольные и тестируемые воды. После посева и тщательного перемешивания водоросли подсчитываются в камере Горяева.

Процедура биотестирования и расчета

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

В конические колбы вместимостью 250 см³ разливают по 100 см³ среды Прата (контроль), в другие колбы — исследуемые пробы воды (водной вытяжки), бурового раствора (опыт). Опытные колбы (в различных разбавлениях) заполняют следующим образом:

- без разбавления — 100 см³ исследуемой пробы;
- разбавление в 2 раза — 50 см³ исследуемой пробы и 50 см³ среды;
- разбавление в 10 раз — 10 см³ пробы и 90 см³ среды;
- разбавление в 100 раз — 1 см³ пробы и 99 см³ среды;
- разбавление в 1000 раз — 0,1 см³ пробы и 99,9 среды.

В опытные колбы вносят исследуемую пробу, затем питательную среду. После в опытные и контрольные колбы вносят по 0,5 см³ исходной культуры водорослей в экспоненциальной фазе роста численностью около 5×10^6 кл/см³ (при этом численность клеток водорослей в опытных и контрольных колбах в начале биотестирования должна составлять не менее 30×10^3 кл/см³ при подсчете в счетной камере и не менее 50×10^3 кл/см³ — с помощью оптического метода). В контроль кроме водорослей ничего не вносят. Колбы закрывают ватно-марлевыми пробками, встряхивают. Экспонируют, соблюдая вышеуказанные условия. Содержимое каждой колбы перемешивают 1–2 раза в сут. По ходу эксперимента численность клеток считают ежедневно, тщательно перемешивая содержимое колб. Через 72 ч биотестирование прекращают. В каждой колбе подсчитывают численность клеток водорослей.

Статистическая обработка данных

На основании результатов подсчета клеток в каждой капле определяют численность клеток водорослей (кл/см³) в контроле и опыте. Для каждого

параллельного расчета в опыте и контроле вычисляют среднее арифметическое численности клеток водорослей в 1 см³. Рассчитывают численность клеток водорослей в опыте (% от их численности в контроле) по формуле 2:

$$P = \frac{\bar{X}_{on}}{\bar{X}_k} \cdot 100, \quad (2)$$

где P — численность клеток водорослей в опыте, %;

\bar{X}_{on} — среднее арифметическое численности клеток водорослей в опыте, кл/см³;

\bar{X}_k — среднее арифметическое численности клеток водорослей в контроле, кл/см³.

Раствор вещества считается токсичным, если величина P составляет 50% и менее.

Для количественной оценки токсичности раствора вещества (смеси веществ) устанавливают ЭК₅₀ вещества (смеси веществ) за 72 ч биотестирования. Методика расчета ЭК₅₀, ЭК₁₆ и ЭК₈₄ описана в приложении 3.

Норматив оперативного контроля воспроизводимости методики составляет 45%.

ГЛАВА 8. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-КУЛЬТУРЫ РЫБ *POECILIA RETICULATA*

Принцип методики

Изложенная в настоящей Инструкции по применению методика биотестирования с использованием тест-культуры рыб гуппи *Poecilia reticulata* основана на установлении различия между количеством погибших рыб в анализируемой пробе (опыт) и культуральной среде (контроль). Критерием острой токсичности является гибель 50% рыб и более в опыте по сравнению с контролем за 96 ч биотестирования при условии, что в контрольном эксперименте гибель не превышает 10%.

Для количественной оценки токсичности пробы раствора устанавливают медианную летальную концентрацию за 96 ч (ЛК₅₀₋₉₆).

Дополнительно к *Poecilia reticulata* без изменений методики можно использовать следующие виды рыб: *Brachydanio rerio* Hamilton — Buchanan, *Lepomis macrochirus* (Teleostei, Centrarchiae), *Oryzias latipes* (Teleostei, Poeciliidae), *Pimephales promelas* (Teleostei, Cyprinidae). Представленный в настоящей Инструкции по применению метод может быть использован для других видов пресноводных, морских или соленоводных рыб с соответствующими изменениями, например, качества разбавляющей воды и температурных условий испытания.

Тест-объект: культура гуппи *Poecilia reticulata* Peters в возрасте не старше 2 сут (от 24 до 48 ч).

Процедура биотестирования

Тестирование проводят в стеклянных емкостях, в каждый из опытных и контрольных сосудов помещают по 10 (при ориентировочном тесте допускается 6) экземпляров гуппи в возрасте от 24 до 48 ч. Плотность посадки гуппи должна быть не более 10 экземпляров рыб на 5 дм³. Животных вносят не позднее 30 мин с момента приготовления разведений.

Повторность в опыте и контроле трехкратная.

За 1 сут и во время биотестирования рыб не кормят.

Температура анализируемой пробы должна поддерживаться в диапазоне от +21 до +25 °С.

Продолжительность биотестирования: 96 ч.

Учет результатов эксперимента: на 2 и 4 ч, а также через 24, 48 и 96 ч после начала тестирования. Погибших мальков удаляют из сосудов после регистрации наблюдений.

Погибшими считают особей, которые не подают признаков движения или дыхания при прикосновении к ним стеклянной палочкой.

Статистическая обработка данных

На основании результатов трех параллельных определений количества живых рыб в контроле и опыте находят среднее арифметическое по формуле:

$$\bar{X}_{k(он)} = \frac{\sum_{i=1}^I X_{k(он)i}}{I}, \quad (3)$$

где $\bar{X}_{k(он)}$ — результат i -го подсчета количества живых рыб в контроле (опыте);

i — номер подсчета количества живых рыб в контроле (опыте);

I — число параллельных определений количества живых рыб в контроле (опыте); $I = 3$.

Рассчитывают численность погибших рыб в опыте по отношению к контролю (в %) по формуле 4:

$$A = \frac{\bar{X}_k - \bar{X}_{он}}{\bar{X}_k} \cdot 100. \quad (4)$$

Если величина A составляет 50% и более, считают, что анализируемая проба проявляет острую летальную токсичность.

Для количественной оценки токсичности раствора вещества (их смеси) устанавливают ЛК₅₀ вещества (смеси веществ) за 96 ч биотестирования (ЛК₅₀₋₉₆) и ее доверительный интервал ($p=0,05$), а также ЛК₁₆ и ЛК₈₄. Методика расчета ЛК описана в приложении 3.

Норматив оперативного контроля воспроизводимости методики составляет 52%.

Оборудование, материалы, реактивы

1. При проведении биотестирования применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы:

- автоматические дозаторы любого типа;
- аппарат для встряхивания;
- бумага фильтровальная ГОСТ 12026-76;
- бюксы или стаканчики для взвешивания, диаметром 30, 40 мм;
- весы лабораторные, 2-го класса точности, с наибольшей предельной нагрузкой 200 г по ГОСТ 24104;
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709;
- вода питьевая по СанПиН 10-124 РБ 99;
- воронки разные лабораторные по ГОСТ 25336-82;
- груши резиновые разные;
- железа хлорид ГОСТ 4147-74;
- калий азотнокислый ГОСТ 4217-78;
- калий двуххромовокислый ГОСТ 4220-75;
- калий фосфорнокислый двузамещенный ГОСТ 2493-75;
- колбы мерные вместимостью 0,5 и 1,0 дм³, 2-го класса точности по ГОСТ 1770-74;
- лупа складная;
- магний сернокислый ГОСТ 4523-77;
- мешалка лабораторная;
- микрокомпрессор аквариумный;
- оксиметр с погрешностью измерения не более 0,5 мг О₂/дм³;
- пипетки мерные вместимостью от 1 до 10 см³, 2-го класса точности ГОСТ 29227-91;
- посуда стеклянная вместимостью 1 дм³ (для транспортирования и хранения проб воды);
- пробирки стеклянные вместимостью 10 см³ ГОСТ 25336-82;
- рН – метр;
- термолуминостаб, поддерживающий температуру воды 20±2 °С и освещенность (500±100) лк;
- термометр с ценой деления шкалы 1 °С по ГОСТ 112-78;
- центрифуга лабораторная медицинская;
- холодильник, поддерживающий температуру 4±2 °С;
- шкаф сушильный электрический общелабораторного назначения (для стерилизации и сушки посуды);
- цилиндры мерные вместимостью 0,1; 0,5 и 1,0 дм³, 2-го класса точности ГОСТ 1770-74.

2. При проведении биотестирования на водорослях дополнительно необходимы:

баня водяная;
вата для изготовления ватно-марлевых пробок;
камера счетная Горяева (ТУ 42–816) или Нажотта (ТУ 64–1–816);
колбы плоскодонные конические вместимостью 250 см³ по ГОСТ 25336-82;
колориметр фотоэлектрический (ФЭК-56 или КФК-3) или спектрофотометр либо аналогичный по метрологическим характеристикам прибор;
люминоста́т с освещением рабочей зоны 2000–3000 лк от ламп дневного света;
марля для изготовления ватно-марлевых пробок;
микроскоп с кратностью увеличения не менее 400 раз;
плитка электрическая по ГОСТ 14919;
покровные стекла по ГОСТ 6672;
предметные стекла по ГОСТ 9284;
спиртовка;
термометр лабораторный по ГОСТ 215, цена деления шкалы 0,1 °С
фильтры мембранные № 4;
фильтровальный аппарат.

3. При проведении биотестирования на рыбах дополнительно необходимы:

аквариумы емкостью 50 и 200 дм³ для поддержания тест-культур;
корм для гуппи: сухой (комбинированный корм, дафнии) и живой (дафнии, коретра);
приспособление для термостатирования: термолу́миноста́т, поддерживающий температуру воды 20±2 °С и освещенность 500±100 лк;
посуда стеклянная для биотестирования вместимостью 5 дм³;
сачок для отлова рыбы;
стеклянная палочка.

Методика приготовления восстановленной воды

Восстановленную воду готовят в соответствии с требованиями, изложенными в ИСО 6341 (ниже приведен один из вариантов).

Восстановленную воду получают из 4 исходных растворов: хлористого кальция, сульфата магния, бикарбоната натрия и хлористого калия, полученных на основе дистиллированной или деионизированной воды. Все реактивы должны быть аналитической степени чистоты.

1. Раствор хлористого кальция получают растворением 11,76 г дигидрата хлористого кальция ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) в воде с доведением до 1 дм³.

2. Раствор сульфата магния получают растворением 4,93 г гептагидрата сульфата магния ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) в воде с доведением до 1 л.

3. Раствор бикарбоната натрия получают растворением 2,59 г бикарбоната натрия (NaHCO_3) в воде с доведением до 1 дм³.

4. Раствор хлористого калия получают растворением 0,23 г хлористого калия (KCl) в воде с доведением до 1 дм³.

Смешивают по 25 мл каждого из четырех растворов и доводят общий объем дистиллированной или деионизированной водой до 1 дм³. Приготовленная таким образом восстановленная вода отстаивается 12 ч, насыщается кислородом до равновесного состояния с окружающей средой и не нуждается в дальнейшей аэрации. Сумма ионов Ca и Mg в этом растворе составляет 2,5 ммоль/дм³, соотношение ионов Ca/Mg 4:1 и Na/K 10:1, общая щелочность 0,8 ммоль/дм³; pH полученной воды должна быть в пределах $7,8 \pm 0,2$. При необходимости возможна корректировка pH раствором гидроксида натрия или соляной кислотой.

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

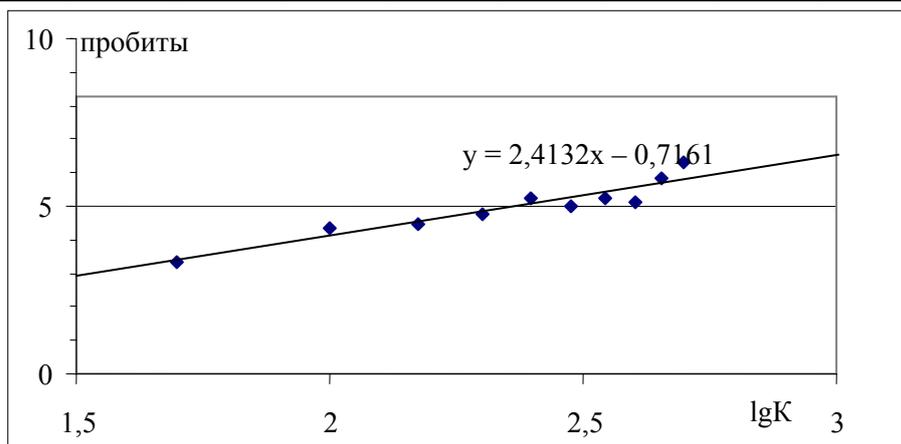


Рис. Установление ЭК₅₀ графическим способом

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

1.2. 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).

1.3. Определение доверительного интервала

Доверительный интервал Э(Л)К₅₀ находится в границах

Э(Л)К₅₀ ± S_xt, где S_x — ошибка, t — критерий Стьюдента, равный 1,96.

Отчетность

Отчет о проведении теста должен, по возможности, включать следующую информацию:

№ п/п	Данные
1.	Информация о тестовых организмах: <ul style="list-style-type: none"> • научное название, штамм, его источник • методика культивирования, метод кормления (источник, вид, количество пищи, частота питания) • любые предварительные манипуляции со штаммом в период подготовки к тестированию
2.	Все необходимые данные для идентификации проб или исследуемого вещества
3.	3.1. Методы приготовления проб: <ul style="list-style-type: none"> • для сточных вод — способ и длительность хранения проб, условия, при которых в случае необходимости осуществляется осветление или фильтрация проб и размораживание; • для химических веществ — метод приготовления основных и исследуемых растворов 3.2. Вода, используемая для разведения: источник, важнейшие химические характеристики (рН, температура, жесткость) 3.3. Перечень использовавшихся концентраций и любая доступная информация о стабильности в концентрациях тестируемых веществ в тестовых растворах
4.	Перечень оборудования, применяемого для проведения исследований
5.	Использовавшиеся методы химического анализа, полученные результаты
6.	Условия проведения 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.	9.1. Таблица, отражающая кумулятивную иммобилизацию животных на каждой концентрации, контроля, контроля со вспомогательными веществами (если используются) на каждый из рекомендуемых периодов наблюдения (24, 48, 96 ч) 9.2. Кривая концентрация/эффект

10.	<p>Результат эксперимента в виде:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Э(Л)К₅₀ (Э(Л)КР₅₀) для каждого из рекомендуемых периодов наблюдения (если возможно) и доверительный интервал • Э(Л)К₁₆ и Э(Л)К₈₄ для каждого из рекомендуемых периодов наблюдения (если возможно) • БКР₁₀ для каждого из рекомендуемых периодов наблюдения (если возможно) — для сточных и природных вод <p>По возможности:</p> <ul style="list-style-type: none"> • наибольшая из протестированных концентраций, не вызвавшая иммобилизации через 96 ч — Э(Л)К₀ • наименьшая из протестированных концентраций, вызвавшая иммобилизацию 100% через 96 ч — Э(Л)К₁₀₀ <p>Статистические процедуры, использовавшиеся для определения значений параметров токсичности</p>
11.	<p>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</p>
12.	<p>Рекомендации</p>

Категории острой токсичности согласно СГС

СГС для веществ состоит из 3 категорий острой токсичности Критерии для отнесения вещества к категории острой токсичности 1–3 определяются на основе исключительно данных для острой токсичности (Э(Л)К₅₀).

Таблица

Категории для веществ, опасных для водной среды. Острая токсичность

Категория: ОСТРАЯ 1		
96 ч ЛК ₅₀ (для рыб)	≤1 мг/дм ³	и/или
48 ч ЭК ₅₀ (для ракообразных)	≤1 мг/дм ³	и/или
72 или 96 ч Э _с К ₅₀ (для водорослей и других водных растений)	≤1 мг/дм ³	
Категория 1 может быть подразделена для использования в некоторых регулирующих системах, с тем чтобы включать нижний диапазон при Л(Э)К ₅₀ ≤0,1 мг/дм ³		
Категория: ОСТРАЯ 2		
96 ч ЛК ₅₀ (для рыб)	>1 — ≤10 мг/дм ³	и/или
48 ч ЭК ₅₀ (для ракообразных)	>1 — ≤10 мг/дм ³	и/или
72 или 96 ч Э _с К ₅₀ (для водорослей и других водных растений)	>1 — ≤10 мг/дм ³	
Категория: ОСТРАЯ 3		
96 ч ЛК ₅₀ (для рыб)	>10 — ≤100 мг/дм ³	и/или
48 ч ЭК ₅₀ (для ракообразных)	>10 — ≤100м мг/дм ³	и/или
72 или 96 ч Э _с К ₅₀ (для водорослей и других водных растений)	>10 — ≤100 мг/дм ³	
<i>Примечание.</i> В некоторых регулирующих системах этот диапазон может быть расширен за пределы Л(Э)К ₅₀ 100 мг/дм ³ путем введения еще одной категории		

Протокол поддержания лабораторной культуры водорослей *scenedesmus subspicatus*

1. Морфологические особенности

Scenedesmus subspicatus — пресноводные одноклеточные протококковые водоросли. Морфологические признаки представлены на рис. 1.

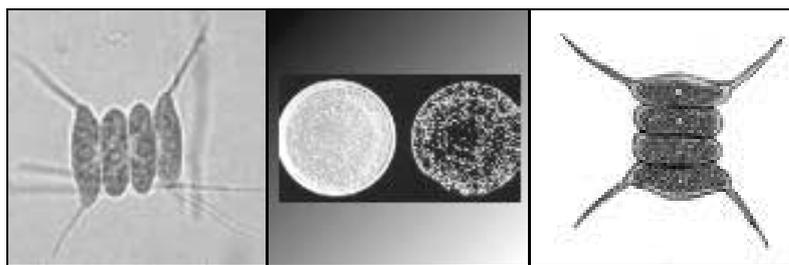


Рис. Водоросли вида *Scenedesmus subspicatus*

2. Условия содержания *Scenedesmus subspicatus*

Культивирование водорослей осуществляется в конических плоскодонных колбах объемом 250–300 см³ в люминостате с интенсивностью освещения не менее 2000–3000 лк при температуре 20±2 °С 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 посуду промывают смесью бихромата калия и серной кислоты (хромовой смесью), затем тщательно водопроводной водой и 3–4 раза дистиллированной. Посуду, используемую для культивирования и биотестирования, за исключением мерной, стерилизуют в сушильном шкафу при 160 °С в течение 1,5 ч. Не разрешается применять для мытья посуды синтетические поверхностно-активные вещества и органические растворители. Можно пользоваться пищевой содой.

3. Питательные среды

Лабораторную культуру водорослей выращивают на питательной среде Прата или Успенского (приложение 7). 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 в сут.

Для посева в стерильную колбу с питательной средой объемом 150 см³ приливают из исходной культуры водорослей верхний слой клеток (около 15–20 см³) и колбу ставят в люминостат для подрачивания культуры. Через 3-е сут подсчитывают численность клеток, она должна составлять около 5 млн/см³.

Количество культуры водорослей, обязательное для получения в опытном и контрольном объеме питательной среды необходимой плотности клеток (по 30 тыс./см³), устанавливают расчетным путем (как правило, это 0,5–1 см³ культуры водорослей).

5. Подсчет плотности культуры водорослей

Для подсчета количества клеток водорослей используют счетную камеру Горяева (либо другую). Допустимо также применять фотоэлектроколориметр типа ФЭК-56, КФК-3, спектрофотометр или прибор для измерения флуоресценции водорослей (быстрой или замедленной) с дальнейшим определением численности клеток по калибровочной кривой. Процедура подсчета клеток описана в приложении 8.

При биотестировании исходную численность клеток определяют в каждой колбе. Она должна составлять не менее 30×10^3 кл/см³ при подсчете в счетной камере и не менее 50×10^3 кл/см³ — оптическим методом.

6. Проверка пригодности тест-культуры для биотестирования

Не реже 1 раза в мес. культуру водорослей проверяют на пригодность для биотестирования. Для этого устанавливают ЭК₅₀ за 48 ч раствора эталонного вещества калия дихромовоокислого.

Готовят исходный раствор К₂Сг₂О₇ с концентрацией 1 г/дм³, используя дистиллированную воду. Далее из исходного раствора готовят серию растворов с концентрациями К₂Сг₂О₇ от 1 до 3 мг/дм³ с интервалом 0,5 мг/дм³, 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/см³. Биотестирование этих растворов продолжается 48 ч. На основании полученных результатов рассчитывают процент снижения численности клеток водорослей в протестированных растворах по сравнению с контролем и определяют концентрацию К₂Сг₂О₇, которая вызывает уменьшение численности водорослей на 50% (ЭК₅₀ за 48 ч). Диапазон реагирования тест-объекта должен быть в пределах ЭК₅₀₋₄₈=1,3–2,5 мг/дм³ К₂Сг₂О₇.

Если полученная величина ЭК₅₀ за 48 ч находится в экспериментально установленном диапазоне реагирования тест-объекта (1,3–2,5 мг/дм³ К₂Сг₂О₇), культура водорослей пригодна для биотестирования. Если ЭК₅₀ за 48 ч К₂Сг₂О₇ не находится в указанном диапазоне реагирования, то проверяют условия культивирования тест-объекта, чтобы выяснить причины ухудшения состояния культуры; при необходимости культуру заменяют.

Методика приготовления питательных сред для культур водорослей

Таблица

Состав питательных сред для культивирования водорослей

Компоненты среды	Концентрация	
	в среде для культивирования, г/дм ³	концентрированные растворы для приготовления среды, г/100 см ³
Питательная среда Успенского № 1		
KNO ₃	0,025	2,5
Mg ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	0,025	2,5
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0,144	14,4
KH ₂ PO ₄ ·3H ₂ O	0,025	2,5
K ₂ CO ₃	0,0345	3,45
Питательная среда Прата		
KNO ₃	0,10	10,0
Mg ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	0,01	1,0
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,01	1,0
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,001	0,1

1. Приготовление питательных растворов

Питательные растворы готовят на дистиллированной воде, полученной из стеклянного перегонного аппарата (допускается приготовление питательной среды для водорослей на бидистиллированной воде, при этом 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 водяной бане каждый по 10–15 мин, охлаждают, после чего их можно использовать для приготовления среды в течение месяца 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 дм³, заполненную до половины дистиллированной

водой. Затем поочередно, в последовательности их расположения в таблице, доводят до метки 1 дм³ дистиллированной водой, тщательно перемешивают, кипятят раствор 30 мин, охлаждают и после этого добавляют 1 см³ 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/дм³, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ — 1,81 г/дм³, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,222 г/дм³);

раствор В (MoO_3 — 1,81 мг/дм³, NH_4VO_3 — 22,96 мг/дм³).

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

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

При культивировании периодически обновляют культуру водорослей, пересевая ее на свежую питательную среду не реже одного раза в 10 дней. Для этого в стерильную колбу объемом 250–300 см³ со свежей средой Прата объемом 150 см³ над пламенем спиртовки наливают 15–20 см³ верхнего слоя исходной культуры (содержимое последней при этом не перемешивают). Начальная плотность клеток в новой колбе составляет примерно $100\text{--}150 \times 10^3$ кл/см³, что дает светло-зеленую окраску. В случае ослабления интенсивного роста клеток в культуре к питательной среде добавляют витамин В₁₂.

Техника подсчета плотности культуры водорослей

1. Подсчет количества клеток водорослей в счетной камере Горяева (либо другой)

Пипеткой отбирают суспензию водорослей из колбы, наносят по одной капле на сетки в счетной камере Горяева. Затем камеру накрывают покровным стеклом, которое притирают по бокам до появления колец интерференции. Через 1–2 мин считают количество 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 см^3 в образце по формуле 1:

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

где $m_{k(оп)ij}$ — количество подсчитанных клеток водорослей в камере в контроле (опыте) для i -той 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 см^3 по формуле 2:

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

где I — количество капель суспензии.

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

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

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

2. Определение численности клеток фотоэлектроколориметром типа ФЭК-56, КФК-3, спектрофотометром или прибором для измерения флюоресценции водорослей (быстрой или замедленной) с дальнейшим определением численности клеток по калибровочной кривой.

Построение калибровочной кривой для определения численности клеток водорослей осуществляют 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-х 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 см^3 культуры.

Необходимо учесть, что калибровочная кривая соответствует определенному устройству, кювете, длине волны и культуре.

Периодически, один раз в месяц, проверяют калибровочную кривую.

Протокол поддержания лабораторной культуры рыб гуппи *poecillia reticulata peters*

1. Характеристика вида

Гуппи *Poecillia reticulata* Peters — широко распространенная аквариумная живородящая рыба. Половозрелые гуппи имеют хорошо развитые половые признаки, что облегчает их сортировку. Самцы, как правило, мельче (3–4 см) и имеют более яркую окраску, чем самки. У них преобладают серовато-коричневые тона с очень яркими красными, голубыми, зелеными и черными пятнами. Самки больше самцов, до 6 см в длину, чаще желтовато-зеленые (рис.). Анальный плавник у самок округлый. У молодых самцов он имеет ту же форму, однако со временем, в период полового созревания, начинает удлиняться и превращается в подвижный гоноподий. Выдерживает значительные колебания солености. Продолжительность жизни составляет 3–3,5 года.

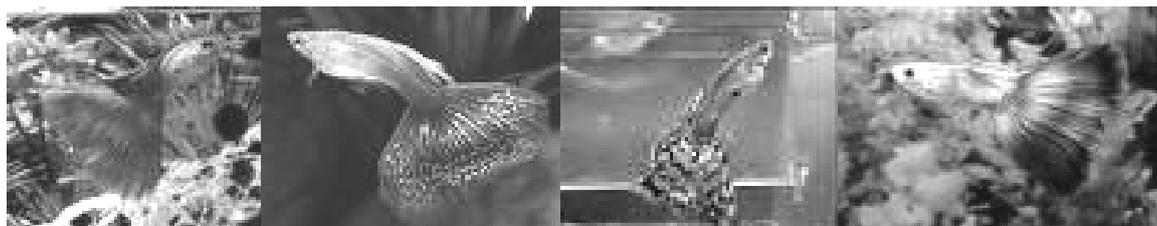


Рис. Гуппи (*Poecillia reticulata* Peters)

2. Условия содержания

Для содержания (культивирования) гуппи пригодны любые термостатируемые аквариумы, которые обеспечивают температуру воды 25 ± 1 °С и плотность посадки самцов — из расчета 1–2 дм³ воды на 1 экземпляр, самок — не менее 4 дм³.

Аквариум заполняют отстоянной и проаэрированной в течение 3-х сут питьевой водопроводной водой, рН 8,0–8,5, температура 21–25 °С. Содержание растворенного в воде кислорода должно быть не менее 4 мг/дм³. Аквариумы освещают верхним светом не менее 8 ч в 1 сут. В качестве источника света используют обычные лампы дневного света.

Каждые три дня часть воды (1/4–1/5 часть) заменяют свежей. Первоначальный объем воды в аквариумах поддерживают, доливая воду вместо испарившейся. Добавляемая вода должна быть той же температуры, что и в аквариуме. Ил со дна аквариума необходимо убирать регулярно при помощи сифона. Перед размещением рыб аквариумы засаживают растениями. Предпочтение следует отдавать густым мелколистным растениям без жестких, режущих кромок (например, зеленая водоросль рода *энтероморфа*, которая развивается при хорошем освещении и служит для

гуппи укрытием и кормом) и обязательно плавающим растениям (риччия, сальвиния). Спереди или в центре аквариума должно быть свободное пространство для плавания. Кроме рыб, в аквариум рекомендуется также заселять живых дафний для создания натурального биоценоза.

3. Кормление

Кормят гуппи 1–2 раза в 1 сут, производителей чаще — 3–5 раз, сухим (комбинированный корм, дафнии) или живым кормом (дафнии, коретра). Корм вносят в таком количестве, чтобы рыбы съедали его без остатка за 3–5 мин, поскольку излишки приводят к ухудшению качества воды в аквариуме.

4. Получение тест-культуры

Самцов и самок содержат в отдельных аквариумах, так как при совместном содержании самцы растут медленнее и имеют меньшие размеры. Для получения молоди отбирают производителей не старше 2 лет без каких-либо признаков заболевания, и за три дня до постановки опытов их помещают в общий аквариум для спаривания. Гуппи относятся к рыбам с внутриутробным развитием икры, способным к нересту полностью сформировавшихся мальков. Соотношение самок и самцов должно составлять приблизительно 2:1 или 3:1. Необходимо учитывать тот факт, что однажды оплодотворенная самка может нереститься несколько раз.

Самку готовят к нересту, помещая в отдельную нерестовую емкость вместимостью не менее 5 дм³. Готовность самки к нересту определяется наличием хорошо заметного темного пятна перед анальным плавником, при этом форма брюшка приближается к прямоугольной, и оно становится намного шире спины. Нерестовые посуды заполняют водой такого же качества, как и для содержания производителей, и термостатируют при температуре 25±1 °С. После окончания нереста самок изолируют, поскольку они поедают потомство.

Мальки, как правило, рождаются совершенно сформированными. Лучшим кормом для них является «пыль», состоящая из представителей разных морских организмов: инфузорий, коловраток, молоди ветвистоусых рачков и науплиусов веслоногих рачков. При отсутствии «пыли» молодь гуппи можно кормить измельченным сухим кормом. На 100 рыб вносят не более 1 г сухого корма в 1 сут. По мере роста в рацион рыб вводят измельченный живой корм (резаный трубочник, мотыль, коретру и другие живые корма). Одно-, двухнедельных мальков кормят до 5 раз в 1 сут, более взрослых — 2–3 раза. Вносимые порции корма должны быть небольшими и поедаться рыбами в течение 3–5 мин.

Мальков сортируют, чтобы избежать неравномерности развития, и постепенно переводят из нерестовых аквариумов в выростные, сначала вместимостью 50 дм³, а далее 200 дм³. Аквариумы заполняют водой такого же качества, как и для производителей гуппи. С появлением первых признаков половых различий самцов отделяют от самок и выращивают в отдельных аквариумах.

Мальки становятся половозрелыми в 4–6 мес.

5. Проверка пригодности тест-культуры для биотестирования

Не реже одного раза в полгода мальков гуппи в возрасте 24–48 ч проверяют на пригодность к биотестированию с использованием в качестве эталонного вещества двуххромовокислого калия ($K_2Cr_2O_7$). С этой целью устанавливают ЛК₅₀ за 96 ч биотестирования (ЛК₅₀₋₉₆) раствора эталонного вещества $K_2Cr_2O_7$. Для этого готовят исходный раствор $K_2Cr_2O_7$ с концентрацией 10 г/дм³, используя дистиллированную воду. Далее из исходного раствора готовят серию растворов с концентрациями $K_2Cr_2O_7$ от 100 до 200 мг/дм³ с интервалом 25 мг/дм³, используя воду питьевого качества. Биотестирование этих растворов проводят продолжительностью 96 ч в соответствии с процедурой, изложенной ранее (гл. 6, пп. 1–3). На основании полученных результатов рассчитывают ЛК₅₀₋₉₆.

Тест-культура считается пригодной для биотестирования, если полученная величина ЛК₅₀₋₉₆ находится в экспериментально установленном диапазоне реагирования тест-объекта — 45–60 мг/дм³ $K_2Cr_2O_7$. Если ЛК₅₀₋₉₆ для $K_2Cr_2O_7$ не находится в указанном диапазоне, необходимо проверить условия культивирования с целью установления причин ухудшения состояния культуры при необходимости.