

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Главный государственный
санитарный врач

Республики Беларусь

В.И.Качан

«_____» _____ 2008 г.

Регистрационный № 093-1008

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ
ВЕЩЕСТВ, ИХ СМЕСЕЙ, ПРИРОДНЫХ И СТОЧНЫХ ВОД
МЕТОДОМ БИОТЕСТИРОВАНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ
РАКООБРАЗНЫХ В КАЧЕСТВЕ ТЕСТ-ОБЪЕКТОВ
(DAPHNIA MAGNA И CYPRIDOPSIS VIDUA)

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр гигиены» Министерства
здравоохранения Республики Беларусь

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

НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая Инструкция по применению устанавливает методику определения острой токсичности химических веществ и их смесей, природных и сточных вод в лабораторных условиях с использованием в качестве тест-объекта низших ракообразных дафний и остракод.

Настоящая Инструкция по применению применяется для оценки токсичности водорастворимых химических веществ и их смесей, а также наряду с физико-химическими методами при установлении нормативных требований к качеству вод, проведении контроля за соблюдением нормативов допустимых сбросов химических веществ в водные объекты; осуществлении мониторинга водных объектов прежде всего, в районах расположения источников антропогенного воздействия; проведении оценки состояния водных экосистем.

2. 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.

ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей Инструкции по применению используются следующие термины и определения:

безвредная (не вызывающая эффекта острой токсичности) концентрация отдельных веществ или кратность разбавления вод ($BK_{10}/BKР_{10}$) - экспериментально полученное значение концентрации химического вещества в воде или кратности разбавления вод, вызывающей изменение тест-реакции у не более 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 или в разных лабораториях, или в разное время);

иммобилизация – отсутствие у животных способности к движению в течение 15 секунд после легкого встряхивания тестируемого субстрата;

исходный раствор – концентрированный водный раствор исследуемого вещества, из которого готовят растворы с разными концентрациями этого вещества;

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 наблюдений;

острая токсичность – присущее 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 часа;

предельно допустимый сброс – масса 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 – 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

ПРИНЦИП МЕТОДИКИ

3. Методика, изложенная в настоящей Инструкции по применению, основана на определении иммобилизации дафний *Daphnia magna*

(Cladocera, Crustacea) и остракод *Cypridopsis vidua* (Ostracoda, Crustacea) при воздействии химических веществ, присутствующих в исследуемой водной среде, по сравнению с контрольной культурой в пробах, не содержащих токсические вещества (контроль).

4. Острое токсическое действие исследуемых химических веществ, их смесей, сточных и природных вод определяется по иммобилизации животных за определенный период экспозиции. Критерием острой токсичности служит иммобилизация 50% и более животных за 48 часов (дафнии) и 96 часов (остракоды) в исследуемом образце при условии, что в контрольном эксперименте иммобилизация не превышает 10%.

5. В эксперименте по определению острого токсического действия устанавливают:

медианную эффективную концентрацию отдельных веществ (далее - ЭК₅₀);

медианную эффективную кратность разбавления вод (далее - ЭКР₅₀);

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

6. Процедура тестирования острой водной токсичности включает 3 фазы: подготовка к тестированию, непосредственно тестирование проводимое 2 этапа, оценку результатов.

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

ГЛАВА 4

УСЛОВИЯ БЕЗОПАСНОГО ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТ

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

8.1. предельно допустимые концентрации, применяемых при работе токсичных, едких и легковоспламеняющихся веществ 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 09.03.1994 г.;

8.2. 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 от 25 марта 1999 г. № 12 и ГОСТ 12.1.005-88;

8.3. безопасность при работе с электроустановками обеспечивается по ГОСТ 12.1.019-79 и в соответствии с требованиями инструкций к оборудованию;

8.4. помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004-91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009-83;

8.5. организация обучения работающих безопасности труда по ГОСТ 12.0.004-90.

ГЛАВА 5

ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ЛИЦ, ПРОВОДЯЩИХ
БИОТЕСТИРОВАНИЕ

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

ГЛАВА 6

УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

10. Биотестирование проводится в нормальных лабораторных условиях, в помещении, где не хранятся летучие вещества и не проводятся работы с их применением. До эксперимента и во время его проведения лабораторные помещения не обрабатывают инсектицидами.

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

Освещение помещения естественное или искусственное. 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 термолюминоостат.

Отбираемый объем должен быть в 2 раза больше требуемого для хранения дубликата пробы до конца тестирования.

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

ГЛАВА 7

ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

11. Сбор имеющейся доступной информации о химическом веществе, предполагаемом составе сточных вод и ее анализ.

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

12. 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 использовать метод ультразвуковой дисперсии. Из органических растворителей рекомендуются: триэтиленгликоль, диметилформамид, этанол, ацетон;

выбор подходящего тест-организма семейства ракообразных (если имеется информация об избирательной чувствительности того или иного вида к отдельным классам химических соединений).

13. Культивирование тест-культуры.

13.1. в качестве тест-объектов используют лабораторные культуры дафний - *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) и (или) остракод - *Cypridopsis vidua* (Ostracoda, Crustacea);

13.2. культуры выращивают в стеклянной посуде. Посуду моют питьевой содой и тщательно ополаскивают дистиллированной водой. Нельзя применять синтетические моющие средства и органические растворители;

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

13.4. кормление осуществляется один раз в сутки. Дафниям обеспечивают комбинированное дрожже-водорослевое питание, а остракодам – водорослевое.

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 +4⁰С) 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 см³ дистиллированной воды. После набухания дрожжей суспензию тщательно перемешивают и отстаивают в течение 30 мин. Надосадочную жидкость добавляют в посуду с дафниями в количестве 3 см³ на 1 дм³ воды 1-2 раза в неделю.

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

Маточная культура поддерживается в одном или двух сосудах, ее плотность 20-25 особей в 1 дм³ (дафнии) и 30-50 особей в 1дм³ (остракоды). 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 дафний самку средних размеров с выводковой камерой, заполненной эмбрионами, помещают в химический стакан объемом 250 см³ и вносят корм. Появившаяся молодежь переносится в культиватор (стеклянная посуда емкостью 2,0 дм³) 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 сутки до биотестирования отсаживают в стеклянную посуду емкостью 0,5 - 1,0 дм³ и вносят корм. После появления молоди (каждая самка может

выметать от 10 до 40 молодых дафний) взрослых особей удаляют. Полученная молодь (третья генерация) является синхронизированной культурой и может быть использована для биотестирования в возрасте 6-24 часов.

Для получения синхронизированной культуры *C. vidua* в стеклянную посуду вместимостью 1 дм³ 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 сутки до проведения эксперимента в отдельный сосуд отбирают подвижных юных особей, из которых для проведения 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.

13.6. Пересаживают животных при помощи стеклянной трубки внутренним диаметром 5-7 мм (дафнии) и 2-3 мм (остракоды) так, чтобы их не травмировать. Для этого конец трубки помещают под поверхность воды и держат до тех пор, пока животные не перейдут в трубку.

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

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

С этой целью для дафний устанавливают медианную эффективную концентрацию за 24 ч биотестирования ($ЭК_{50-24}$), для остракод - за 96 ч ($ЭК_{50-96}$). Если полученные $ЭК_{50}$ находится в

экспериментально установленных диапазонах реагирования тест-объектов, культуры пригодны для биотестирования. Для дафний диапазон реагирования тест-объекта равен 0,6–1,7 мг/дм³ K₂Cr₂O₇. Для *C. vidua* определяется в лаборатории, в которой содержится культура.

Если ЭК₅₀ не находятся в установленных диапазонах реагирования, проверяют условия культивирования тест-объекта, чтобы выяснить причины ухудшения состояния культуры. При необходимости культуру заменяют на новую.

15. 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 используемая в тесте разбавляющая вода) в течение не менее 48 часов.

16. Отбор проб поверхностных вод осуществляют согласно ГОСТ 17.1.5.05-85, сточных – «Инструкции по отбору проб для анализа сточных и поверхностных вод», утвержденной Первым заместителем Председателя Государственного комитета Республики Беларусь по экологии 16 февраля 1994 г.

Объем пробы воды для определения острой токсичности должен быть в 2 раза больше требуемого для хранения дубликата пробы до конца тестирования.

Для отбора и хранения проб используют стеклянную посуду, которую заполняют под пробку и плотно закрывают.

Пробы, отобранные для биотестирования, не подлежат консервированию химическими веществами или 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 $4 \pm 2^\circ\text{C}$ не более 72 ч.

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

17. Приготовление растворов тестируемых веществ заданных концентраций:

17.1. для биотестирования химического вещества или их смеси готовят исходный раствор путем растворения исследуемого вещества в воде. Для этих целей может использоваться бутилированная питьевая, дехлорированная водопроводная либо восстановленная вода. Рекомендуемыми 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 мг/ 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 ;

17.2. восстановленную воду готовят в соответствии с ИСО 6341, один из примеров приведен в приложении 2 к настоящей Инструкции по применению.

17.3. выбранные тестовые концентрации готовятся разведением исходных сточных, природных вод либо маточного раствора тестируемого вещества. Если тестируются высокие концентрации, вещество может быть непосредственно растворено в воде;

Для определения медианной эффективной кратности разбавления пробы воды ($ЭКР_{50}$) или медианной эффективной концентрации вещества (смеси веществ) – $ЭК_{50}$ готовят серию (не менее пяти) разбавлений пробы воды или серию (не менее пяти) растворов с разными концентрациями исследуемого вещества (смеси веществ);

17.4. химические соединения должны тестироваться до предела растворимости в воде. Для некоторых веществ, имеющих низкую растворимость в воде, или высокий K_{ow} , 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);

17.5. 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 должны превышать 100мг/л.

ГЛАВА 8

ВЫПОЛНЕНИЕ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

18. В ходе эксперимента ракообразные в течение 48 часов (*D.magna*) и 96 часов (*C. vidua*) подвергаются воздействию растворенного в воде вещества в диапазоне концентраций.

19. Растворы тестовых концентраций должны готовиться непосредственно перед внесением тест-организмов. Эксперимент должен начаться не позднее, чем через 30 минут с момента

приготовления растворов. При биотестировании веществ и их смесей обязателен контроль концентрации в начале и конце теста.

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).

Посуда для проведения опытов: 250 мл стеклянные химические стаканы.

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

Повторность в опыте и контроле трехкратная.

Тест-организмы: молодь *D. magna* в возрасте 6-24 часов и молодь *C. vidua* не старше 2 недель и размером не более 0,3 мм.

Кормление: в течение теста животных не кормят, последнее кормление - за 2-3 ч до начала биотестирования

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

pH в контроле и тестовых растворах должен измеряться в начале теста и в конце теста. Тест должен выполняться без корректировки pH. Если есть доказательства заметных изменений pH, рекомендуется, чтобы тест был повторен после коррекции. Для этих целей предпочтительно использовать HCl и NaOH. Корректировка pH 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 найти отражение в результатах теста.

Световой период: желательно тест проводить с чередованием циклов света и темноты 16 ч:8 ч либо 12 ч:12 ч соответственно с 15-30 минутным переходным периодом.

Учет результатов: через 24, 48 и 96 часов 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.

По окончании эксперимента в каждом сосуде определяют рН, концентрацию тестируемого вещества.

Сразу же после учета эксперимента измеряют 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).

20. Тест на установление границ исследования (1-ый этап биотестирования) проводится с целью установления диапазона концентраций для окончательного тестирования. Ракообразные экспонируются концентрациям в широком диапазоне, например: 1, 10, 100 мг/л. Каждой концентрации (разведению) экспонируют не менее 5 животных. Экспозиция может быть укорочена, если данные могут быть получены за более короткий период времени.

21. Окончательный тест (2-ой этап биотестирования) заключается в экспонировании животных пятью и более концентрациями, выбранным в геометрической прогрессии с отношением между ними от

1,5 до 2 (например, 2, 4, 8, 16, 32 и 64 мг/л). Его цель – на основании полученных данных построить кривую зависимости «концентрация – ответ» и установить значения 48/96-ч ЭК₅₀.

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

22. Если полученное значение ЭК₅₀ при тестировании химического вещества или смеси выше 100 мг/дм³ проводят контрольный тест: экспонируют животных веществу в концентрации 100мг/дм³ в течение 96 ч с целью доказать, что ЭК₅₀ выше, чем эта концентрация. Если природа химического вещества такова, что концентрация 100мг/ дм³ в тестовой 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.

ГЛАВА 9 КРИТЕРИИ КАЧЕСТВА

23. Результаты испытания могут считаться достоверными при следующих условиях:

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 не устойчивы 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.

иммобилизация в контролях не превышает 10%,
 значение рН варьирует не более чем на 1 единицу,
 содержание растворенного кислорода, определенное в конце эксперимента (как указано в п.19), не ниже 2 мг/дм³.

ГЛАВА 10

ОБРАБОТКА И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

24. На основании результатов трех параллельных определений в контроле и опыте находят средние арифметические количества иммобилизованных животных в контроле (опыте). Затем рассчитывают в процентах количество иммобилизованных животных в опыте по отношению к контролю по формуле 1:

$$A = \frac{\bar{X}_k - \bar{X}_{on}}{\bar{X}_k} \cdot 100, \quad (1)$$

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 острой токсичности пробы воды, вещества (смеси веществ) 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.

25. Если проба проявляет острую токсичность, то для количественной оценки токсичности анализируемой пробы воды устанавливают ее среднее эффективное разбавление за 48/96 ч биотестирования ($ЭКР_{50-48}$ или $ЭКР_{50-96}$). Для количественной оценки токсичности вещества (смеси веществ) устанавливают медианную эффективную концентрацию за 48/96 ч биотестирования ($ЭК_{50-48}$ или $ЭК_{50-96}$) и ее доверительный интервал ($P=0,05$).

26. Значения $ЭК_0$ (наибольшая из протестированных концентраций, не вызвавшая иммобилизации через 48/96 ч) и $ЭК_{100}$ (наименьшая из протестированных концентраций, вызвавшая иммобилизацию 100% через 48/96 ч) определяют непосредственно из результатов эксперимента.

27. Если экспериментально не удалось получить точные значения кратности разбавления, вызывающие 10% и 50%-ный 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, 96 ч) в соответствии с приложением 3 к настоящей Инструкции по применению. Также может быть использован метод пробит-анализа по Литчфильду-Вилкоксону.

28. Значения $ЭК_x$ должны быть выражены в процентах либо в $см^3/дм^3$ в случае использования сточных вод; в $мг/дм^3$ в случае тестирования химических веществ.

29. Отчет о проведении теста должен включать информацию, указанную в приложении 4 к настоящей Инструкции по применению.

30. Интерпретация полученных данных должна проводиться в соответствии с критериями, приведенными в Согласованной на глобальном уровне системе классификации и маркировки химических веществ (далее – СГС), изложенными в приложении 5 к настоящей Инструкции по применению.

ГЛАВА 11

КОНТРОЛЬ ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ

31.1. Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности проводят в объеме 5% от количества текущих измерений по результатам двух определений токсичности анализируемых пробы воды, раствора вещества (смеси веществ) полученных в условиях воспроизводимости (ЭКР₁, ЭКР₂ или ЭК₁, ЭК₂).

31.2. Решение об удовлетворительности воспроизводимости определений принимается при условии:

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

где D – норматив оперативного контроля воспроизводимости составляет 94%.

Приложение 1
к Инструкции по применению
«Определение острой токсичности
химических веществ, их смесей,
природных и сточных вод методом
биотестирования и применением
ракообразных в качестве тест-
объектов (*Daphnia magna* и
Cypridopsis vidua)»

ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ

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

микрокомпрессор аквариумный,

аппарат для встряхивания,

мешалка лабораторная,

оксиметр с погрешностью измерения не более 0,5 мг О₂/дм³,

лупа складная,

груши резиновые разные,

термолюминодат, поддерживающий температуру воды (20±2)°С,

освещенность (500±100) лк,

весы лабораторные, 2 класса точности, с наибольшей предельной нагрузкой 200 г по ГОСТ 24104,

воронки разные лабораторные по ГОСТ 25336-82,

бюксы или стаканчики для взвешивания, диаметром 30, 40 мм,

центрифуга лабораторная медицинская,

термометр с ценой деления шкалы 1°С по ГОСТ 112-78,

холодильник, поддерживающий температуру $(4\pm 2)^\circ\text{C}$,
шкаф сушильный электрический общелабораторного назначения,
рН – метр,
колбы мерные вместимостью 0,5 и 1,0 дм³, 2 класса точности по
ГОСТ 1770-74,
бумагу фильтровальную ГОСТ 12026-76,
пипетки мерные вместимостью от 1 до 10 см³, 2 класса точности
ГОСТ 29227-91,
автоматические дозаторы любого типа,
посуда стеклянная вместимостью 2 дм³ (для культивирования
дафний), 250 см³ (для биотестирования), 1 дм³ (для
транспортирования и хранения проб воды),
пробирки стеклянные, вместимостью 10 см³ ГОСТ 25336-82,
цилиндры мерные вместимостью 0,1; 0,5 и 1,0 дм³, 2 класса
точности ГОСТ 1770-74,
культура зеленых водорослей рода *Chlorella*,
дрожжи хлебопекарные ГОСТ 171-81,
железа хлорид ГОСТ 4147-74,
калий азотнокислый ГОСТ 4217-78,
калий двухромовокислый ГОСТ 4220-75,
калий фосфорнокислый двузамещенный ГОСТ 2493-75,
магний сернокислый ГОСТ 4523-77.

Приложение 2
к Инструкции по применению
«Определение острой токсичности
химических веществ, их смесей,
природных и сточных вод методом
биотестирования и применением
ракообразных в качестве тест-
объектов (*Daphnia magna* и
Cypridopsis vidua)»

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 и 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 и доведением до 1 л.

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

4. Раствор хлористого калия получают растворением 0,23 г хлористого калия (KCl) в воде и 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 часов, 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 должен быть в пределах $7,8 \pm 0,2$. При необходимости возможна корректировка pH раствором гидроксида натрия или соляной кислотой.

Приложение 3
к Инструкции по применению
«Определение острой токсичности
химических веществ, их смесей,
природных и сточных вод методом
биотестирования и применением
ракообразных в качестве тест-
объектов (*Daphnia magna* и
Cypridopsis vidua)»

**УСТАНОВЛЕНИЕ МЕДИАННОЙ ЭФФЕКТИВНОЙ
КОНЦЕНТРАЦИИ ТОКСИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА (СМЕСИ
ВЕЩЕСТВ) И СРЕДНЕГО ЭФФЕКТИВНОГО РАЗБАВЛЕНИЯ ВОДЫ**

Графический способ определения эффективных концентраций ($ЭК_x$), в том числе $ЭК_{50}$ 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/дм ³ 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 10% и 50%-ному эффекту - BKP_{10} , $ЭКP_{50}$, $ЭК_{50}$. Затем определяют доверительный интервал ($P=0,05$).

Таким же образом рассчитывают значения $ЭК_{16}$ и $ЭК_{84}$ (4 и 6 пробитов).

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 |

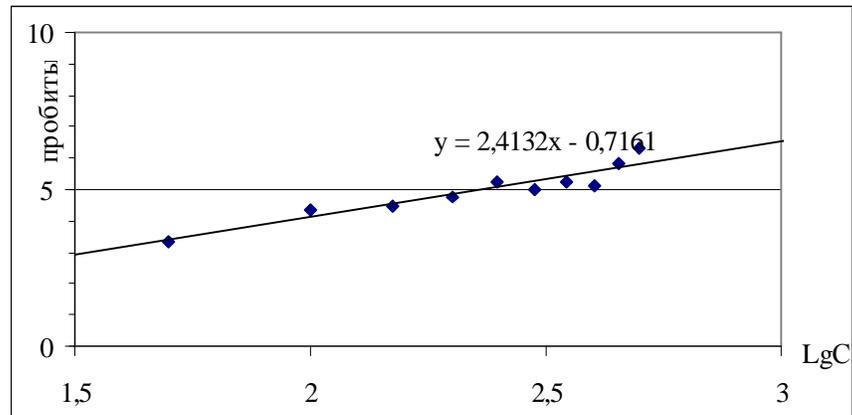


Рисунок 1. Установление ЭК₅₀ графическим способом

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

Приложение 4
к Инструкции по применению
«Определение острой токсичности
химических веществ, их смесей,
природных и сточных вод методом
биотестирования и применением
ракообразных в качестве тест-
объектов (*Daphnia magna* и
Cypridopsis vidua)»

ОТЧЕТНОСТЬ

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

| № п/п | данные |
|----------|---|
| 1. | Информация о тестовых организмах 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: 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. | Таблица, отражающая кумулятивную иммобилизацию животных на каждой концентрации, контроля, контроля со вспомогательными веществами (если используются) на каждый из рекомендуемых периодов наблюдения (24 ч, 48ч, 96 ч). Кривая концентрация/эффект. |
| 10. | Результат эксперимента в виде: ЭК ₅₀ (ЭКР ₅₀) для каждого из рекомендуемых периодов наблюдения (если возможно) и доверительный интервал, ЭК ₁₆ и ЭК ₈₄ для каждого из рекомендуемых периодов наблюдения (если возможно), БКР ₁₀ для каждого из рекомендуемых периодов наблюдения (если возможно) - для сточных и природных вод. По возможности: наибольшая из протестированных концентраций, не вызвавшая иммобилизации через 96 ч, наименьшая из протестированных концентраций, вызвавшая иммобилизацию 100% через 96 ч Статистические процедуры, использовавшиеся для определения значений 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. | Рекомендации |

Приложение 5
к Инструкции по применению
«Определение острой токсичности
химических веществ, их смесей,
природных и сточных вод методом
биотестирования и применением
ракообразных в качестве тест-
объектов (*Daphnia magna* и
Cypridopsis vidua)»

КАТЕГОРИИ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ

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 ($ЭК_{50}$).

Категории для веществ, опасных для водной среды. Острая токсичность

| Категории острой токсичности | Значения $ЭК_{50}$ для ракообразных, мг/дм ³ | Дополнительная информация |
|------------------------------|---|---|
| Острая 1 | ≤ 1 | Категория 1 может быть подразделена для использования в некоторых регулирующих системах, с тем чтобы включать нижний диапазон при $ЭК_{50} \leq 0,1$ мг/дм ³ |
| Острая 2 | $>1 - \leq 10$ | |
| Острая 3 | $>10 \leq 100$ | Примечание - В некоторых регулирующих системах этот диапазон может быть расширен за пределы $ЭК_{50}$ 100 мг/дм ³ путём введения ещё одной категории |

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| Глава 1 Назначение и область применения | 2 |
| Глава 2 Термины и определения..... | 3 |
| Глава 3 Принцип методики..... | 5 |
| Глава 4 Условия безопасного проведения работ..... | 7 |
| Глава 5 Требования к квалификации лиц, проводящих биотестирование..... | 8 |
| Глава 6 Условия выполнения биотестирования..... | 8 |
| Глава 7 Подготовка к выполнению биотестирования..... | 9 |
| Глава 8 Выполнение биотестирования..... | 15 |
| Глава 9 Критерии качества..... | 18 |
| Глава 10 Обработка и оценка результатов..... | 19 |
| Глава 11 Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности..... | 1 |
| Приложение 1 Оборудование, материалы, реактивы..... | 22 |
| Приложение 2 Методика приготовления восстановленной воды.... | 24 |
| Приложение 3 Установление медианной эффективной концентрации вещества (смеси веществ) и среднего эффективного разбавления воды..... | 26 |
| Приложение 4 Отчетность..... | 29 |
| Приложение 5 Категории острой токсичности..... | 31 |

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. Настоящая Инструкция по применению разработана сотрудниками ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены» Министерства здравоохранения Республики Беларусь (к.м.н. И.А. Застенская, Е.В. Дроздова).

Рецензенты:

ГУ «РЦГЭиОЗ» (А.М. Лебедева),

ГУ «РНПЦГ» (канд. мед. наук С.Ю. Петрова),

РУП «ЦНИИКИВР» (канд. хим. наук Я.В. Цыбульская).

2. Утверждена Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 2008 г.

3. Введена впервые.