

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель министра,  
Главный государственный  
санитарный врач

\_\_\_\_\_ В.И. Качан  
30 декабря 2008 г.  
Регистрационный № 132-1108

**ТЕХНОЛОГИЯ ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ ПОТЕНЦИАЛЬНО  
ОПАСНЫХ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ТЕСТ-МОДЕЛЕЙ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: канд. мед. наук И.А. Застенская, канд. мед. наук А.И. Котеленец,  
канд. мед. наук И.И. Ильюкова, канд. биол. наук А.М. Войтович, канд. биол.  
наук Н.В. Дудчик, канд. биол. наук Л.А. Мельникова, канд. биол. наук  
В.Ю. Афонин, Е.С. Дружинина

Минск 2008

## **НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ**

Настоящая Инструкция определяет технологию оценки токсичности потенциально опасных химических веществ, их смесей, продуктов, содержащих химические вещества, отходов, природных объектов — сточные воды, донные отложения, образцы почв и др. (далее — объекты исследования) с использованием про- и эукариотических организмов в качестве тест-моделей. Настоящая технология позволяет применять новые методы для оценки цито- и генотоксического действия как самостоятельно, так и в сочетании с методами оценки на теплокровных животных, что значительно расширяет объем полученной в ходе экспериментов информации о токсичности химических веществ. Преимуществом применения альтернативных тест-моделей является соответствие современным требованиям: исключение из эксперимента высокоорганизованных животных, сокращение сроков исследования.

Инструкция предназначена для научно-практических учреждений, учреждений образования, центров государственного санитарно-эпидемиологического надзора и других организаций, осуществляющих токсикологические исследования.

Предложенные в Инструкции альтернативные тест-модели могут быть представлены заинтересованным организациям в ГУ «РНПЦ гигиены».

## **ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

Тест-модель — про- и эукариотические организмы, чувствительные к действию токсических веществ, и используемые при оценке токсического действия.

Цитотоксическое действие — свойство химических веществ проявлять повреждающее или летальное действие на про- и эукариотические клетки.

Генотоксическое действие — свойство химических веществ оказывать повреждающее действие на генетические структуры организма.

Мутагенное действие — свойство химических веществ вызывать изменения в структуре ДНК.

Эмбриотоксическое действие — способность химических веществ вызывать гибель эмбрионов тест-объектов.

## **ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ЛИЦ, ПРОВОДЯЩИХ ИССЛЕДОВАНИЯ**

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

## **ПРОБОПОДГОТОВКА**

При исследовании химических веществ или их смесей готовят растворы с концентрацией, отличающейся на порядок, например, 0,01; 0,1; 1,0; 10; 100; и 1000 мкг/мл, исходя из известных сведений о возможной токсичности и растворимости. При исследовании водорастворимых веществ

в качестве растворителя используют дистиллированную воду, водонерастворимых — органические растворители (этиловый, изопропиловый спирт и др. спирты), раствор диметилсульфоксида (ДМСО). Полученные растворы предварительно фильтруют через бактериальные фильтры и непосредственно вносят в среду. При использовании растворов ДМСО не рекомендовано выполнять тестирование на первичных клеточных культурах в качестве тест-модели.

В случае изучения смесей водорастворимых и водонерастворимых веществ и природных объектов допустимо как приготовление вытяжек, так и их непосредственное внесение в среду проведения исследования. В этом случае соотношение выбирается в зависимости от природы объекта и известных сведений о его возможной токсичности.

При тестировании на тест-модели *Lymnaea Stagnalis* водорастворимые вещества вносятся непосредственно в среду обитания, в контроле — отстоянная в течение 24 часов водопроводная вода. Водонерастворимые вещества, образцы почвы, донных отложений и промышленных отходов вносят в песок, имитирующий дно водоема, далее животные используют этот материал в трофических целях. При применении спиртовых вытяжек концентрация спиртов в среде не должна превышать 0,1%.

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ**

*Определение цитотоксического действия с применением тест-штаммов микроорганизмов*

Ограничением при тестировании природных объектов на микроорганизмах является высокая начальная контаминация объекта. При тестировании химических веществ и их смесей ограничением является их бактериостатическое действие.

Необходимое оборудование: микробиологический анализатор с электрохимическим (импедансным) принципом детекции; автоклав (стерилизатор паровой), весы лабораторные аналитические 2-го класса точности, горелка газовая или спиртовка, иономер универсальный (рН-метр), термостаты электрические с диапазоном рабочих температур 2837 °С, допустимой погрешностью 1 °С; посуда мерная лабораторная, чашки бактериологические стеклянные типа Петри или из полимерных материалов, петля бактериологическая, пробочное сверло № 3 (диаметр 9 мм), стандартный образец определения мутности бактерийных взвесей.

*Приготовление рабочих культур*

Для приготовления рабочих культур штаммы отсеивают на питательную среду приведенного состава и инкубируют в термостате при оптимальной температуре в течение 48–72 ч. Готовят суспензию тест-штаммов в физрастворе и доводят содержание клеток до  $10^8$  КОЕ/мл, используя стандарт мутности на 5 ед.

## Тест-штаммы и условия культивирования

Тест-штамм	Питательная среда	Температура культивирования
<i>Azotobacter sp.</i> БИМ-74	Среда 1	30 °С
<i>Arthrobacter ureafaciens</i> БИМ В-6	Среда 2	28 °С

*Определение цитотоксического действия на импедиметрическом анализаторе*

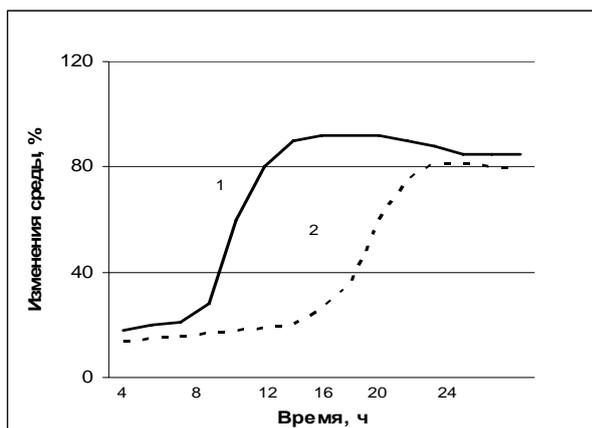
Для оценки токсичности потенциально опасных химических веществ определяют продолжительность лаг-фазы роста тест-штамма микроорганизма в опыте (в присутствии потенциально опасного химического вещества) и контроле (без такового), так как рост тест-микроорганизмов на начальных этапах их развития в стационарной культуре является следствием прямой зависимости численной характеристики популяции и зависит от особенностей ее начального роста.

Оборудование, тест-штаммы микроорганизмов, питательные среды, условия культивирования, подготовка рабочей культуры, пробоподготовка описаны в соответствующих разделах данной Инструкции. Состав и приготовление сред описаны в приложении А и Б.

Исследуемые объекты исследования асептически вносят в приготовленные культуральные среды и тщательно перемешивают по всему объему среды. В контрольные среды вместо изучаемых объектов вносят равный объем растворителя.

Приготовленные среды разливают в измерительные ячейки (пробирки) по 1,5–10 мл, инокулируют 0,1–0,5 мл рабочей суспензии тест-штамма и инкубируют в термоинкубаторе прибора при 28–30 °С. Исследования проводят не менее чем в трех повторностях для каждой концентрации.

Для оценки роста тест-штамма выбирают параметр детекции таким образом, чтобы кривая роста тест-культур на соответствующих питательных средах имела характерный вид: стабильную базовую линию, выраженную фазу быстрого роста культуры и существенные значения изменений электрохимических показателей среды (рис.).



**Рис. Типичные графики роста тест-культур: 1 — в контроле (без внесения токсического вещества) и 2 — в опыте (с внесением)**

Оценка токсичности вещества основывается на сравнении параметров времени детекции  $IDT$  (*Impedance Detection Time*) в контроле ( $IDT_1$ ) и опыте ( $IDT_2$ ), по формуле:

$$I = \frac{IDT_1}{IDT_2},$$

где  $I$  — степень ингибирования;

$IDT_1$  — значение времени детекции в контроле;

$IDT_2$  — тот же параметр в опыте.

Для расчета показателя  $I$  берутся средние арифметические значения  $IDT_1$  и  $IDT_2$  (не менее чем из трех повторностей).

Если  $I < 1$  — имеет место ингибирующий эффект на тест-штамм микроорганизма, что свидетельствует о цитотоксическом действии изучаемого объекта исследования.

#### *Оценка цитотоксического действия методом диффузии в агар*

Метод представляет собой качественный тест, позволяющий провести скрининговые исследования по оценке токсичности химических веществ. При тестировании раствор химического вещества вносят в лунки агаризованной питательной среды, содержащей рабочую концентрацию тест-штамма. При диффузии раствора в агар вещество может ингибировать рост тест-штаммов, давая зону просветления (ингибирования роста).

Оборудование, тест-штаммы микроорганизмов, питательные среды, условия культивирования, подготовка рабочей культуры, пробоподготовка описаны в соответствующих разделах Инструкции.

Приготовленные среды охлаждают до  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  и вносят суспензию рабочей культуры так, чтобы конечная концентрация составляла  $1 \times 10^6$  —  $1 \times 10^7$  клеток/мл, осторожно перемешивая среду вращательными движениями. Затем ее разливают в чашки Петри по 10 мл так, чтобы после застывания ее толщина составляла 2 мм, и устанавливают на строго горизонтальном столе. После застывания сред стерильным пробочным

сверлом вырезают лунки, вырезанные блоки асептически удаляют скальпелем. Подготовленные чашки Петри со средой хранят в холодильнике в течение 2 дней.

В лунки подготовленных для исследования чашек Петри вносят по 50–100 мкл раствора исследуемого вещества в последовательно возрастающих концентрациях, выдерживают 1 ч при комнатной температуре, а затем инкубируют при 28–30 °С в течение 72 ч.

Наличие зон ингибирования роста тест-штамма свидетельствует о токсичности вещества в изученном диапазоне концентраций (оценивают визуально).

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НА ПЕРВИЧНЫХ И ПЕРЕВИВАЕМЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК**

Ограничением при тестировании на культуре клеток является способность образцов нарушать буферную емкость среды.

Метод основан: на учете количества клеток на ростовой поверхности в течение 14 сут после посева на клеточных культурах; изучении морфологического состава клеток и способности жизнеспособных клеток переводить соль тетразолина (MTS) в формазан — МТТ-тест.

Приборы и оборудование: CO<sub>2</sub>-инкубатор, ламинарный шкаф, центрифуга типа ОПН-3, микроскоп инвертированный (x40), микроскоп проходящего света (x1000), 96-луночный ридер типа Multiskan, дозаторы 0,1; 1,0 и 5,0 мл, многоканальный дозатор, посуда одноразовая (6 и 96-луночные планшеты), бактериальные фильтры, предметные стекла.

Среды и реактивы: среды MEM, RPMI-1640; эмбриональная телячья сыворотка; растворы Версена, Хэнкса; трипсин EDTA; набор CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS), Promega; ДМСО (диметилсульфоксид); краситель Гимза; этиловый спирт.

*Оценка цитотоксического действия по подавлению клеточного роста и морфологическим изменениям*

Пробоподготовку объектов исследования проводят по соответствующему разделу настоящей Инструкции.

Для учета подавления роста клеток используют 6-луночные планшеты, плотность посева 5000 клеток на 1 см<sup>2</sup>, в этом тесте лучше использовать первичные эмбриональные фибробласты мыши. На следующий день после посева вносят исследуемое вещество, в каждой серии должно быть 2 лунки, в которых учитывают клетки в 3-х фиксированных полях зрения, эксперимент продолжается до 14 или до 21 сут в случае медленного размножения клеток. Для уточнения картины подавления клеточного роста в ряде случаев целесообразно отдельно учитывать митотические фибробласты I и II типов и постмитотические фибробласты.

Статистическую обработку проводят методом 4-клеточных таблиц по критерию  $\chi^2$ , исходя из соотношения числа клеток после посева и в точке фиксации или путем регрессионного анализа при количестве точек фиксации не менее пяти.

Морфологический состав клеток оценивают на первичной клеточной культуре. Посев производят непосредственно на предметные стекла в специальных планшетах или других сосудах. В первом случае фиксация этанолом и окраска по Гимза производятся непосредственно на стекле, во втором – препараты готовят из клеточной суспензии путем ее нанесения на предметные стекла, далее следует фиксация и окраска. Учитывают следующие показатели: число клеток с признаками терминальной дифференцировки (цитоплазма окрашена в красный цвет, наличие нескольких ядер), число клеток с признаками повреждения хроматина и мембраноизолированные фрагменты хроматина.

#### *Оценка цитотоксического действия в МТТ тесте*

Для МТТ-еста используют 96-луночные планшеты, многоканальную пипетку, набор MTS.

Метод удобен для изучения дозовой зависимости, так как позволяет исследовать одновременно несколько серий, количество лунок в серии – 8. В качестве положительного контроля используют известные цитостатики, такие как митомицин С или адриацин. Посевная доза — 5 000 кл/см<sup>2</sup> для постоянных клеточных линий, например, А549 и 10000 кл/см<sup>2</sup> для фибробластов. На второй день после посева вносят изучаемые вещества, через 24 ч добавляют реактив (MTS), инкубируют 20 мин в инкубаторе; измерение поглощения формазана проводят на 96-луночном ридере ( $\lambda=493$  нм).

Статистическую обработку проводят с использованием критерия Стьюдента.

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ**

### *Определение мутагенного действия на штаммах *Escherichia coli**

Метод основан на учете роста суспензии бактерий дикого типа и штаммов, имеющих мутации в генах, контролирующих различные этапы репарационных процессов в бактериальной клетке (мутации *pol A* и *rec A*). Детекцию различий в росте бактерий дикого типа и мутантных по генам репарации проводят на микробиологическом анализаторе с электрохимическим принципом детекции.

Оборудование и пробоподготовка описаны в соответствующих разделах Инструкции, а состав и приготовление питательных сред описаны в приложении В.

#### *Приготовление рабочих культур*

Для приготовления рабочих культур штаммы микроорганизмов с косяков мясопептонного агара петлей высевают в среду М 9. Перед опытом готовят инокулят, для чего ночную культуру разводят примерно в 100 раз средой М 9, доводя титр бактерий до  $5-7 \times 10^6$  клеток/мл.

## Тест-штаммы и условия культивирования

Тест-штамм	Питательная среда	Температура культивирования
<i>Escherichia coli</i> В/г WP2 — дикий тип по репарации ДНК	Среда М 9 с триптофаном	37 °С
<i>Escherichia coli</i> WP67 (polA) — мутантный тип по репарации ДНК	Среда М 9 с триптофаном	37 °С
<i>Escherichia coli</i> CM 571 (recA) — мутантный тип по репарации ДНК	Среда М 9 с триптофаном	37 °С

*Проведение испытания*

Изучаемые объекты исследования асептически вносят в культуральные среды, тщательно перемешивают по всему объему среды и разливают в измерительные ячейки (пробирки) по 1,5–10 мл, параллельно инокулируют 0,1–0,5 мл рабочей суспензии штамма 1, 2 или 3. Исследования проводят не менее чем в трех повторностях для каждой концентрации. Инкубируют в термоинкубаторе при 37 °С.

В контрольные среды вместо раствора вещества вносят равный объем растворителя. Испытание сопровождают следующими параметрами: контроль стерильности среды, контроль роста тест-штаммов без внесенного химического вещества.

*Оценка результатов*

Требования к параметрам детекции описаны в соответствующем разделе настоящей Инструкции.

Наличие мутагенного действия определенной концентрации химического вещества отмечается при отсутствии роста мутантных бактерий (штамм 2 или 3), но при наличии роста бактерий дикого типа по репарации ДНК (штамм 1).

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ НА БОЛЬШОМ ПРУДОВИКЕ *Lymnaea stagnalis***

Ограничением при тестировании на моллюсках является способность образцов изменять рН среды за пределы 6,8–7,2 или создавать масляную пленку на поверхности воды, препятствующую дыханию животных.

Настоящий метод определения мутагенной активности в микроядерном тесте на большом прудовике *Lymnaea stagnalis* основан на учете микроядер (цитогенетических повреждений) в клетках мантийной жидкости.

Содержание и разведение животных производят согласно соответствующему протоколу (приложение Г).

Приборы и оборудование: центрифуга типа ОПН-3, микроскоп проходящего света (x1000), холодильник, дозаторы на 0,2 и 5,0 мл, пробирки центрифужные, предметные стекла.

Среды и реактивы: краситель Гимза, ледяная уксусная кислота, этиловый спирт.

Вещества вносят с учетом известных данных об их свойствах. Для исключения летального исхода необходимо предварительное тестирование на отдельных животных, концентрация снижается последовательно на один порядок: 50; 5 и 0,5 г на 1 л и т. д. Объем материала для имитации дна водоема — 50 г на 1 л (в контрольной серии такой же объем кварцевого песка), при внесении водных вытяжек также 50 г на 1 л. Число животных в сериях: две группы по 4–5 особей, в двух емкостях; животных содержат в таких условиях 5 сут, далее готовят цитогенетические препараты.

#### *Приготовление препаратов*

Получают мантийную жидкость путем механического раздражения ноги моллюска кисточкой, клеточную суспензию фиксируют смесью ледяной уксусной кислоты и этанола (1:3), далее помещают в холодильник на 1 сут при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Для получения мазков клеточную суспензию осаждают путем центрифугирования при 1000 об/мин в течение 5 мин и наносят дозатором (0,05 мл) на предметное стекло, окраску проводят по Гимза, учитывают клетки с микроядрами, признаками повреждения ядра и апоптотические тела (мембраноизолированные фрагменты хроматина). Цитогенетические исследования проводят на микроскопе проходящего света под иммерсией (x1000).

Статистическую обработку осуществляют методом 4-клеточных таблиц по критерию  $\chi^2$ .

Мутагенное действие определяется по наличию статистических различий между контрольной и опытной группой животных по числу клеток с микроядрами. В случае различий по числу клеток с признаками апоптоза возможно присутствие мутагенных веществ в образце. Присутствие апоптотических тел свидетельствует о ранней клеточной гибели и возможной элиминации клеток с цитогенетическими повреждениями. В таких случаях необходимо повторить исследования с более ранней фиксацией препаратов через 3-е сут.

### **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭМБРИОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НА БОЛЬШОМ ПРУДОВИКЕ *Lymnaea stagnalis***

Ограничением при тестировании на моллюсках является способность образцов изменять рН среды за пределы 6,8–7,2 или создавать масляную пленку на поверхности воды, препятствующую дыханию животных.

Настоящий метод определения эмбриотоксического действия потенциально опасных химических веществ (как в чистом виде, так и в составе промышленных отходов, почве, воде) в тесте на большом прудовике *Lymnaea stagnalis* основан на учете числа жизнеспособных эмбрионов в кладках, количества капсул в кладках, веса кладок.

Приборы и оборудование: бинокулярная лупа (x100), дозаторы на 0,2 и 5,0 мл, весы с точностью до 0,01 мг.

#### *Этапы проведения теста*

Пробоподготовка, внесение веществ в водную среду, сроки содержания животных описаны в соответствующих разделах настоящей Инструкции.

*Учет признаков эмбриотоксического действия*

Учитывают кладки в течение содержания животных в экспериментальных условиях и затем еще 2 мес. при содержании в чистой воде. Учитывают вес кладок, количество капсул в кладках, количество жизнеспособных эмбрионов в кладках. Учитывают показатели первых и последних кладок отдельно, а также средний вес кладок за 65 дней наблюдения, основной относительный показатель — соотношение веса кладки и числа капсул. У животных учитывают вес через 1 мес. и 65 сут после выхода из кладок. При изучении отдаленных последствий из каждой кладки отбирают особи, масса которых превышает средний вес животных данной кладки. Далее продолжают исследования на животных второго поколения, подвергнутых токсическому воздействию, по вышеуказанной схеме.

Статистическую обработку проводят как по критерию Стьюдента, так и при помощи дисперсионного анализа, поскольку популяционные различия могут заключаться именно в гетерогенности субпопуляций.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

### Протокол поддержания штамма *Azotobacter sp.* БИМ-74

Культивирование. Среда 1 (на 1000 мл): глюкоза – 10,0 г, маннит – 10,0 г; калий фосфорнокислый двухзамещенный – 0,2 г; магний сернокислый семиводный – 0,2 г; натрий хлористый – 0,2 г; калий сернокислый – 0,1 г; кальций углекислый – 0,5 г; рН 7,2. Стерилизация автоклавированием 121<sup>0</sup>С в течение 30 мин. Культивирование при среде указанного состава течение 48 час при 30 <sup>0</sup>С. Субкультивирование на среде указанного состава с 2% агаром, периодичность пересевов 1 месяц. Хранение на среде указанного состава с 2% агаром под слоем стерильного вазелинового масла при 4 <sup>0</sup>С, периодичность пересевов 12 месяцев.

Культурально-морфологические особенности. Штамм грамотрицателен. В факторах роста не нуждается. На минеральной безазотистой среде образует мелкие, круглые с ровным краем, прозрачные, бесцветные, блестящие, слизистые колонии. Пигментация отсутствует. Клетки крупные, плеоморфные, различной длины: от укороченных палочек до клеток кокковидной формы, диаметр около 2 мкм. В поле зрения лежат одиночно, реже в коротких цепочках по 3-6 клеток. Неподвижны, эндоспоры отсутствуют.

Физиолого-биохимические свойства: каталазоположителен, не гидролизует крахмал, казеин, желатин; утилизирует глюкозу, маннит, рамнозу, малонат; использует аммонийные и нитратные формы азота; способен фиксировать атмосферный азот. Отношение к кислороду: аэроб.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Протокол поддержания штамма *Arthrobacter ureafaciens* БИМ В-6

Культивирование. Среда Самойленко (на 1000 мл воды): пептон – 10,0 г; дрожжевой экстракт – 5,0 г; глюкоза – 5,0 г; хлористый натрий – 5,0 г; гидрофосфат натрия – 4 г; дигидрофосфат калия – 1 г; рН 7,2 - 7,4. Стерилизация автоклавированием 121 °С в течение 30 мин. Культивирование на среде указанного состава в течение 48 час при 30 °С. Субкультивирование на среде указанного состава с 2% агаром, периодичность пересевов 1 месяц. Хранение на среде указанного состава с 2% агаром под слоем стерильного вазелинового масла при 4 °С, периодичность пересевов 12 месяцев.

Культурально-морфологические особенности. Штамм грамположителен, стареющие клетки грамвариабельны. На среде для коринебактерий образует круглые, кремовые (при инкубировании на свету образуется желтый пигмент) гладкие, блестящие, слегка выпуклые, полупрозрачные колонии, край колонии ровный. Клетки полиморфные, неподвижные, имеют выраженный цикл развития: различной длины: кокковидные клетки – полиморфные палочки - кокковидные клетки.

Физиолого-биохимические свойства: каталазоположителен; разлагает (гидролизует) казеин, аргинин, слабо – тирозин, слабо разжижает желатин; не гидролизует крахмал и целлюлозу; не образует ацетоин, индол, не восстанавливает нитраты до нитритов; ассимилирует натриевые соли лимонной, молочной, щавелевой, глутаровой кислоты; усваивает уксусную, яблочную, масляную, пировиноградную, гликолевую кислоту; в качестве источника азота использует аммонийные соли, нитраты, пептон. Отношение к кислороду: аэроб.

## ПРИЛОЖЕНИЕ В

Протокол поддержания штаммов *Escherichia coli* В/г WP2, *Escherichia coli* WP67 (polA), *Escherichia coli* CM 571 (recA)

Среда М 9: (на 1000 мл дистиллированной воды): хлористый аммоний – 1,0 г, калий фосфорнокислый однозамещенный – 3,0 г, натрий фосфорнокислый двузамещенный – 6,0 г; натрий хлористый – 0,5 г, рН 7,2 - 7,4. Стерилизация 121 °С в течение 30 мин. После стерилизации добавляют 10 мл 20 % раствора глюкозы, 5 мл раствора триптофана с концентрацией 4 мг/мл, 1 мл раствора сернокислого магния 1 % и 10 мл 0,01 М раствора хлористого кальция.

Раствор глюкозы 20%. Глюкоза – 200,0 г, вода дистиллированная – 800 мл.

Раствор триптофана 4 мг/мл. L-триптофан – 40,0 мг, вода дистиллированная – до 100 мл.

Раствор хлористого кальция 0,01 М. Кальций хлористый – 110,0 г, вода дистиллированная – до 100 мл.

Раствор сернокислого магния 1%. Магний сернокислый семиводный – 1 г, вода дистиллированная – 99 мл.

Штаммы хранят в слое 0,6% мясопептонного агара под стерильным вазелиновым маслом масла при 4 °С, периодичность пересевов 12 месяцев.

Культурально-морфологические особенности. Штаммы грам-отрицательные, аспорогенные. Морфология и биохимические особенности типична для энтеробактерий. Хорошо растут на основных питательных средах в аэробных условиях при слабощелочной рН и температуре 35-37 °С. Отношение к кислороду: факультативные анаэробы.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Г

### Протокол поддержания разводов моллюска *Lymnaea stagnalis*

Животных следует содержать в сосудах, исходя из объема 1 л воды на 4-5 животных в помещении с искусственным освещением при режиме, имитирующей 14-16 часовой световой день. Смену воды проводят раз в неделю. Водопроводную воду отстаивают в течение не менее 24 часов. Нельзя использовать воду с запахом хлора 2 балла и более. Оптимальная температура воды 18-25 °С, рН-6,8-7,2. Кормление 2-3 раза в неделю листьями одуванчиков или мелко нарезанными листьями капусты (лучше пекинской).

#### Разведение животных.

1. При перекрестном оплодотворении отсаживают взрослых животных, меняют воду и оставляют кладки прикрепленными к стенкам сосуда. Животных целесообразно содержать в сосудах емкостью не более 1 л. После полного выхода животных из капсул их 10-14 суток содержат в тех же сосудах, а затем помещают в сосуды большего объема (аквариумы), т. к. объем сосудов оказывает большое воздействие на рост.

2. При получении животных путем самооплодотворения следует учитывать, что сперма, полученная при копуляции, сохраняется очень долго и служит для оплодотворения на протяжении всего сезона. Поэтому следует отсаживать животных в отдельные сосуды сразу после выхода из капсул и содержать в таких условиях до созревания. Эта процедура требует четкого соблюдения условий содержания. Животные плохо размножаются путем самооплодотворения, поэтому необходимо дополнительное стимулирование путем создания неблагоприятных факторов окружающей среды, например, резкое изменение температуры воды в пределах не более 5 °С, изменение значения рН в пределах указанного выше оптимума.

## Оглавление

1 Назначение и область применения.....	2
2 Термины и определения .....	2
3 Требования к квалификации лиц, проводящих исследования.....	3
4 Пробоподготовка .....	3
5 Определение цитотоксического действия .....	4
5.1 Определение токсичности с применением тест-штаммов микроорганизмов.....	4
5.1.1 Определение токсичности на импедиметрическом анализаторе.....	5
5.1.2 Оценка токсического действия на тест-штаммы микроорганизмов методом диффузии в агар.....	7
5.2. Определения цитотоксического действия на первичных и перевиваемых культурах клеток.....	8
5.2.1 Оценка цитотоксического действия по подавлению клеточного роста и морфологическим изменениям.....	9
5.2.2 Оценка цитотоксического действия в МТТ тесте.....	10
6 Определение генотоксического действия .....	10
6.1 Определение генотоксического действия на тест-штаммах <i>Escherichia coli</i> .....	10
6.2 Определение мутагенного действия на большом прудовике <i>Lymnaea stagnalis</i> .....	12
6.3 Определение эмбриотоксического действия на большом прудовике <i>Lymnaea stagnalis</i> .....	14
ПРИЛОЖЕНИЕ А Протокол поддержания штамма <i>Azotobacter sp.</i> БИМ-74.....	16
ПРИЛОЖЕНИЕ Б Протокол поддержания штамма <i>Arthrobacter ureafaciens</i> БИМ В-6.....	17
ПРИЛОЖЕНИЕ В Протокол поддержания штаммов <i>Escherichia coli</i> В/г WP2, <i>Escherichia coli</i> WP67 (polA), <i>Escherichia coli</i> CM 571 (recA).....	18
ПРИЛОЖЕНИЕ Г Протокол поддержания разводов моллюска <i>Lymnaea Stagnalis</i> .....	19

## ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. Настоящая Инструкция разработана сотрудниками ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены» Министерства здравоохранения Республики Беларусь (канд. мед. наук Застенская И.А., канд. мед. наук Котеленец А.И., канд. мед. наук Ильюкова И.И., канд. биол. наук. Войтович А.М., канд. биол. наук Дудчик Н.В., канд. биол. наук Мельникова Л.А., Дружинина Е.С.) и сотрудником ГУ «Научно-производственный центр «Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси» (канд. биол. наук Афонин В.Ю.).

Рецензенты:

ГУ «РНПЦГ» (канд. мед. наук Ю.А.Соболь),

ГУ РПЦГ и ОЭ (В.В. Гулин)

ГНУ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (док. биол. наук Дромашко С.Е.)

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

3. Введена впервые.