

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

**Государственное учреждение
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ»**

**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

Минск - 2008

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.

ГЛАВА 1

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 *S. 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±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 (lgС)	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

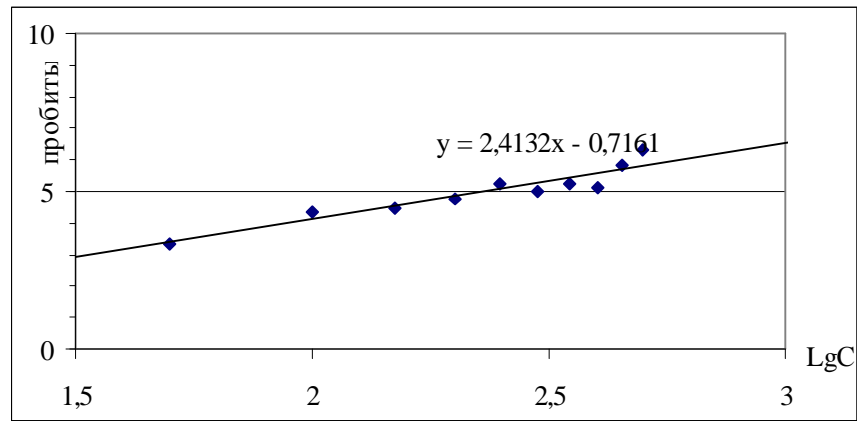


Рисунок 1. Установление ЭК₅₀ графическим способом

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.