Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

2.1.7. ПОЧВА, ОЧИСТКА НАСЕЛЕННЫХ МЕСТ, ОТХОДЫ ПРОИЗВОДСТВА И ПОТРЕБЛЕНИЯ, САНИТАРНАЯ ОХРАНА ПОЧВЫ

Экспресс-оценка токсичности отходов производства и потребления на культуре клеток млекопитающих

Методические рекомендации
МР 2.1.7.2279—07

gost.e-ecolog.ru

ББК

Экспресс-оценка токсичности отходов производства и потребления на культуре клеток млекопитающих:.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008.—12 с.

1. Разработаны ГУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А. Н. Сысина РАМН (Н. В. Русаков, И. А. Крятов, Н. В. Пиртахия, И. С. Евсеева, С. Б. Чудакова); ЗАО Фирма «БМК-ИНВЕСТ» (А. П. Еськов, Р. И. Каюмов).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию при Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 29.03.2007 № 1).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 24 сентября 2007 г.

4. Введены в действие с 10 декабря 2007 г.

5. Введены впервые.

ББК 51.21

Редакторы Н. Е. Акопова, Н. В. Кожока
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 15.05.08

Формат 60x88/16 Печ. л. 0,75

Тираж 300 экз. Заказ 25

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18/20

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом информационно-издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а
Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

© Роспотребнадзор, 2008
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008

Содержание

Введение 4
1. Область применения 5
2. Термины и определения 5
3. Сущность методики 6
4. Средства измерения, оборудование и реактивы 6
5. Отбор образцов и приготовление экстрактов 7
6. Проведение испытаний 7
7. Обработка экспериментальных данных 8
8. Нахождение параметров токсичности 9
9. Определение класса опасности и уровня безвредности отходов 10
Список литературы 10
Приложение. Пример оценки токсичности золошлака термохимической деструкции фармпрепарата на сперме быка 12

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
24 сентября 2007 г.
Дата введения: 10 декабря 2007 г.

2.1.7. ПОЧВА, ОЧИСТКА НАСЕЛЕННЫХ МЕСТ, ОТХОДЫ ПРОИЗВОДСТВА И ПОТРЕБЛЕНИЯ, САНИТАРНАЯ ОХРАНА ПОЧВЫ

Экспресс-оценка токсичности отходов производства и потребления на культуре клеток млекопитающих

Методические рекомендации
МР 2.1.7.2279—07

Введение

При использовании экспериментального метода определения класса опасности отходов производства и потребления в соответствии с СП 2.1.7.1386—03 токсичность отходов по влиянию на организм человека устанавливается в санитарно-токсикологических экспериментах (остром, подостром, хроническом) на теплокровных животных (млекопитающих). Высокая трудоемкость и себестоимость токсикологических исследований по оценке влияния отходов на теплокровный организм делает актуальным внедрение более экономичных и оперативных способов оценки их токсичности. Для этих целей могут быть применены биологические экспресс-методы, использующие, в частности, культуры клеток млекопитающих. Основанием для этого является достаточно высокий уровень корреляционной зависимости между результатами оценки острой токсичности химических соединений на целостном организме и культурах клеток (коэффициент корреляции $\geq 0,8$).

Рекомендуемый метод предусматривает экспресс-оценку токсичности отходов и определение класса их опасности по результатам исследований in vitro с использованием в качестве тест-объекта кратковременной суспензионной культуры сперматозоидов быка – КСБ. Преимуществом КСБ по сравнению с другими клеточными культурами является

то, что она не требует для своего сохранения и использования стерильных условий и специальных технологий поддержания, что резко снижает трудоемкость и стоимость испытаний. Метод позволяет оценить суммарный эффект от воздействия на культуру всей совокупности токсикантов, присутствующих в отходе, включая неидентифицированные компоненты, по биологическому действию его экстракта на тест-объект.

В соответствии с методикой установление класса опасности и уровня безвредности отхода по влиянию на сперму быка осуществляется по параметрам токсичности: средне-эффективному и пороговому разведениям экстракта.

Критерии опасности отходов разработаны на основе корреляционно-регрессионного анализа взаимосвязи между параметрами острой токсичности различных химических веществ, установленных на животных и культуре сперматозоидов, и являются адекватными критериями опасности химических веществ по DL_{50}.

Методические рекомендации предназначены для учреждений государственного санитарно-эпидемиологического надзора, юридических и физических лиц, независимо от их подчинения и формы собственности, осуществляющих обращение с отходами производства и потребления.

1. Область применения

Методика предназначена для оценки токсичности отходов производства и потребления по влиянию на кратковременную суспензионную культуру подвижных клеток млекопитающих – сперму быка. Методика должна применяться в рамках алгоритма сокращённой схемы экспериментальной оценки опасности отходов (СП 2.1.7.1386—03 «Определение класса опасности токсичных отходов производства и потребления») с обязательным подтверждением классическим методом.

При проведении исследований по расширенной схеме подтверждение (уточнение) класса опасности отхода, установленного на КСБ, в санитарно-токсикологических экспериментах на теплокровных животных является обязательным (п. 5.6, п/п 5.6.5 СП 2.1.7.1386—03).

2. Термины и определения

Термин	Определение
1	2
Экстракт	Модельная среда, характеризующая содержание химических компонентов в отходе
R	Кратность разведения экстракта
Тест-объект	Суспензионная культура сперматозоидов быка (КСБ)

Продолжение

1	2
Тест-функция	Средневзвешенное время подвижности КСБ
Показатель тест-функции – индекс токсичности – I_t	Отношение времени подвижности КСБ в исследуемой среде ко времени подвижности в контроле, выраженное в %
Биологически эффективные разведения	Все значения R, при которых индекс токсичности составляет 80 и менее процентов
Средне-эффективное разведение – IR_{50}	Разведение экстракта, при котором I_t = 50 %
Минимально действующее (пороговое) разведение – IR_{80}	Разведение экстракта, при котором индекс токсичности = 80 %

3. Сущность методики

Сущность методики состоит в исследовании токсичности экстракта из испытуемых отходов с применением в качестве тест-объекта спермы быка. Используется сперма быка, замороженная в парах жидкого азота. Гранулы замороженной бычьей спермы получают на станциях искусственного осеменения и хранят в сосудах Дьюара, наполненных жидким азотом. В основе метода лежит исследование изменения зависимости двигательной активности сперматозоидов от времени под воздействием химических соединений, содержащихся в экстракте из испытуемого отхода.

В качестве измеряемого параметра использована интегральная подвижность сперматозоидов в суспензии m, которая пропорциональна концентрации подвижных сперматозоидов c_m и среднему модулю скорости движения клеток v:

$$m = c_m v$$

Интегральная подвижность сперматозоидов в суспензии $m = m(t)$ для контрольного и опытного образцов измеряется за период, пока ее величина не станет близкой к нулю.

Подвижность сперматозоидов в суспензии измеряется анализатором изображений, принцип работы которого основан на автоматическом компьютерном анализе микроскопических видеоизображений суспензии сперматозоидов.

4. Средства измерения, оборудование и реактивы

Анализатор изображений АТ-05 (Анализатор токсичности АТ-05) ТУ 1525-001-2913668—03

Пробирки с притертыми пробками объемом 3—5 мл – 10 шт.

Дозаторы пипеточные на объемы 0,5, 0,2 и 0,1 мл

Мерные колбы с притертыми пробками объемом
50 мл – 2 шт.
Весы аналитические с погрешностью
взвешивания не более 1 мг
Пинцет анатомический длиной 250 мм
Сосуд Дьюара типа СДС, объемом не менее 25 л
и диаметром горла не менее 50 мм – 2 шт.
Глюкоза, ч
Цитрат натрия трехзамещенный, ч
Сперма быка, замороженная в жидком азоте ГОСТ 26030—83

5. Отбор образцов и приготовление экстрактов

Отбор образцов отходов и приготовление экстрактов проводится в соответствии с СП 2.1.7.1386—03 «Определение класса опасности токсичных отходов производства и потребления».

Модельной средой (экстрагентом) для экстракции химических веществ из отходов является дистиллированная вода с уровнем pH = 6,1—6,3.

Оптимальное соотношение фаз «отход/экстрагент» – 1 : 10. Исходя из этого, навеску отхода 10 г помещают в мерную колбу объемом 100 мл и дистиллированной водой доводят до метки.

После интенсивного размешивания колбы с экстрактом отхода отстаиваются при комнатной температуре в течение 1 суток. Затем подвергаются 2-часовому встряхиванию на специальном аппарате («Шутель») и фильтрованию через фильтр «синяя лента».

Рабочие растворы готовятся путем последовательного разведения исходного (нативного) экстракта.

Для удобства при последующем статистическом анализе результатов значение R нативного экстракта условно принимается за 1, его разведение в 10 раз соответствует $R = 10$ и т. д.

6. Проведение испытаний

Биотестирование образцов отходов осуществляется в рекогносцировочном и основном опытах.

В рекогносцировочном опыте, целью которого является выяснение диапазона цитотоксического действия образца, испытываются нативный экстракт ($R = 1$) и его разведения, кратные 10 (R = 10, 100, 1 000 и т. д.).

Конечная цель основного опыта – установление параметров цитотоксичности. В основном опыте тестируются разведения, кратные 2—3 в интервале биологически эффективных разведений, установленном на первом этапе.

Все растворы в течение эксперимента должны находиться при постоянной температуре (40 ± 1,5) °С, для чего используется термостат.

Для определения индекса токсичности опытного раствора необходимо сравнить его с контрольной (модельной) средой.

В качестве контрольного раствора выбрана глюкозо-цитратная среда (глюкоза – 4 г, цитрат натрия – 1 г, дистиллированная вода – 100 мл). Контрольная среда одновременно является разбавителем для оттаивания замороженной спермы.

Опытным раствором является экстракт из отхода или его разведения, доведённые до изотонии сухими реактивами глюкозы и цитрата натрия (глюкоза – 4 г, цитрат натрия – 1 г, испытуемый раствор – 100 мл).

Контрольный и опытный растворы по 0,4 мл помещают в пробирки с притертыми пробками и ставят в термостат при температуре (40 ± 1,5) °С.

Примечание. Если при приготовлении опытного раствора наблюдается выпадение осадка, то в качестве контрольной среды используют 0,9 %-й раствор хлористого натрия. Доведение опытного раствора до изотонии осуществляют сухим хлористым натрием (0,09 г хлористого натрия, испытуемый раствор – 100 мл). Для оттаивания спермы используют глюкозо-цитратную среду.

Оттаивают замороженную сперму. Для этого дозируют в пробирки разбавитель согласно паспорту на сперму быка и ставят их в термостат при температуре (40 ± 1,5) °С. Охлажденным до температуры жидкого азота анатомическим пинцетом извлекают из сосуда Дьюара гранулу спермы и опускают в нагретый раствор. Сразу после размораживания содержимое пробирки тщательно перемешивают.

Приготавливают рабочие образцы. В пробирки с контрольным и опытным растворами помещают по 0,1 мл маточного раствора спермы.

Подготавливают пробы к исследованию. Рабочие образцы переносят в капилляры, которые устанавливают в каретку и помещают в анализатор.

Проводят накопление экспериментальных данных. Нажатием кнопки «СТАРТ» включают процесс накопления данных. При достижении нулевых значений показателя подвижности во всех кюветах нажатием кнопки «СТОП» останавливают процесс накопления данных.

7. Обработка экспериментальных данных

Для каждого образца вычисляют средневзвешенное значение времени подвижности $t_{ср}$:

$$t_{cp} = \ln m_i \frac{\sum_i (m_i \cdot i)}{\sum_i m_i}, \text{ где}$$

m_i – i-е значение показателя подвижности;

i – текущий номер оценки показателя подвижности.

Для контрольной и опытной выборок образцов вычисляют среднее арифметическое значение и среднеквадратичное отклонение, по которым в свою очередь вычисляют для каждой выборки коэффициент вариации C:

$$C = \frac{\delta}{\bar{x}} \cdot 100\,\%, \text{ где}$$

δ – среднеквадратичное отклонение;

$\bar{x}$ – среднее арифметическое значение.

В случае получения значения коэффициента вариации более 15 % хотя бы для одной из выборок, эксперимент повторяют. Если значения коэффициентов вариации для каждой из выборок меньше или равно 15 %, то результаты считают статистически значимыми. Затем вычисляют величину индекса токсичности I_t:

$$I_t = \frac{\overline{t_{cp}}^{o}}{\overline{t_{cp}}^{k}} \cdot 100\,\%, \text{ где}$$

$\overline{t_{cp}}^{o}$ и $\overline{t_{cp}}^{k}$ – средние арифметические значения средневзвешенного времени подвижности, соответственно, для опытной и контрольной выборок образцов.

Вычисление индексов токсичности выполняется автоматически анализатором изображений АТ-05.

За критерий вредного действия принимается величина $I_t \leq 80\,\%$ (при норме – 100 %). Это значение индекса является порогом токсического действия отхода на клеточную культуру.

8. Нахождение параметров токсичности

Для определения параметров цитотоксичности проводится регрессионный анализ экспериментальных данных, в результате которого получают уравнение, описывающее взаимосвязь разведения экстракта с величиной индекса токсичности*.

* Регрессионный анализ проводится при условии, что биологически эффективными являются не менее 3-х значений R.

$$\text{Lg}R = m\,I_t \pm b, \text{ где}$$

I_t – индекс токсичности;

R – разведение;

m и b – коэффициенты уравнения регрессии.

Коэффициенты уравнения регрессии рассчитываются для каждого образца индивидуально по методу «Наименьших квадратов», который наиболее доступно реализуется с помощью модуля «регрессия» в пакете анализа «стандартные формулы» программы W«Microsoft Excel».

Определение значений пороговых (IR_{80}) и среднеэффективных (IR_{50}) разведений осуществляется путем решения полученного уравнения относительно R при заданных величинах индекса токсичности, а именно, при определении порога I_t = 80 %, а при определении среднеэффективного разведения – I_t = 50 %.

9. Определение класса опасности и уровня безвредности отходов

Уровень безвредности отхода определяется, исходя из величины порога цитотоксического действия. Все разведения водного экстракта отхода, превышающие IR_{80}, не будут оказывать негативное воздействие отхода на культуру сперматозоидов быка. Следовательно, можно прогнозировать безопасность испытуемого отхода в токсикологическом отношении.

Класс токсикологической опасности отхода определяется по величине IR_{50} в соответствии с критериями, представленными в табл. 1.

Таблица 1

Классификация опасности отходов производства и потребления по влиянию на культуру сперматозоидов быка

Классы опасности	1	2	3	4
Категории опасности	чрезвычайно опасные	высоко-опасные	умеренно опасные	мало-опасные
IR_{50}	> 2 000	2 000—100	100—5	< 5

Примечание. Если токсический эффект зафиксирован только при действии нативного экстракта, а его разведения являются индифферентными по отношению к сперме быка, то отходу автоматически присваивается 4 класс опасности.

Список литературы

1. Определение класса опасности токсичных отходов производства и потребления: СП 2.1.7.1386—03.

2. Clemedson C., McFarlane-Abdulla £., Anderson M. et al. ME1C evaluation of acute systemic toxicity //ATLA, 1996. V. 24. Suppl 1. P. 251—311.

3. Clemedson C., Barile F.A., Ekwatt B. et al. MEIC evaluation of acute systemic toxicity //ATLA, 1998, V. 26. Suppl. 1. P. 93—183.

4. Каюмов Р. И., Еськов А. П., Ротенберг Ю. С. и др. Токсикологическая оценка индивидуальных химических соединений и смесей сложного состава с использованием подвижного тест-объекта //Бюл. экспер. биол. мед.—1988.—№ 1.—С. 48—50.

5. Биотестирование продукции из полимерных и других материалов: МУ 1.1.037—95.

6. Методические рекомендации по применению методов биотестирования для оценки качества воды в системах хозяйственно-питьевого водоснабжения: МР № ЦОС ПВ Р 005—95. М., 1995.

7. Пиртахия Н. В., Еськов А. П., Каюмов Р. И. Сравнительная оценка токсичности тяжелых металлов в эксперименте in vitro //Тез. докл. 2-го Международного конгресса по управлению отходами ВэйстТэк-2001. 5—8 июня 2001 г., Москва.

8. Обоснование гигиенических нормативов химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования: МУ 2.1.5.720—98.

9. Плохинский Н. А. Биометрия, 1970.

Приложение

Пример оценки токсичности золошлака термохимической деструкции фармпрепарата на сперме быка

1. Готовим экстракт золошлака в соответствии с п. 4.
2. Готовим несколько разведений экстракта (см. таблицу).
3. Для каждого разведения экстракта определяем индекс токсичности в соответствии с п. 5 и 6. Результаты заносим в таблицу.
4. Находим коэффициенты уравнения регрессии в соответствии с п. 7. Для этого используем программу W.1997 «Microsoft Excel». В нашем случае уравнение регрессии имеет вид $\mathrm{Lg}R = 0{,}028I_t + 0{,}59$. Из полученного уравнения регрессии находим $IR_{50} = 98$ и $IR_{80} = 670$.
5. Определяем класс опасности отхода по табл. 1 п. 8.
   Величине $IR_{50} = 98$ соответствуют класс опасности 3 и категория опасности – «умеренно опасные».

Таблица

Название отхода	Разведение экстракта R	Индекс токсичности I_t, %
Золошлак термохимической деструкции фармпрепарата	1 000	99
	500	83
	250	66
	100	35
	50	52
	25	27
	10	0
	1	0

6. Разведения водного экстракта отхода, превышающие порог токсического действия $IR > 670$, не будут оказывать негативное воздействие на сперму быка, что обеспечит токсикологическую безопасность отхода.

gost.e-ecolog.ru