

ІНСТИТУТ ГІДРОБІОЛОГІЇ  
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

**Оцінка токсичності та ідентифікація  
класу забруднюючих речовин у воді  
та донних відкладах за допомогою  
уніфікованої тест-системи  
(процедура, методи, рекомендації)**



*Методичні рекомендації*

**Інститут гідробіології  
Національної академії наук України**

*Юришинець В.І., Коновець І.М., Кіпніс Л.С., Леонтєва Т.О.,  
Старосила Є.В., Романенко О.В.*

*Методичні рекомендації*

**Оцінка токсичності та ідентифікація  
класу забруднюючих речовин у воді та донних  
відкладах за допомогою уніфікованої тест-системи  
(процедура, методи, рекомендації)**

КИЇВ–2025

УДК [574.583:574.587] (083.13)

**Методичні рекомендації «Оцінка токсичності та ідентифікація класу забруднюючих речовин у воді та донних відкладах за допомогою уніфікованої тест-системи (процедура, методи, рекомендації)» / Юришинець В.І., Коновець І.М., Кіпніс Л.С., Леонтьєва Т.О., Старосила Є.В., Романенко О.В. – Київ: Інститут гідробіології НАН України, 2025. – 80 с.**

У методичних рекомендаціях наведено практичне керівництво проведення комплексу досліджень з оцінки токсичності та ідентифікації класу забруднюючих речовин у воді та донних відкладах за допомогою уніфікованої тест-системи (робоча назва: Мінілабораторія «Унітест-Токсід»). Керівництво містить опис мінілабораторії з різними варіантами комплектації, наведено перелік та характеристики необхідних матеріалів і реактивів, детальну процедуру проведення випробувань із використанням мінілабораторії, вимоги та рекомендації по підготовці мінілабораторії до роботи, рекомендовані методи та підходи до оцінювання результатів випробувань, шаблони документування.

Для фахівців з гідроекології, екологічної токсикології, лабораторного аналізу, науковців та освітян, аспірантів, студентів екологічного та біологічного напрямів, усіх, хто переймається проблемами безпечного довкілля.

The methodological recommendations provide practical guidance on conducting a series of tests for toxicity identification evaluation, the class of pollutants in water and bottom sediments using a unified test system (working title: Minilaboratory “Unitest-Toxid”). The guide contains a description of the minilaboratory with various configuration options, a list and characteristics of the necessary materials and reagents, a detailed procedure for conducting tests using the minilaboratory, requirements and recommendations for preparing the minilaboratory for operation, recommended methods and approaches for evaluating test results, and documentation templates.

For specialists in hydroecology, environmental toxicology, laboratory analysis, scientists and educators, graduate students, students of environmental and biological disciplines, and anyone concerned with environmental safety issues.

Рецензенти:

**Щербак В.І.** — доктор біологічних наук, професор

**Крот Ю.Г.** — кандидат біологічних наук

Рекомендовано до друку Вченою радою Інституту гідробіології НАН України (протокол від 27.11.2025 р. № 10).

Публікація підготовлена за підтримки Національного фонду досліджень України — Проєкт 2023.04/0045 «Розробка уніфікованої тест-системи для оцінки токсичності та ідентифікації класу забруднюючих речовин, що потрапляють у водні об'єкти внаслідок воєнних дій».

ISBN 978-617-8268-99-2

© Інститут гідробіології НАН України, 2025

## ЗМІСТ

ВСТУП .....	4
1. ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ.....	5
1.1. Список скорочень.....	5
1.2. Терміни та визначення.....	6
1.3. Призначення мінілабораторії (уніфікованої тест-системи).....	9
1.4. Загальні принципи виконання досліджень із застосуванням мінілабораторії (алгоритм процедури оцінки токсичності та ідентифікації класу забруднюючих речовин у воді та донних відкладах).....	9
2. КОМПЛЕКТАЦІЯ МІНІЛАБОРАТОРІЇ «УНІТЕСТ-ТОКСІД».....	12
2.1. Базова комплектація .....	12
2.2. Додаткова комплектація.....	15
3. ПІДГОТОВКА МІНІЛАБОРАТОРІЇ ДО РОБОТИ .....	16
3.1. Технічні вимоги до приміщення та комунікацій. ....	16
3.2. Підготовка та порядок роботи з блоком тестування мінілабораторії «Унітест-Токсід» .....	16
3.3. Підготовка тест-організмів .....	22
3.4. Підготовка води, середовищ, реактивів та реагентів. ....	23
4. ПРОБОПІДГОТОВКА.....	25
5. ВИКОНАННЯ ПРОЦЕДУР .....	28
5.1. Перший етап досліджень.....	28
5.1.1. Початковий тест на токсичність.....	28
5.1.2. Фізико-хімічні маніпуляції з аліквотами зразка .....	33
5.2. Другий етап досліджень .....	37
5.2.1. Базовий тест на токсичність.....	37
5.2.2. Тест після фільтрації.....	38
5.2.3. Тест після аерації .....	40
5.2.4. Тест після зміни рН.....	41
5.2.5. Тест після ТФЕ на C <sub>18</sub> .....	44
5.2.6. Тест після додавання ЕДТА-Na <sub>2</sub> .....	47
5.2.7. Тест після обробки цеолітом.....	48
5.3. Випробування водних витяжок донних відкладів. ....	48
6. ОБРОБКА І ОЦІНЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	50
6.1. Статистичний аналіз результатів.....	50
6.2. Оцінювання результатів тестів. ....	53
6.3. Наступні етапи досліджень .....	58
7. ФУНКЦІОНАЛЬНІ МОЖЛИВОСТІ МІНІЛАБОРАТОРІЇ «УНІТЕСТ-ТОКСІД» У РОЗШИРЕНІЙ КОМПЛЕКТАЦІЇ.....	59
ДОДАТКИ.....	63
СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....	71

## ВСТУП

Це видання задумано як практичне керівництво для проведення комплексу досліджень з оцінки токсичності та ідентифікації класу забруднюючих речовин у воді та донних відкладах за допомогою уніфікованої тест-системи (робоча назва: «Мінілабораторія «Унітест-Токсід»), яка розроблена за результатами виконання проєкту 2023.04/0045 «Розробка уніфікованої тест-системи для оцінки токсичності та ідентифікації класу забруднюючих речовин, що потрапляють у водні об'єкти внаслідок воєнних дій», за підтримки Національного фонду досліджень України (конкурс «Наука для зміцнення обороноздатності України»).

Керівництво містить опис мінілабораторії з різними варіантами комплектації, наведено перелік та характеристики необхідних матеріалів та реактивів, детальну процедуру проведення випробувань із використанням мінілабораторії, вимоги та рекомендації щодо підготовки лабораторії до роботи, підходи та методи для обробки і оцінювання результатів тестів, рекомендовані шаблони документування.

# 1. ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ

## 1.1. Список скорочень

ДВ	донні відклади
ЕДТА	етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA)
ЕК <sub>50</sub>	концентрація, за дії якої рівень ефекту досягає 50 % від максимального значення
ЛК <sub>50</sub> <sup>24</sup>	медіанна летальна концентрація за 24 год експозиції
ЛР <sub>50</sub>	медіанне летальне розбавлення
ОВП	окисно-відновний потенціал
ТФЕ	твердофазна екстракція (SPE, solid phase extraction)
ANOVA	Analysis Of Variance (однофакторний дисперсійний аналіз)
C <sub>18</sub>	octadecylsilane (октадецилсилан)
EPA	Environmental Protection Agency (Агенція з охорони довкілля, США)
TDS	Total Dissolved Solids (зальна мінералізація води)
TIE	Toxicity Identification Evaluation (Оцінка ідентифікації токсичності)
TU	toxic unit (одиниця токсичності)

## 1.2. Терміни та визначення

<b>Термін</b>	<b>Визначення</b>
<b>Біологічне тестування (біотестування)</b>	встановлення токсичності для живих організмів хімічних речовин, поверхневих прісних, морських і солонуватих, підземних і зворотних вод, водних розчинів окремих речовин та їхніх сумішей, водних витяжок з ґрунтів, відходів та донних відкладів; ґрунтується на кількісних оцінках зміни життєво важливих функцій або виявленні смертельної (летальної) дії на тест-об'єкти або тест-культури
<b>Вихідний розчин</b>	концентрований водний розчин речовини, з якого готують розчини з меншими концентраціями цієї речовини для безпосередніх досліджень
<b>Експозиція</b>	проміжок часу, протягом якого організм знаходиться під впливом досліджуваного чинника
<b>Забруднення вод</b>	надходження до водних об'єктів забруднювальних речовин
<b>Забруднювальна речовина</b>	речовина, яка привноситься у водний об'єкт в результаті господарської діяльності людини та може завдати шкоди здоров'ю людини та навколишньому середовищу
<b>Загальна мінералізація води</b>	показник загального вмісту мінеральних речовин у воді (розчинених іонів та солей)
<b>Збіжність результатів біотестування</b>	ступінь наближення результатів повторних біотестів, отриманих однією методикою та на одному і тому самому референтному токсиканті, але в різних умовах (різними операторами, в різних лабораторіях, в різний час)
<b>Інтегральна токсичність</b>	міра шкочинних властивостей середовища, виражена за допомогою умовних показників; потребує приведення різних одиниць виміру токсичних властивостей середовища на різних тест-об'єктах до єдиної безрозмірної системи з метою комплексної, сукупної оцінки стану водних екосистем і визначення рівнів екологічної небезпеки для людини та біоти
<b>Критерій токсичності</b>	показник життєдіяльності тест-об'єкта, на підставі якого роблять висновок про токсичність
<b>Ксенобіотики</b>	штучно синтезовані людиною (природно не утворюються), чужорідні для біосфери хімічні сполуки (пестициди, фармацевтичні препарати тощо)

<b>Медіанна ефективна концентрація (ЕК<sub>50</sub>)</b>	розрахункова або графічно отримана концентрація, яка спричиняє певний ефект у 50 % тест-організмів при заданих умовах та експозиції
<b>Медіанна летальна концентрація (ЛК<sub>50</sub>)</b>	розрахункова або графічно отримана концентрація токсичної речовини, що викликає загибель 50 % тест-об'єктів при заданих умовах та експозиції
<b>Негативний контроль</b>	тут: тестування організмів на воді для розбавлення без проведення жодних попередніх маніпуляцій; дозволяє виключити вплив випадкових змін або фонових процесів
<b>Порова (інтерстиціальна) вода</b>	вода, що займає простір між частинками донних відкладів або ґрунту
<b>Рівень токсичності</b>	кількісна характеристика токсичної дії (води, водної витяжки донних відкладів, стічних вод), що визначається через мінімальну кратність розведення, за якого токсичність вже не виявляється
<b>Оператор</b>	тут: фахівець, який володіє методами та навичками для проведення процедур оцінки токсичності та ідентифікації забруднюючих речовин у воді та донних відкладах за допомогою уніфікованої тест-системи
<b>Оцінювання та ідентифікація токсичності (ТІЕ)</b>	сукупність процедур, що використовуються для ідентифікації конкретних груп хімічних речовин, що чинять токсичну дію
<b>Тест з цільними донними відкладами</b>	дослід із застосуванням мінімально порушених донних відкладів та пов'язаних з ними порових вод
<b>Тест-об'єкт</b>	чутливий біологічний елемент, здатний реагувати на зовнішній вплив
<b>Тест-організм</b>	живий організм (особина), який використовується для біотестування
<b>Речовина токсичної дії (токсикант, токсична речовина)</b>	речовина, здатна за відносно невеликої концентрації викликати патологічні зміни або загибель організмів
<b>Токсична дія</b>	результат негативного впливу токсиканту на організм, що виявляється в зміні показників його життєдіяльності
<b>Токсичність</b>	властивість порушувати життєдіяльність організмів, зумовлена наявністю в компонентах оточуючого середовища токсичних речовин

<b>Холоста проба (позитивний контроль)</b>	тут: зразок води для розбавлення, який проходить всі етапи пробопідготовки разом із середовищним зразком і слугує для перевірки відсутності штучно набутої токсичності
<b>Хронічна токсичність</b>	негативний вплив, що виявляється протягом відносно тривалого періоду; хронічну токсичну дію зазвичай оцінюють не за показником виживання тест-організму, а за іншими тест-реакціями (ріст, розвиток, розмноження)

### **1.3. Призначення мінілабораторії (уніфікованої тест-системи)**

Біотестування води та донних відкладів водних об'єктів, у тому числі джерел водопостачання, які зазнають непередбачуваного негативного впливу, включно з воєнними діями; швидке виявлення токсичності та подальше встановлення можливого чинника (чинників) токсичної дії серед найпоширеніших класів токсикантів; можливе подальше інтегрування даних в систему комплексної оцінки стану вод та аналітичного виявлення токсичних речовин.

### **1.4. Загальні принципи виконання досліджень із застосуванням мінілабораторії (алгоритм процедури оцінки токсичності та ідентифікації класу забруднюючих речовин у воді та донних відкладах)**

Оцінити комплексний вплив різноманітних забруднювальних речовин за рівнем токсичності дозволяє використання методології та методів біотестування. Головні переваги цього підходу полягають у його відносній простоті та доступності, порівняно високій швидкості виконання дослідження, відсутності потреби у вартісному устаткуванні та реактивах, високій чутливості коректно підібраних тест-організмів до мінімальних концентрацій токсичних агентів у водному середовищі.

Посилити інформативність біотестування може поєднання тестів на токсичність з певними процедурами обробки зразків води і донних відкладів, що призводять до зменшення біодоступності присутніх у сумішах оточуючого середовища забруднювачів токсичної дії. Виявилось, що цей підхід може бути ефективним скринінговим методом виявлення чинника токсичності у водному середовищі.

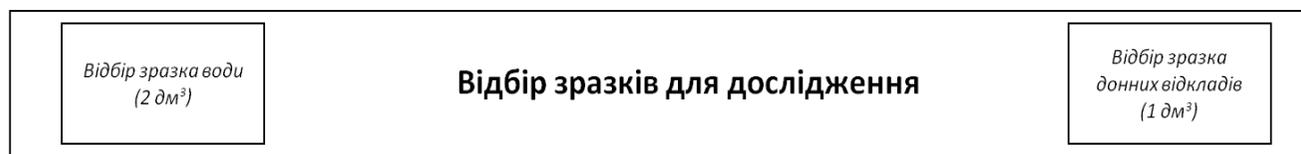
Суть методу ТІЕ (Оцінка ідентифікації токсичності) полягає у реєстрації відповіді тест-організмів при проведенні послідовної серії фізико-хімічних маніпуляцій з токсичним середовищем, що дозволяє ідентифікувати чинник або чинники токсичної дії. Даний підхід підрозділяють на три фази: I – визначення фізико-хімічних властивостей чинника токсичності (Characterisation); II – аналітичне визначення чинника токсичності (Identification) та III – підтвердження того, що визначений чинник токсичності відповідає за всю виявлену негативну дію (Confirmation). За основну схему випробувань нами пропонується проведення першої Фази ТІЕ для порових вод прісноводних донних відкладів (ЕРА/600/R-07/080), за цією схемою ми рекомендуємо досліджувати як воду, так і водні витяжки донних відкладів та порові води.

На нашу думку, спрощення процедури оцінки ідентифікації токсичності можливе за умов щонайшвидшого виявлення феномену токсичності або його

відсутності. Для цього ми пропонуємо проведення експрес-тестів на виявлення впливу токсикантів на рухову активність гідробіонтів та швидке апаратне встановлення їхньої іммобілізації (знерухомлення).

За умови виявлення токсичності у початковому (проводиться у перший день випробувань) і базовому тестах (другий та наступні дні випробувань) зусилля спрямовуються на виявлення ймовірних чинників формування токсичності води та донних відкладів. Відомо, що переважаючими токсикантами у прісноводних екосистемах є неіонні органічні сполуки, різні форми металів, зокрема їх іони.

Пропонований алгоритм роботи мінілабораторії (рис. 1.1) зосереджує увагу саме на цих найбільш імовірних чинниках токсичності (не нехтуючи усіма іншими процедурами за потреби), ідентифікувати які можна за допомогою дослідження токсичності проб після проведення таких маніпуляцій як аерація, фільтрація, зміна рН вихідного зразка в кислий бік (рН 6), додавання ЕДТА- $\text{Na}_2$ , твердофазна екстракція на октадецилсилані ( $\text{C}_{18}$ ) та додавання цеоліту.



**Транспортування зразків в лабораторію**

**Пробопідготовка**

*Підготовка проб води*

Розділення зразка на декілька аліквот

Код	Маніпуляції	Випробування на токсичність
V-01		Початковий тест
V-02	Розбавлення (в разі необхідності)	Базовий тест
V-03	Фільтрування	Тест після фільтрування (вплив завислих речовин)
V-04	Твердофазна екстракція на картриджі C <sub>18</sub>	Тест після ТФЕ-C <sub>18</sub> (вплив малополярних органічних речовин)
V-05	Аерування	Тест після аерування (вплив летких і легкоокиснюваних речовин)
V-06-K	Підкислення до pH 6	Тест після підкислення до pH 6 (вплив pH-залежних речовин)
V-07-1 V-07-2	Додавання ЕДТА	Тест після додавання ЕДТА (вплив важких металів)
V-08	Додавання цеоліту	Тест після додавання цеоліту (відокремлення впливу аміаку)

*Отримання водних витяжок та/або порових вод*

Розділення зразка на декілька аліквот

Код	Маніпуляції	Випробування на токсичність
D-01		Початковий тест
D-02	Розбавлення (в разі необхідності)	Базовий тест
D-04	Твердофазна екстракція на картриджі C <sub>18</sub>	Тест після ТФЕ-C <sub>18</sub> (вплив малополярних органічних речовин)
D-05	Аерування	Тест після аерування (вплив летких і легкоокиснюваних речовин)
D-06	Підкислення до pH 6	Тест після підкислення до pH 6 (вплив pH-залежних речовин)
D-07-1 D-07-2	Додавання ЕДТА	Тест після додавання ЕДТА (вплив важких металів)
D-08	Додавання цеоліту	Тест після додавання цеоліту (відокремлення впливу аміаку)

Рисунок 1.1 – Загальний алгоритм випробувань із застосуванням уніфікованої тест-системи Мінілабораторія «Унітест-Токсід»: схема, послідовність дій, часові шкали дій та результатів



### **Б. Блок тестування та підготовки тест-організмів**

Включає кліматостат з системою контролю та інструментарій для проведення тестів, дослідних варіантів з тест-організмами (під час їх проведення). Є ключовою складовою мінілабораторії, яка може достатньо мобільно переміщатися між локаціями (населені пункти, будівлі, лабораторні приміщення, меблі) за умови збереження комплектуючих (рис. 2.2).

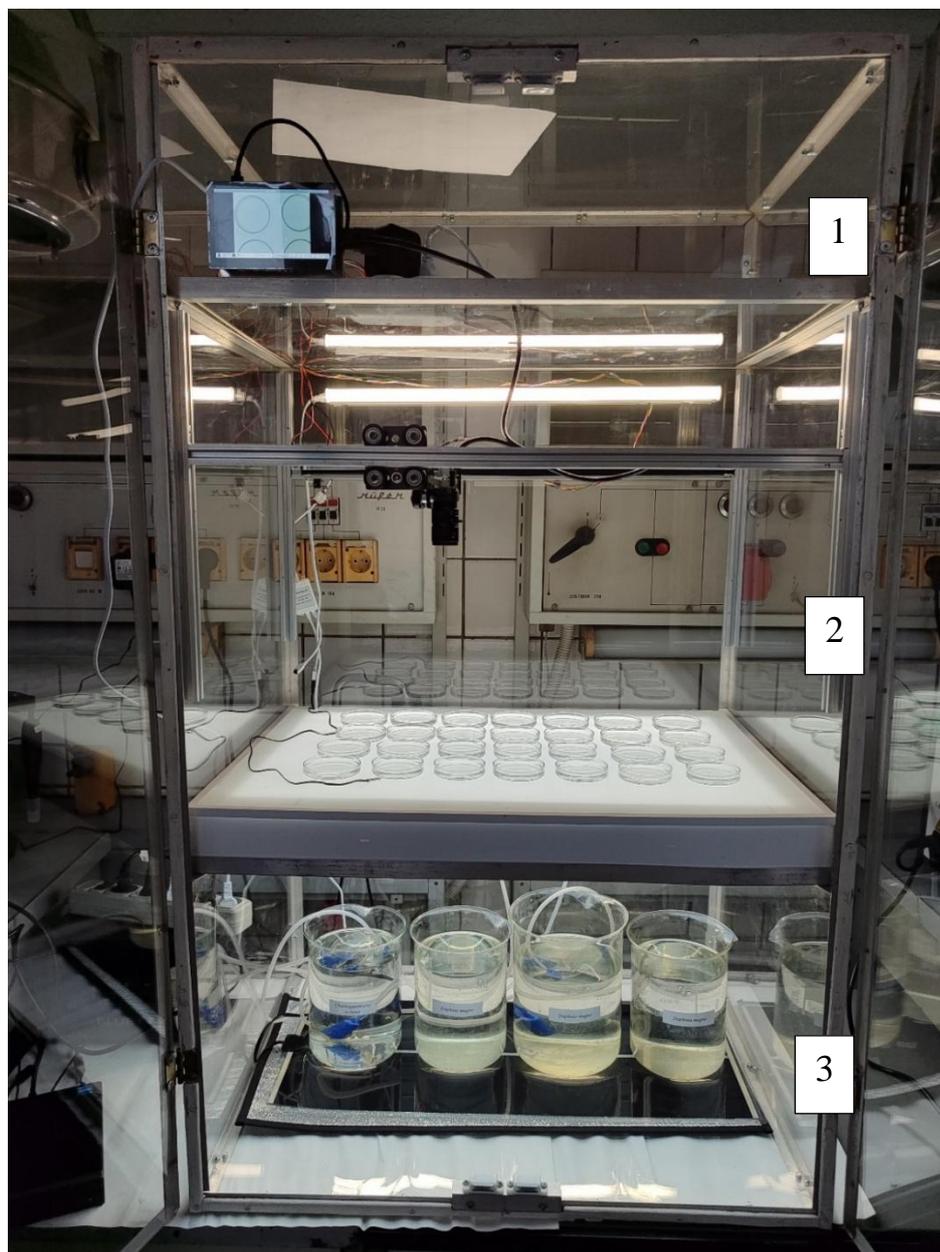


Рисунок 2.2 – Блок тестування та підготовки тест-організмів. Опис в тексті

Кліматостат складається з трьох функціональних компонентів: 1) Блок автоматичної реєстрації результатів тестів, який включає індустріальну камеру та систему контролю під управлінням мінікомп'ютера; 2) Експериментальна камера, в якій у відповідних позиціях розміщуються ємності з тест-організмами під час проведення тестів. Експериментальна камера обладнана інвертованим

(«нижнім») освітленням з автоматичним контролем; 3) Блок підготовки тест-організмів для попередньої їхньої адаптації до експериментальних умов. Може бути використаний для додаткової комплектації пристроєм для тестування цільних донних відкладів – див. Розділ 7.

Таблиця 2.1 – Список базової комплектації обладнання, матеріалів і реактивів, що рекомендовані для мінілабораторії «Унітест-Токсід»

Назва	Код **	Розташування (блок)
<b>Обладнання</b>		
Аератор акваріумний	<i>E-Aer</i>	А, Б
Ваги для зважування реактивів	<i>E-Scr</i>	А
Ваги для зважування донних відкладів	<i>E-Scs</i>	А
Кліматостат *	<i>E-UT</i>	Б
Насос вакуумний з системою фільтрації	<i>E-VPu</i>	А
Набір піпет-дозаторів 20–200 мкл, 100–1000 мкл, 1000–10000 мкл	<i>E-Sam</i>	А
Оксиметр стаціонарний лабораторний	<i>E-Oxi</i>	А
рН-метр стаціонарний	<i>E-pHm</i>	А
Система фільтрації води з тріступеневим очищенням	<i>E-Fil</i>	відповідно до плану приміщення
Шейкер лабораторний	<i>E-Shr</i>	А
Центрифуга лабораторна	<i>E-Cfg</i>	А
Оксиметр/рН-метр/кондуктометр/TDS/солемір (4 в 1) AZ-86031	<i>E-Cdm</i>	
<b>Матеріали</b>		
Стакан для проведення експериментів 25 см <sup>3</sup> , 50 см <sup>3</sup> , 100 см <sup>3</sup>	<i>M-Pig</i>	А, Б
Циліндр 100 см <sup>3</sup> 250 см <sup>3</sup>	<i>M-Cyl100</i> <i>M-Cyl250</i>	А
Чашки Петрі d = 6 см, d = 10 см	<i>M-Pet6</i> <i>M-Pet10</i>	Б

Ємність для утримання гідробіонтів 3 дм <sup>3</sup> , 5 дм <sup>3</sup>	<i>M-Con3</i> <i>M-Con5</i>	Б
Картридж ТФЕ C <sub>18</sub> , 6 см <sup>3</sup>	<i>M-SPE</i>	А
Колба конічна з широким горлом 500 см <sup>3</sup>	<i>M-Col</i>	Б
Корм для гідробіонтів (паста хлорели, пластівці, дріжджі)	<i>M-Fod</i>	Б
Мембранні фільтри 0,45 μm, діаметр 47 mm	<i>M-MFi</i>	А
Наконечники до піпет-дозаторів в асортименті	<i>M-Cap</i>	А
Піпетки скляні 1 см <sup>3</sup> , 2 см <sup>3</sup> , 5 см <sup>3</sup> , 10 см <sup>3</sup>	<i>M-Glp</i>	А
Піпетки пластикові 2,5 см <sup>3</sup>	<i>M-Pip</i>	А
<b>Реактиви</b>		
Етилендіамінтетраоцтова кислота динатрієва сіль (EDTA), чда	<i>R-EDT</i>	А
Калій двухромовоокислий (K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ), чда	<i>R-KCr</i>	А
Мідь (II) сірчаноокисла , чда	<i>R-Cuc</i>	А
Цеоліт	<i>R-Ceo</i>	А
Хлоридна кислота (HCl), чда HCl 1н HCl 0,1н	<i>R-HCl</i> <i>R-HCl-1</i> <i>R-HCl-0,1</i>	А
Натрію гідроксид (NaOH), чда NaOH 1н NaOH 0,1н	<i>R-NaOH</i> <i>R-NaOH-1</i> <i>R-NaOH-0,1</i>	А

*Примітки:*

\* – Мінілабораторія «Унітест-Токсід» (блок тестування)

\*\* – код обладнання, матеріалів та реактивів використовується в подальшому викладі процедури комплексної оцінки з відповідним посиланням в тесті.

## **2.2. Додаткова комплектація**

Додаткова комплектація стосується розширення вимірювальних можливостей лабораторії. Вона може охоплювати як Блок пробопідготовки та включення до нього додаткового обладнання (сушильна шафа, культуральні ємності, техніка для мікроскопіювання та ін.), так і Блок тестування, в якому можливо створити умови для проведення вимірювань на цільних донних відкладах. Більш детально – див. розділ 7.

### 3. ПІДГОТОВКА МІНІЛАБОРАТОРІЇ ДО РОБОТИ

#### 3.1. Технічні вимоги до приміщення та комунікацій

Приміщення. Вимоги до приміщень лабораторії включають належний рівень освітленості та мікроклімату (температура  $20\pm 2$  °C, вологість 35–60 %), наявність усіх комунікацій (вода, каналізація, вентиляція, освітлення, електрика), а також використання безпечних матеріалів для підлоги, стін і стелі. Бажано, щоб підлога була гладкою, без швів, стіни та стеля — покриті матеріалами, що дозволені санітарними нормами, переважно нейтральних кольорів. Приміщення має бути обладнане необхідними лабораторними меблями.

#### 3.2. Підготовка та порядок роботи з блоком тестування мінілабораторії «Унітест-Токсід»

Центральним ключовим компонентом уніфікованої тест-системи є кліматостат із системою контролю та управління «Мінілабораторія «Унітест-Токсід» (блок тестування)» (*E-UT*), який може бути розміщений на звичайному лабораторному столі або на іншій основі, при цьому бажано адаптувати його висоту відповідно до зросту Оператора.

Усе необхідне обладнання, пристрої та витратні матеріали Блоку А (Блок пробопідготовки) повинне розміщуватися на інших лабораторних меблях поблизу експериментального блоку та бути легкодоступними Оператору.

Система автоматичної фіксації і обробки відеозображення складається з чотирьох основних елементів:

- поверхні з інвертованим (нижнім) світлодіодним освітленням, яке включається автоматично під час знімання відео, і на якій розміщуються дослідні ємності з тест-організмами;
- відеокамери з системою її позиціонування і переміщення над тестовими ємностями за допомогою крокових двигунів, які керуються мінікомп'ютером;
- мінікомп'ютера (RPI 5), за допомогою якого обирається відповідна програма спостереження, здійснюється автоматичне управління камерою і світлом, а також первинне збереження отриманого відеоматеріалу на флеш-носій USB-3 ємністю 64 Гб;
- нетбука, на якому здійснюється остаточне збереження відеофайлів, їхня автоматична обробка і статистичний аналіз рухової активності тест-організмів.

Підключення системи до електричної мережі потребує 3 точки під'єднання на 220–230 В, 50 Гц. Перша з них заживлює мінікомп'ютер з електронною системою керування і освітлювальною поверхнею, інші дві – нетбук з дисплеєм.

Після підключення до електричної мережі мінікомп'ютер завантажується автоматично і система відеофіксації та збереження первинного відеоматеріалу готова до роботи через 30 секунд. В такому варіанті система може працювати автономно, має відносно низьке енергоспоживання і, за умови підключення до джерела безперебійного живлення ємністю близько 300 Вт-год, може функціонувати в автономному режимі протягом доби.

Робота системи автоматичного аналізу рухової активності тест-організмів складається з таких етапів:

**Розташування дослідних ємностей.** Потребує дій Оператора. Денця чашок Петрі з певним середовищем і тест-організмами акуратно розташовують в певних комірках на освітлюваній поверхні відповідно до програми спостережень, що буде застосована. Максимальна можлива кількість становить 54 позиції (рис. 4.1). Рекомендації щодо розташування контрольних і дослідних повторностей наводяться нижче у цьому розділі, а також роз'яснюються у відповідних підпунктах розділу 5.

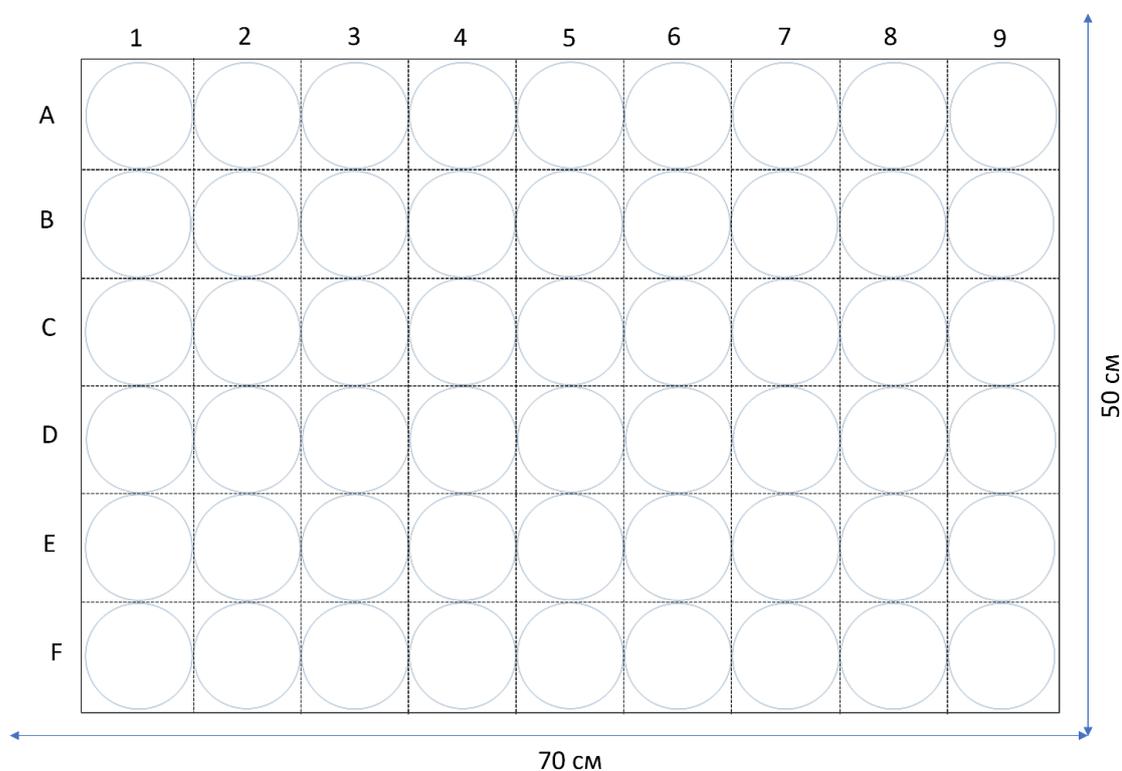


Рисунок 3.1 – Загальна схема розташування дослідних ємностей (чашки Петрі 6 см, діаметр денця 5,4 см) на освітлювальній поверхні експериментальної камери кліматостата (E-UT)

**Запуск керуючої програми.** Потребує дій Оператора. Запуск здійснюється з робочого столу дисплея мінікомп'ютера за допомогою маніпулятора «миша» подвійним натисненням на відповідній іконці (рис. 3.2).

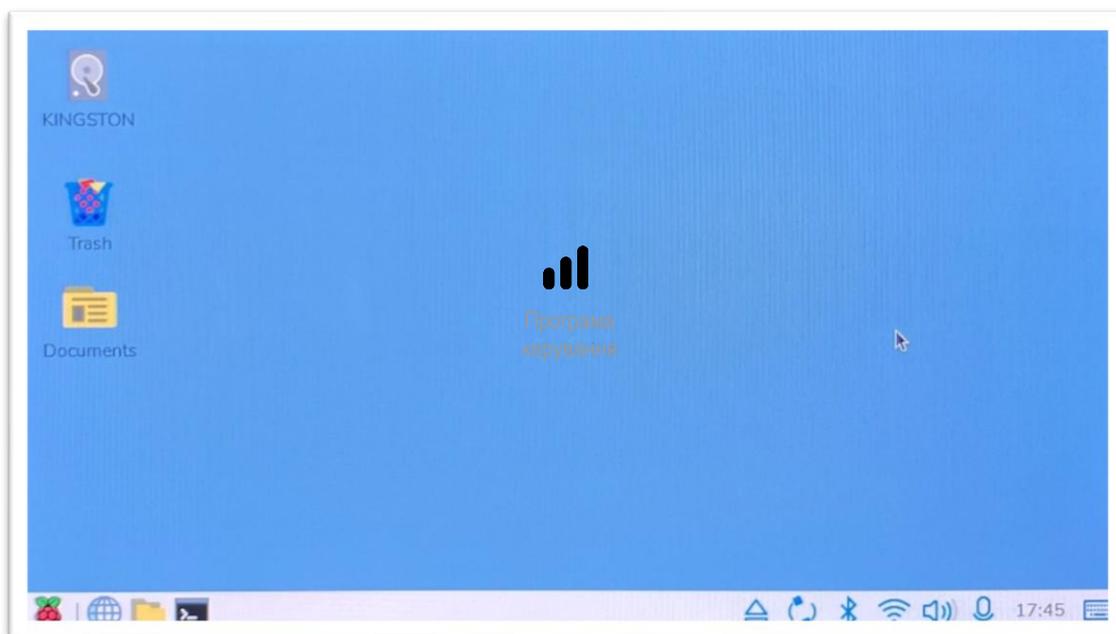


Рисунок 3.2 – Вигляд початкового екрану на дисплеї мінікомп'ютера RPi 5 після його завантаження

**Вибір сценаріїв спостережень.** Потребує дій Оператора. Система пропонує п'ять стандартних сценаріїв, які можна обрати зі списку (рис. 4.3). Після вибору сценарію Оператор присвоює випробувальній процедурі унікальне ім'я, яке максимально характеризуватиме дослідження і стане назвою директорії, в якій зберігатиметься відеоматеріал.

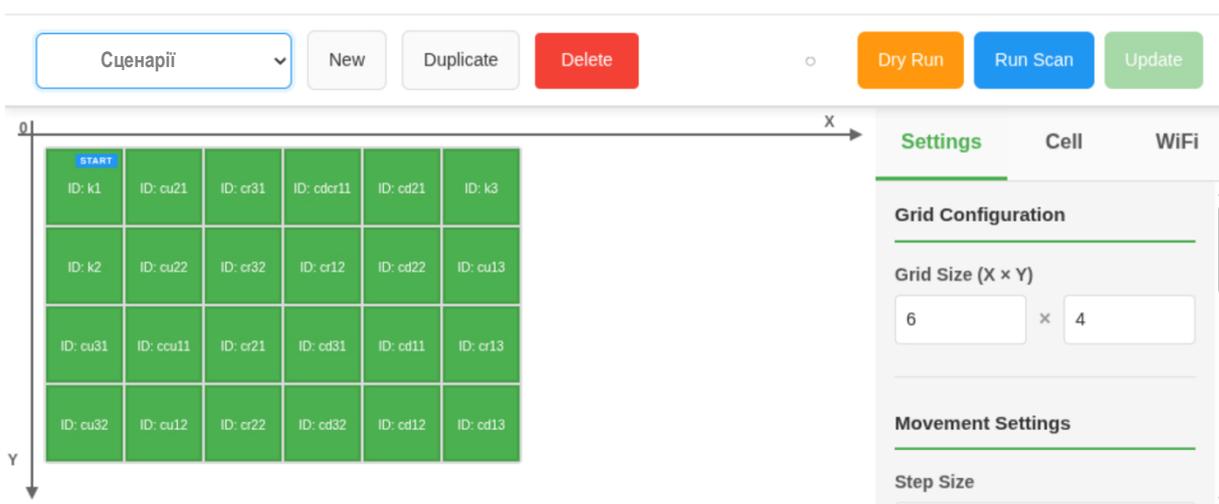


Рисунок 3.3 – Інтерфейс програми керування

Сценарій I. Початковий тест 1 включає контроль та чотири дослідних зразки (100, 50, 25 та 12,5 % вихідного зразка), виконується у 2 повторностях. Пропонується дотримуватися розташування дослідних ємностей за такою схемою:

	1	2	3	4	5
A	K1	25-1	100-1	50-2	12-2
B	12-1	50-1	K2	25-2	100-2

Сценарій II. Початковий тест 2, який виконується у випадку, якщо зразки демонструють високу токсичність, проводиться після початкового тесту 1, включає контроль та п'ять дослідних зразків (20, 10, 5, 2,5 та 1,25 % вихідного зразка), виконується у 2 повторностях. Пропонується розташовувати дослідні ємності за наступною схемою:

	1	2	3	4
A	20-1	K1	5-1	1-2
B	10-1	5-2	20-2	2-2
C	2-1	1-1	K2	10-2

Після запуску сценаріїв початкового тесту 1 або 2 Оператор може переходити до виконання наступних операцій (фізико-хімічні маніпуляції зі зразком води, приготування водних витяжок тощо).

Сценарій III. Другий етап: тести вода. Тест з зразками води включає набір усіх тестів другого етапу: базовий тест у трьох повторностях, контроль з водою для розбавлення (три повторності), тести після маніпуляцій у двох повторностях, «холості» проби в одній повторності на кожен тест. Пропонується розташовувати дослідні ємності (26 шт.) за такою схемою:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	B-05-1	K1	B-071-1	B-02-1	B-072-1	B-06-1	B-03-1	B-08-1	B-04-1
B	B-02-2	B-06-2	B-03-2	B-072-2	K2	B-05-2	B-04-2	B-071-2	B-08-X
C	B-072-X	B-03-X	B-04-X	B-08-2	B-05-X	B-02-3	K3	B-06-X	

Сценарій IV. Другий етап – тести ввДВ (водні витяжки). Тест зі зразками водних витяжок ДВ є аналогічним тесту зі зразками води, за виключенням процедури фільтрації, яка не проводиться, тому і відповідні зразки відсутні. Пропонується розташовувати дослідні ємності (23 шт.) згідно з такою схемою:

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	B-05-1	K1	B-071-1	B-02-1	B-072-1	B-06-1	B-08-1	B-04-1
B	B-02-2	B-06-2	B-072-2	K2	B-05-2	B-04-2	B-071-2	B-08-X
C	B-072-X	B-04-X	B-08-2	B-05-X	B-02-3	K3	B-06-X	

Після розміщення дослідних ємностей в експериментальній камері кліматостату Оператор запускає відповідний сценарій. Після ініціації того чи іншого сценарію система розпочинає запис відео руху тест-організмів у кожній дослідній ємності протягом 30 секунд з роздільною здатністю 2084×1536 точок і 25 кадрів в секунду. Цикли відеофіксації руху тест-організмів в дослідних ємностях автоматично повторюватимуться через 2, 6, 12 і 24 години від початку досліджень.

**Створення, передавання і зберігання відеофайлів.** Виконується автоматично. Система надає файлам унікальне ім'я, яке складається з трьох частин: дати, часу старту циклу і коду повторності (наприклад, *ддммрр\_ггххсс\_K1.mp4*). Файли за допомогою бездротової технології передаються до системи аналізу і там зберігаються на жорсткому диску нетбука. Якщо система аналізу за якихось причин не активна (наприклад, внаслідок фізичного відключення нетбука), файли зберігаються на зовнішньому носії мінікомп'ютера і автоматично переносяться після її активації.

**Аналіз рухової активності.** Виконується автоматично. Система аналізу, що встановлена на нетбучі, активується при надходженні файлів відеофіксації до відповідної директорії й ініціює низку послідовних модулів аналізу руху (рис. 3.4 А). Вони включають такі кроки як контрастування зображення, визначення активної зони пошуку, віднімання фону, ідентифікацію рухомих об'єктів, визначення їхніх траєкторій та підрахунок пройденого шляху.

**Experiment Runs**  
Videos organized by RUN — SCAN — VIDEO hierarchy

TOTAL RUNS: 3      TOTAL VIDEOS: 85

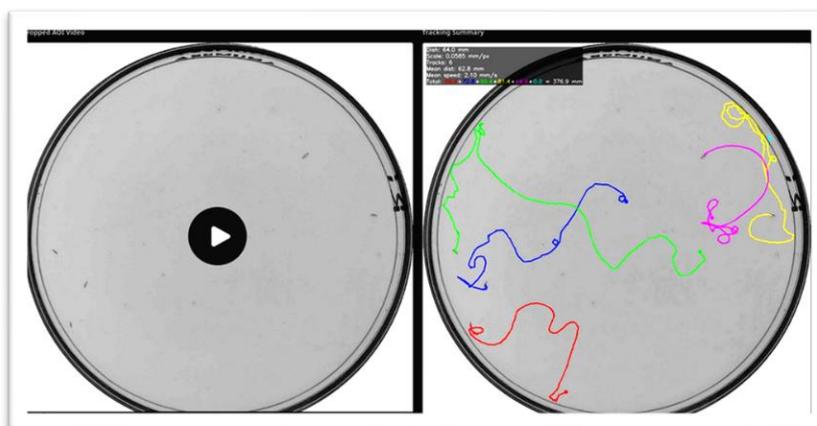
Experiment: 11/19/2025 • 3 scans

20251119\_022111\_experiment

0 selected | All None Pending (0) Failed (1)      Add to Queue

FILENAME	CELL	SCAN	DISH #	SIZE	UPLOADED	STATUS	TRACKS / DIST
▶ 20251119_022111_k1.mp4	k1	#0	64 mm	13.7 MB	11/19/2025	✓ completed	6 / 263.3 mm / 60.6x36.8mm
▶ 20251119_022111_k2.mp4	k2	#0	64 mm	13.0 MB	11/19/2025	✓ completed	5 / 263.9 mm / 52.8x31.1mm
▶ 20251119_022111_k3.mp4	k3	#0	64 mm	15.5 MB	11/19/2025	✓ completed	7 / 731.3 mm / 104.5x70.8mm
▶ 20251119_022111_cu5_3.mp4	cu5_3	#0	64 mm	14.5 MB	11/19/2025	✓ completed	0 / 0.0 mm / 0.0x0.0mm
▶ 20251119_022111_cu5_2.mp4	cu5_2	#0	—	14.1 MB	11/19/2025	✓ completed	—
▶ 20251119_022111_cu5_1.mp4	cu5_1	#0	64 mm	13.2 MB	11/19/2025	✓ completed	1 / 65.7 mm / 65.7x0.0mm
▶ 20251119_022111_cu25_1.mp4	cu25_1	#0	64 mm	13.1 MB	11/19/2025	✓ completed	1 / 10.7 mm / 10.7x0.0mm
▶ 20251119_022111_cu25_2.mp4	cu25_2	#0	64 mm	13.5 MB	11/19/2025	✓ completed	1 / 26.3 mm / 26.3x0.0mm
▶ 20251119_022111_cu25_3.mp4	cu25_3	#0	64 mm	14.7 MB	11/19/2025	✓ completed	1 / 41.3 mm / 41.3x0.0mm
▶ 20251119_052119_k1.mp4	k1	#1	64 mm	14.1 MB	11/19/2025	...	5 / 386.8 mm / 77.4x35.3mm

А



Б

Рисунок 3.4 – Інтерфейс програми аналізу (А) і візуалізація отриманих треків (Б) тест-організмів

Показники рухової активності у кожному циклі відеофіксації (2, 6, 12 та 24 год) автоматично узагальнюються у вигляді форми, представленої в таблиці 3.1.

**Варіювання налаштувань системи.** Описана вище система контролю може бути модифікована в залежності від завдань дослідження та умов

проведення тестів. Наприклад, на робочій поверхні експериментальної камери можуть бути одночасно розміщені тести другого етапу для двох різних проб води, в такому випадку кількість експериментальних ємностей зменшується з 52 до 43 через відсутність потреби дублювання контрольних і «холостих» зразків.

Таблиця 3.1 – Представлення результатів аналізу рухової активності тест-організмів

Код зразка	кількість рухомих	% іммоб. особин	пройдений шлях	
			середнє	STD
2 год				
Контроль				
100 % вихідного зразка				
50 % вихідного зразка				
25 % вихідного зразка				
12,5 % вихідного зразка				
6 год				
...				
12 год				
...				
24 год				
...				

За необхідності проведення тестів в ємностях більшого або меншого розміру можуть бути внесені необхідні зміни в налаштування системи, які стосуються кількості та розташування тестових ємностей, періоду та тривалості знімання відеоматеріалів. Система передбачає можливість віддаленого доступу до керуючих елементів (мінікомп'ютер, нетбук) з метою контролю за результатами тестів та, за необхідності, зміни налаштувань.

### 3.3. Підготовка тест-організмів

Як тест-об'єкти для визначення токсичності води у мінілабораторії використовують гіллястовусих ракоподібних *Daphnia magna* (Straus, 1820) для тестування водних витяжок ДВ – *D. magna* та/або представників амфіпод: *Chaetogammarus ischnus* (Stebbing, 1899) або *Hyalella azteca* (Saussure, 1858).

Для тестування рекомендовано застосовувати молодь *D. magna* віком 24–48 год., оскільки це дозволяє зменшити розбіжність результатів та спростити виявлення живих і мертвих особин, при цьому молодь цієї вікової групи майже не поступається новонародженим особинам за чутливістю. Потрібно запобігати використанню молоді з культур, де присутні самці, ефіпіальні самиці, та випадків, коли в культуральних ємностях упродовж 72 год до проведення експериментів була зафіксована смертність організмів понад 10 %.

Підготовку посадкового матеріалу бажано розпочинати ще на стадії відбору самиць, у яких у виводкових камерах можна чітко розпізнати яйця або ембріони у кількості не менше 8–10, проте стадії їх розвитку мають бути близькими. Самиць, загальною кількістю близько 30 особин, розсаджують в три стакани об'ємом 3 дм<sup>3</sup> (*M-Con3*) з водою, що використовуватиметься для розбавлення проб і проведення контрольних дослідів, та розташовують у нижній камері кліматостата (Блок Б, див. рис. 2.2) з метою преадаптації. У ємності вносять корм, який за якістю і кількістю якнайближче відповідає умовам культивування. Молодь відбирають щодня обережним послідовним проціджуванням через тканинні сита з діаметром вічка 2–3 та 0,5 мм (нейлонова сітка).

Придатність культури ракоподібних до біотестування визначають за величиною ЛК<sub>50</sub><sup>24</sup> стосовно референтного токсиканта К<sub>2</sub>Сг<sub>2</sub>О<sub>7</sub> (*R-KCr*), для цього використовують особини віком не старше 24 год, процедуру визначення чутливості проводять щомісячно. Отримана величина ЛК<sub>50</sub><sup>24</sup> повинна потрапляти в діапазон 0,9–2,5 мг/дм<sup>3</sup> з розрахунку на концентрацію солі (див. розділ 5.2). Ми рекомендуємо проводити визначення величини ЛК<sub>50</sub><sup>24</sup> стосовно референтного токсиканта безпосередньо перед виконанням комплексної процедури встановлення токсичності (ДСТУ 4174-2003).

#### **3.4. Підготовка води, середовищ, реактивів та реагентів**

*Вода для розбавлення* використовується у процедурі досліджень також як середовище для проведення негативного («холості» проби) і позитивного (з референтним токсикантом у випробуваннях чутливості культур) контролю та приготування водних витяжок із донних відкладів. Вона має бути придатною для забезпечення нормального функціонування тест-організмів. Ми рекомендуємо використовувати воду, підготовлену за допомогою системи фільтрації з триступеневим очищенням (*E-Fil*), що застосовується для приготування питної води. Також можна використовувати реконструйовану воду – дистильовану або деіонізовану, яку штучно збагачують мінеральними речовинами, необхідними для нормального розвитку тест-організмів (Методичні рекомендації...2024). За потреби можна застосовувати також незабруднену природну поверхневу воду або воду з артезіанських свердловин. Воду перед дослідом слід аерувати (*E-Aer*), насичення киснем має становити 90–100 % (*E-Oxi*).

*Розчин натрію гідроксиду* (NaOH, їдкий натр, каустична сода) ~1 н, 100 см<sup>3</sup> (*R-Nao-1*). На вагах (*E-Scr*) зважують 4,0 г реагенту категорії не нижче ч.д.а. Наважку кількісно переносять у мірний циліндр на 100 см<sup>3</sup> (*M-Cyl100*), попередньо розчиняють у половині об'єму у дистильованій воді, потім доводять нею об'єм до позначки на колбі, перемішують. Визначення точної концентрації

розчину не проводять, оскільки він не призначений для аналітичних цілей. Розчин зберігають протягом 6 місяців у ретельно закритій склянці в прохолоді і захищеному від світла місці.

*Розчин натрію гідроксиду* (NaOH, їдкий натр, каустична сода) ~0,1 н, 100 см<sup>3</sup> (R-Nao-0,1). Для його приготування у мірний циліндр на 100 см<sup>3</sup> (M-Cyl100) вносять 10 см<sup>3</sup> розчину 1 н NaOH (R-Nao-1) і доводять дистильованою водою до позначки 100, перемішують. Розчин зберігають протягом 6 місяців у ретельно закритій склянці в прохолоді і захищеному від світла місці.

*Розчин хлоридної кислоти* (HCl) ~1 н, 100 см<sup>3</sup> (R-Hcl-1), розділ 5.2.4). Для його приготування знадобиться 2,75 см<sup>3</sup> концентрованої хлоридної кислоти (35–37 %). Мірний циліндр на 100 см<sup>3</sup> (M-Cyl100) заповнюють дистильованою водою приблизно до половини об'єму. Обережно додають кислоту у воду, не навпаки. Доливають необхідну кількість дистильованої води до позначки 100, щоб отримати кінцевий об'єм розчину. Циліндр закривають і перемішують розчин шляхом обережного перевертання кілька разів, щоб отримати однорідну концентрацію. Визначення точної концентрації розчину не проводять, оскільки він не призначений для аналітичних цілей. Розчин зберігають протягом 6 місяців у ретельно закритій склянці в прохолоді і захищеному від світла місці.

*Розчин хлоридної кислоти* (HCl) ~0,1 н, 100 см<sup>3</sup> (R-Hcl-0,1). Для його приготування у мірний циліндр на 100 см<sup>3</sup> (M-Cyl100) вносять 10 см<sup>3</sup> розчину 1 н HCl (R-Hcl-1) і доводять дистильованою водою до позначки 100, перемішують. Розчин зберігають протягом 6 місяців у ретельно закритій склянці в прохолоді і захищеному від світла місці.

*Стоковий розчин двохромовокислого калію* (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) 1 г/дм<sup>3</sup>, 100 см<sup>3</sup> (R-Kcr). На вагах (E-Scr) зважують 0,10 г солі категорії не нижче ч.д.а. В разі необхідності сіль попередньо перекристалізують. Наважку кількісно переносять у мірний циліндр місткістю 100 см<sup>3</sup> (M-Cyl100), попередньо розчиняють у половині об'єму у дистильованій воді, потім доводять нею об'єм до позначки на колбі, перемішують. Розчин зберігають протягом місяця у ретельно закритій склянці в прохолоді і захищеному від світла місці.

*Стоковий розчин ЕДТА динатрієвої солі* (ЕДТА-Na<sub>2</sub>, трилон-Б, C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) 10 г/дм<sup>3</sup>, 100 см<sup>3</sup> (R-EDT, розділ 5.2.6). На вагах (E-Scr) зважують 1,0 г безводної солі (або 1,1 г дигідратованої солі – ЕДТА-Na<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O), наважку переносять у склянку для зберігання, куди за допомогою мірного циліндра (M-Cyl100) додають 100 см<sup>3</sup> дистильованої води, сіль розчиняють. Розчин зберігають протягом 6 місяців у ретельно закритій склянці в прохолоді і захищеному від світла місці.

## 4. ПРОБОПІДГОТОВКА

Проби води та донних відкладів, які планують оцінювати методами біотестування та піддавати маніпуляціям, передбаченим процедурою ідентифікації чинників токсичності, не підлягають консервуванню хімічними речовинами чи заморожуванню. Якщо неможливо відразу доставити проби до лабораторії, їх охолоджують до 2–4 °С і зберігають в темряві (до 72 годин). Посуд зі зразком повинен бути наповнений до верху і щільно закритий.

Для проведення процедури відповідно до повної схеми досліджень об'єми проб води і донних відкладів, що надходить у лабораторію, мають становити не менше 2 дм<sup>3</sup>.

### **Підготовка зразків води**

При надходженні зразка води (або під час відбору, якщо він здійснюється тим же оператором) реєструють такі органолептичні показники як колір, запах, наявність зважених часток, а також за допомогою обладнання Блоку А вимірюють наступні фізико-хімічні показники: вміст кисню (*E-Oxi*), рН (*E-pH*), окисно-відновний потенціал та загальну мінералізацію (*E-Cdm*).

У випадку низького вмісту кисню (нижче 4 мг/дм<sup>3</sup>), зразок лагідно оксигенують за допомогою аератора (*E-Aer*) протягом години. У випадку значного вмісту зависей та включень воду проціджують через грубі сита чи нейлонову сітку діаметром вічок 0,5–1 мм.

Зразок води об'ємом 2 дм<sup>3</sup> розділяють на дві рівні частини, одну з яких використовують для проведення подальшої процедури, іншу – зберігають у прохолодному неосвітленому місці на випадок потреби у проведенні додаткових випробувань, для контрольних перевірок чи додаткових тестів протягом наступних днів випробування.

1 дм<sup>3</sup> розділяють на десять рівних частин за допомогою мірного циліндра (*M-Cyl/250*), з них формують аліквоти, які дещо відрізняються відповідно до потреб тестів, які на них будуть виконуватися.

Аліквота *B-01* (200 см<sup>3</sup>) у подальшому не піддається жодним маніпуляціям (незмінений зразок) (окрім оксигенації та проціджування, що описані вище, – за потреби) і використовується для постановки початкового тесту на першому етапі випробувань. Її призначення полягає у розрахунку робочого розбавлення для проведення досліджень другого етапу (розділ 5.1.2). Аліквота *B-02* (100 см<sup>2</sup>) призначена для проведення базового тесту і може підлягати розбавленню, якщо проба води за результатами попереднього тесту чинить дуже високу токсичність

(розділ 5.2.1). Вона зберігається незмінною в темному прохолодному місці до другого етапу випробувань.

Частину проби об'ємом 200 см<sup>3</sup> фільтрують за допомогою вакуумної помпи з системою фільтрації (*E-Vpu*) крізь мембранний фільтр з діаметром пор 0,45 мкм (мікробіологічний фільтр, *M-MFi*). Після цього її розділяють на дві рівні за об'ємом аліквоти: *B-03* (100 см<sup>3</sup>) використовується далі в тестах без змін (тест після фільтрації, розділ 5.2.2), а аліквота *B-04* (100 см<sup>3</sup>) підлягає подальшій твердофазній екстракції на картриджі C<sub>18</sub> (розділ 5.2.5).

Аліквота *B-05* (100 см<sup>3</sup>) піддається аерації (розділ 5.2.3), рН аліквоти *B-06* (100 см<sup>3</sup>) доводять до величини 6 од. за допомогою додавання хлоридної кислоти (розділ 5.2.4).

З наступної частини проби об'ємом 200 см<sup>3</sup> готують дві аліквоти рівного об'єму (100 см<sup>3</sup>), куди додають стоковий розчин ЕДТА-Na<sub>2</sub> (*R-EDT*) до досягнення концентрації 100 мг/дм<sup>3</sup> (аліквота *B-07-1*) та 200 мг/дм<sup>3</sup> (аліквота *B-07-2*), див. розділ 5.2.7. Аліквоту *B-08* (100 см<sup>3</sup>) готують шляхом струшування з дрібнозернистим цеолітом (*R-Ceo*).

Усі маніпуляції із аліквотами зразка (або їх частинами) виконують у першу добу випробувань, після постановки початкового тесту на токсичність.

### **Пробопідготовка донних відкладів.**

При надходженні зразка ДВ (або під час відбору, якщо він здійснюється Оператором) візуально оцінюють його гранулометричний склад (відносна частка піску, мулу, глини), а також реєструють колір і запах. За потреби відібрані ДВ можуть зберігатися за температури 4 °С протягом двох тижнів. Заморожувати проби донних відкладів не рекомендується. Важливо отримати об'єм водних витяжок, достатню для проведення усіх передбачених маніпуляцій та тестів.

Перед приготуванням водних витяжок донні відклади ретельно перемішують, видаляють каміння, рештки рослинних організмів, мушлі моллюсків тощо, перетирають крізь металеве сито з вічком 1 мм для запобігання потрапляння великих мінеральних часток і живих організмів (ДСТУ ISO 5667-12-2001).

Водні витяжки ДВ готують у співвідношенні 1 частина сухої ваги ДВ до 4 частин води, тому спочатку визначають вологість ДВ. Для цього невелику порцію ДВ (приблизно 50 г) переносять у попередньо зважену чашку Петрі діаметром 10 см (*M-Pet10*), зважують (*E-Scs*) і висушують при 80 °С до постійної ваги у сушильній шафі. Визначають відсоток вологості ДВ.

За необхідності виконання експрес-тесту та обґрунтованого припущення про високу токсичність ДВ допустимо не застосовувати висушування. В такому випадку водні витяжки готують у співвідношенні 1 частина вологої ваги ДВ до 3 частин ваги води. Для приготування водних витяжок з розрахунку на кінцевий об'єм близько 1 дм<sup>3</sup> готують три наважки ДВ вагою по 125 г, які переносять у три конічні колби об'ємом 0,5 дм<sup>3</sup> (*M-Col500*). Після цього у колби додають по 375 см<sup>3</sup> води для розбавлення, розміщують у лабораторному орбітальному шейкері (*E-Shr*) і перемішують протягом 1 години. Потім суміші дають відстоятися протягом 1 год, надосадовий шар обережно відбирають, переносять у центрифужні пробірки об'ємом 20 см<sup>3</sup> та центрифугують (*E-Cfg*) протягом 15 хв при 3 тис. об./хв. Далі надосадову рідину зливають і використовують для подальших маніпуляцій та тестів.

Отриманий об'єм 1 дм<sup>3</sup> водних витяжок ДВ підлягає такому самому пропорційному (аліквотному) розподілу, як і зразок води, і позначається кодами *D-01–08*. Аліквота *D-03*, що відповідає тесту після фільтрації, не готується.

## 5. ВИКОНАННЯ ПРОЦЕДУР

### 5.1. Перший етап досліджень

Перший етап випробувань розпочинається в першу добу досліджень після надходження проб у лабораторію. Максимальний термін тривалості першого етапу до завершення початкового тесту складатиме 24 год без урахування часу, що витрачається на пробопідготовку. Якщо в результаті проведення цього тесту гостра токсичність зразка буде виявлена через 2, 6 або 12 год, процедура може перейти до другого етапу раніше. Перший етап випробувань включає: пробопідготовку води і приготування водних витяжок ДВ, розділення аліквот, постановку початкового тесту, проведення фізико-хімічних маніпуляцій з аліквотами.

#### 5.1.1. Початковий тест на токсичність

Призначення початкового тесту полягає у встановленні ступеня токсичності проби шляхом визначення медіанного летального розбавлення ( $LP_{50}$ ) з метою підбору концентрації зразка для подальших випробувань на другому етапі досліджень. Початкові тести на токсичність водних витяжок ДВ виконуються за тією ж схемою, що і для зразків води.

Проводять тестування ряду розбавлень, які містять 100, 50, 25 та 12,5 % вихідного зразка. Для цього шляхом послідовного розбавлення/змішування вихідного зразка (аліквота *B-01*) з водою для розбавлення готуються необхідні суміші.

Варіанти розбавлень об'ємом 20 см<sup>3</sup> наливають у чашки Петрі (*M-Pet*). Дослідні варіанти: 100, 50, 25, 12,5 % вихідного зразка та контроль (вода для розбавлення) у двох повторностях розміщують в експериментальній камері кліматостата (*E-UT*). У чашки Петрі за допомогою пластикових піпеток вносять по 6 тест-організмів (дафній, амфіпод), після чого за допомогою програми керування мінікомп'ютера запускають сценарій I (розділ 3.2).

#### ***Інтерпретація результатів***

Експрес-реакції тест-організмів у поведінкових тестах дозволяють дослідити відмінності між різними розбавленнями вихідного зразка *B-01* та спостерігати динаміку змін їх рухової активності в часі, прояви повного знерухомлення, іммобілізації та загибелі.

## 1 етап

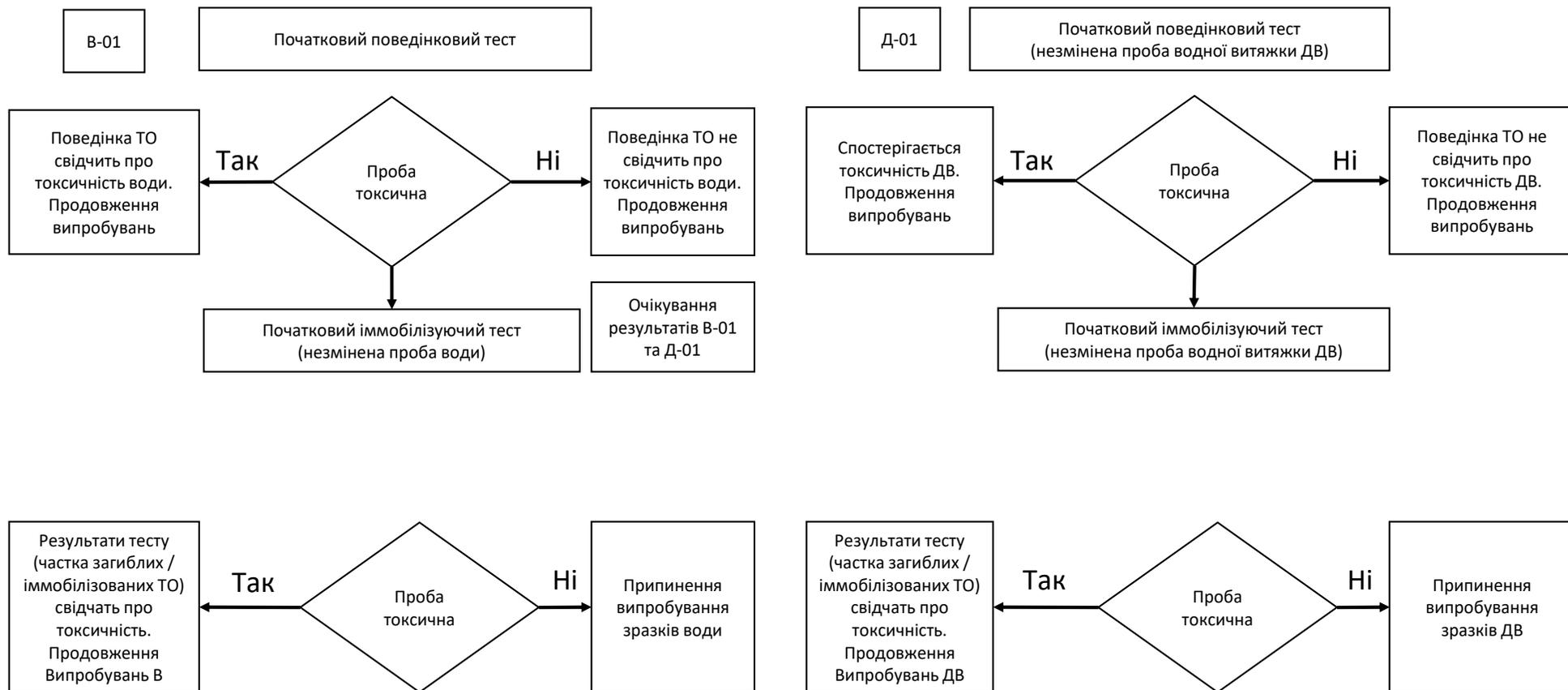


Рисунок 5.1 – Алгоритм визначення токсичності води та донних відкладів (початкові тести)

Система керування автоматично реєструє і здійснює попередній аналіз рухової активності тест-організмів на 2, 6, 12 та 24 годині тесту. В залежності від отриманих результатів Оператор обирає подальший алгоритм дій (табл. 5.1, рис. 5.1).

Таблиця 5.1 – Інтерпретація результатів початкових тестів різної тривалості

Результат	Порядок дій
у 12-годинному тесті спостерігається іммобілізація більше 50 % тест-організмів у варіанті з найменшим розбавленням вихідного зразка	повторна постановка початкового тесту з розбавленнями 20, 10, 5, 2,5 і 1,25 % вихідного зразка
у 12-годинному тесті спостерігається іммобілізація 75–100 % тест-організмів у варіанті з нерозбавленим вихідним зразком	розраховують медіанну летальну концентрацію ЛК <sub>50</sub> <sup>12</sup> ; подальші випробування здійснюються з аліквотами, розбавленими до 2*ЛК <sub>50</sub> <sup>12</sup> , час експозиції становить 12 год
у 12-годинному тесті спостерігається іммобілізація 50–75 % тест-організмів у варіанті з нерозбавленим вихідним зразком	подальші випробування здійснюються з нерозбавленими аліквотами, час експозиції становить 12 год
у 12-годинному тесті спостерігається іммобілізація менше 50 %	очікуємо результату 24-годинного тесту
у 24-годинному тесті спостерігається іммобілізація 75–100 % тест-організмів у варіанті з нерозбавленим вихідним зразком	розраховують медіанну летальну концентрацію ЛК <sub>50</sub> <sup>24</sup> ; подальші випробування здійснюються з аліквотами, розбавленими до 2*ЛК <sub>50</sub> <sup>24</sup> , час експозиції становить 24 год
у 24-годинному тесті спостерігається іммобілізація 50–75 % тест-організмів у варіанті з нерозбавленим вихідним зразком	подальші випробування здійснюються з нерозбавленими аліквотами, час експозиції становить 24 год
у 24-годинному тесті спостерігається іммобілізація менше 50 % тест-організмів у варіанті з нерозбавленим вихідним зразком	може бути прийняте рішення про припинення випробувань

### **Визначення величини ЛР<sub>50</sub> і розбавлення аліквот**

Величина медіанного летального розбавлення (ЛР<sub>50</sub>) розраховується за результатами проведення початкового тесту з різними концентраціями

вихідного зразка *B-01*. Вона слугує критерієм, за допомогою якого розраховується його розбавлення для проведення тестів другого етапу досліджень. Суть цього підходу полягає в тому, що концентрація аліквоти для проведення базового тесту *B-02* та інших аліквот, з якими проводитимуться маніпуляції (*B-02 – B-08*), не повинна перевищувати подвійну величину медіанного летального розбавлення ( $2 \times \text{ЛР}_{50}$ ).

Це особливо важливо при тестуванні високотоксичних проб, оскільки завеликі концентрації забруднювачів у нерозбавленому зразку можуть перевищувати здатність певних маніпуляцій модифікувати токсичність, що призводитиме до похибок у інтерпретації отриманих результатів.

Визначення величини  $\text{ЛР}_{50}$  можливе за допомогою різних методів, які суттєво відрізняються складністю, точністю і вимогами до підготовки Оператора. Оскільки певні похибки визначення величини  $\text{ЛР}_{50}$  вихідного зразка не є критичними для вибору його розбавлення і успішного виконання подальших досліджень, для її визначення зручно застосовувати графічний метод (рис. 5.2).

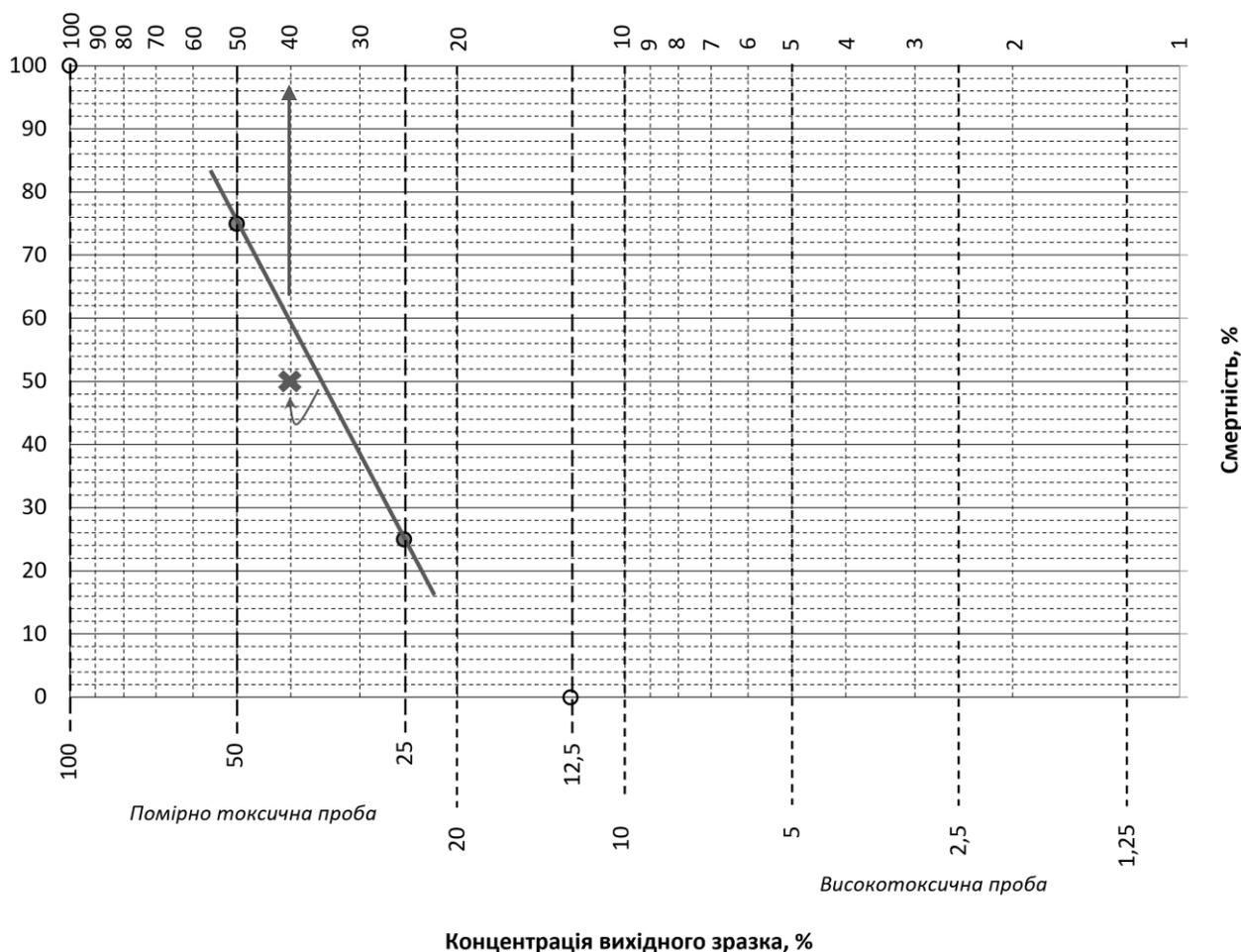


Рисунок 5.2 – Визначення величини  $\text{ЛР}_{50}$  графічним методом

На осі абсцис ( $x$ ) відкладені концентрації вихідного зразка у логарифмічному представленні. Для зручності використання цього шаблону вертикальними лініями позначені концентрації вихідного зразка, які застосовуються у початковому тесті – 100, 50, 25 і 12,5 % (100 % – без додавання води для розбавлення, 12,5 % – до 1 частини вихідної проби додається 7 частин води для розбавлення тощо). Як було зазначено вище, якщо концентрація вихідного зразка 12,5 % призводить до смертності (імобілізації) тест-організмів більше 50 %, використовують нижчий діапазон концентрацій (20, 10, 5, 2,5 та 1,25 %), що також показано на шаблоні.

На осі ординат ( $y$ ) відкладається відсоток загиблих (імобілізованих) організмів. Як показано для гіпотетичного прикладу, який наведено на рис. 5.2, між точками з показниками смертності більше і менше 50 % проводиться пряма лінія, її перетин з горизонтальною лінією на рівні 50 % смертності відповідає величині  $LP_{50}$ . Для зручності її екстраполюють до найближчого округленого значення з більшою концентрацією вихідної проби. У наведеному прикладі це відповідає її концентрації 40 %.

У випадку, якщо в досліді отримано тільки одну концентрацію з перехідною смертністю, використовують точки зі смертністю 100 або 0 % (якщо перехідна величина менше або більше 50 % відповідно).

Шаблони для визначення величини  $LP_{50}$  графічним методом наведені у додатку.

Концентрацію вихідного зразка проби, яка буде використовуватися при проведенні досліджень другого етапу, розраховують за формулою:

$$C_{\text{Вих.зр.}} = 2 * LP_{50},$$

при цьому співвідношення об'ємів вихідного зразка і води для розбавлення становить

$$\frac{V_{\text{Вих.зр.}}}{V_{\text{вода для розб.}}} = \frac{100 - 2 * LP_{50}}{2 * LP_{50}}$$

### 5.1.2. Фізико-хімічні маніпуляції з аліквотами зразка

Описані нижче процедури стосуються як проб води, так і водних витяжок за деякими виключеннями. Перше з них полягає в тому, що фільтрування водних витяжок не проводиться, оскільки попередньо вони підлягають центрифугуванню. Тому відповідна аліквота *Д-03* не готується. По-друге, приготування аліквоти *Д-04*, яке передбачає твердофазну екстракцію на картриджі  $C_{18}$ , проводиться безпосередньо зі зразка після центрифугування.

#### **Фільтрування**

Процедура фільтрування виконується тільки для проб води, її проводять за допомогою вакуумного насоса з системою фільтрації (*E-VPu*) на мембранних фільтрах з діаметром пор 0,45 мкм (*M-MFi*). Для фільтрування проб з підвищеним вмістом завислих речовин можуть знадобитися додаткові фільтри. Ми рекомендуємо використовувати фільтри з регенованої целюлози, оскільки, на відміну від нейлонових та нітроцелюлозних, вони не гелюються і не розчиняються у органічних розчинниках. Це може бути корисним при проведенні подальших досліджень з метою виявлення чинника токсичної дії у випадку, якщо токсичність проби пов'язана з завислими речовинами.

Відфільтровують частину проби води об'ємом 200 см<sup>3</sup>, після чого її розділяють на дві частини об'ємом по 100 см<sup>3</sup> за допомогою мірного циліндра (*M-Cyl100*). Одній з аліквот призначається код *В-03*, її зберігають у холодильнику за необхідності до наступного дня досліджень для проведення тесту на токсичність. Інша аліквота об'ємом 100 см<sup>3</sup> позначається кодом *В-04* і підлягає процедурі твердофазної екстракції на колонці  $C_{18}$  (розділ 5.2.5).

При проведенні фільтрування бажано уникати використання лабораторного посуду з нержавіючої сталі, перевагу слід надавати покриттю з тефлону, пластиковому або скляному посуду.

Паралельно готується холоста проба.

#### **Аерація**

Аліквоту *В-05* (проби води) або *Д-05* (водні витяжки ДВ) об'ємом 100 см<sup>3</sup> переносять в скляний циліндр об'ємом 250 см<sup>3</sup> (*M-Cyl250*). Для аерації використовують аератори регульованої потужності (від 100 до 1000 см<sup>3</sup> повітря/хв) (*E-Aer*). В процесі проведення процедури рівень рН може змінюватися (іноді досить швидко), тому під час аерації необхідно перевіряти рН за допомогою рН метра (*E-pH*) та підтримувати його за допомогою додавання

хлоридної кислоти (*R-HCl-1, R-HCl-0,1*) або гідроксиду натрію (*R-NaOH-1, R-NaOH-0,1*) протягом усього періоду аерації. Чим вищий стовп води і дрібніші бульбашки повітря, тим краще проходить процедура. Пробу рекомендується аерувати помірно (приблизно 500 см<sup>3</sup> повітря/хв) протягом 60 хв. Після проведення процедури пробу зберігають у холодильнику за необхідності.

Перед постановкою дослідів на токсичність на другий день (розділ 5.2.3), після доведення температури 18–22 °С, перевіряють рН і за необхідності, коригують рН.

Паралельно готується холоста проба.

### **Регулювання рН**

Тести з помірним зміщенням величини рН середовища у кислий та лужний бік є потужним інструментом ідентифікації забруднювачів, токсична дія яких модулюється рівнем рН (амоній, сірководень, деякі важкі метали тощо). У зв'язку з тим, що більшість прісноводних зразків води та водних витяжок ДВ характеризуються величиною рН в діапазоні 7,5–8,5 од. (помірно лужне середовище), для проведення процедури ми пропонуємо обмежитися проведенням тестів з підкисленою пробєю. Проте це не виключає постановки тестів із залужненням проби до рН 8,5 (може стосуватися переважно проб води), якщо вихідна величина рН становить близько 7 од.

Для цього величину рН аліквоти *B-06* (проби води) або *D-06* (водні витяжки ДВ) зміщують до  $6,0 \pm 0,05$  од. за допомогою розчинів хлоридної кислоти (*R-HCl-1, R-HCl-0,1*). Після проведення процедури (за необхідності) пробу зберігають у холодильнику (розділ 5.2.4). Після вирівнювання температури до 18–20 °С, перевіряють рН проби за допомогою рН-метра (*E-pH*) і коригують.

У разі доцільності проведення тестів із залужненням проби, готують додаткові аліквоти *B-06-Л* (проби води) та/або *D-06-Л* (водні витяжки ДВ) об'ємом по 100 см<sup>3</sup>, рН яких зміщують до величини рН  $8,50 \pm 0,05$  за допомогою додавання розчину гідроксиду натрію (*R-NaOH-1, R-NaOH-0,1*).

Паралельно готується холоста проба.

### **Твердофазна екстракція на картриджі *C18***

ТФЕ проводиться з застосуванням комерційних картриджів, заповнених октадецилсиланом (*C18*). Рекомендуємо використовувати картриджі об'ємом 3 см<sup>3</sup> (*M-SPE*) для зразка до 100 см<sup>3</sup>. До проб, що виявили високу токсичність за результатами попереднього тесту (розділ 5.1.2) або характеризуються високим

вмістом органічних сполук, бажано використовувати картриджі більшого розміру – 6 см<sup>3</sup>.

Перед використанням октадецилсилан обов'язково ініціюють, послідовно пропускаючи через картридж метанол і дистильовану воду у кількості, що відповідає номінальному об'єму картриджа (див. також рекомендації виробника).

ТФЕ здійснюють на частині аліквоти *B-04* (проби води) та/або *D-04* (водні витяжки ДВ) об'ємом 100 см<sup>3</sup>. В разі необхідності отриманий модифікований зразок залишають в темному прохолодному місці для проведення тестів на другий день випробувань.

Паралельно готується холоста проба.

### **Додавання ЕДТА- $\text{Na}_2$**

Тести з хелатуванням іонів важких металів за допомогою ЕДТА- $\text{Na}_2$  проводяться з використанням двох концентрацій останнього. Для цього використовують дві аліквоти об'ємом 100 см<sup>3</sup> кожна.

До аліквоти *B-07-1* (проби води) та/або *D-07-1* (водні витяжки ДВ) за допомогою скляної мірної піпетки (*M-Glp*) або піпетки-дозатора (*E-Sam*) додають 1 см<sup>3</sup> стокового розчину ЕДТА- $\text{Na}_2$  (*R-EDT*). До аліквоти *B-07-2* та/або *D-07-2* додають 2 см<sup>3</sup> стокового розчину. При цьому в аліквотах, кодованих *07-1* і *07-2*, досягаються концентрації ЕДТА- $\text{Na}_2$  у 100 і 200 мг/дм<sup>3</sup> відповідно.

Проби ретельно перемішують. Після додавання розчину ЕДТА- $\text{Na}_2$  рівень рН може змінитися, тому його перевіряють за допомогою рН метру (*E-pH*) та в разі необхідності повертають до вихідної величини за допомогою додавання хлоридної кислоти (*R-HCl-1*, *R-HCl-0,1*) або гідроксиду натрію (*R-NaOH-1*, *R-NaOH-0,1*).

Комплексоутворення металів з ЕДТА- $\text{Na}_2$  може не відбуватися одразу після додавання ЕДТА- $\text{Na}_2$ . Тому тестові розчини ЕДТА- $\text{Na}_2$  готують першочергово.

Перед постановкою дослідів на токсичність (розділ 5.2.6), після вирівнювання температури до 18–20 °С, перевіряють рН проби за допомогою рН-метра (*E-pH*) і коригують за необхідності.

Ця процедура передбачає тестування «холостої» проби (розділ 5.2.8) з використанням води для розбавлення з додаванням 1 см<sup>3</sup> стокового розчину

ЕДТА- $\text{Na}_2$ . Наш досвід використання ЕДТА свідчить про те, що концентрація  $100 \text{ мг/дм}^3$  не є токсичною для тест-організмів.

### **Додавання цеоліту**

Цеоліт (*R-Ceo*) є природним матеріалом (гідратований алюмосилікатний мінерал, у якому оксид алюмінію та сіліцію утворюють відкриту тривимірну структуру з негативним зарядом). Він виконує роль катіонообмінного матеріалу і має високу спорідненість до йонів амонію. Доступний у вигляді різних комерційних продуктів («SIR-600» – ResinTech Inc., «Clinoptilolite» – Aquatic Eco-Systems) або аналогів, присутніх на ринку України («CaA 0,2–0,4» та ін.). Для використання з цією метою бажана відносно дрібнозерниста форма (0,1–1 мм), що має велику відносну площу поверхні. Важливо попередньо переконатися, що використовуваний засіб з цеолітом у своєму складі не спричиняє токсичний вплив на тест-організми та ефективно адсорбує аміак.

Аліквоти з додаванням цеоліту позначають *B-08* (проби води) та *D-08* (водні витяжки ДВ). На вагах (*E-Scs*) зважують 15 г дрібнозернистого цеоліту (*R-Ceo*). Наважку переносять у конічну плоскодонну колбу місткістю  $200 \text{ см}^3$  (*M-Col*), куди доливають  $100 \text{ см}^3$  відповідної аліквоти. Колбу розміщують в орбітальному шейкері (*E-Shr*) і струшують протягом 1 години. Після цього колбу залишають в темному прохолодному місці, де вона відстоюється до другого дня випробувань. Перед проведенням тестів надосадковий шар обережно переносять у центрифужні пробірки об'ємом  $10\text{--}20 \text{ см}^3$  та центрифугують (*E-Cfg*) протягом 15 хв при 3 тис. об./хв. Далі надосадову рідину зливають і використовують для тестування.

Паралельно готується холоста проба.

### **Приготування «холостих» проб**

Для приготування «холостої» проби (негативний контроль) паралельно виконують таку саму процедуру із використанням середовища для розбавлення. Після проведення відповідних маніпуляцій змінені розчини зберігаються разом з аліквотами зразка з додатковою літерою «X» у маркуванні (наприклад, B-02X, яка відповідає негативному контролю в тесті з фільтруванням).

## 5.2. Другий етап досліджень

Другий етап досліджень ґрунтується на результатах початкового тесту. Експозиція може становити 12 або 24 год в залежності від терміну виявлення гострої токсичності. Тести цього етапу виконуються із незмінним зразком, у випадку якщо проба не демонструє високої токсичності, або із його розбавленням (алгоритм прийняття рішень наведений у табл. 5.1).

Для адекватного порівняння результатів тестів з проведенням маніпуляцій з базовим тестом усі тести на токсичність 2 етапу мають розпочинатися приблизно в один і той же час.

Усім випробуванням другого етапу досліджень передуює визначення в аліквотах вмісту кисню, встановлення рН. У випадку виявлення показників, які відрізняються від оптимальних (зазвичай це 6 мг/дм<sup>3</sup> кисню, рН 7,0–8,5), їх корегують шляхом аерації (*E-Aer*) та додавання розчинів хлорної кислоти або гідроокису натрію (*R-HCl-1*, *R-HCl-0,1*, *R-NaOH-1*, *R-NaOH-0,1*).

### 5.2.1. Базовий тест на токсичність

Цей тест проводять з аліквотою зразка *B-02*, яку розбавляють до необхідної концентрації за результатами початкового тесту (див. 5.1.1). Як було відзначено вище, дослідна концентрація не повинна перевищувати величину  $2 \times \text{ЛР}_{50}$ .

Саме його результати порівнюють з тестами після проведення фізико-хімічних маніпуляцій з іншими аліквотами для виявлення можливого чинника токсичності. Висновок про ефективність тієї чи іншої маніпуляції, спрямованої на зміну токсичності зразка, робиться на підставі виявлення статистично достовірної відмінності у порівнянні з результатами базового тесту. Для цього можна рекомендувати застосування дисперсійного аналізу ANOVA (розділ 6).

Зразок *B-02* наливають у чашки Петрі (*M-Pet5*) у кількості 20 см<sup>3</sup> у двох повторностях та розміщують в них по 6 тест-організмів (дафнії, амфіподи). Дослідні варіанти у двох повторностях розміщують в експериментальній камері кліматостата мінілабораторії (*E-UT*) у відповідних комірках (див. розділ 3.2).

Підтвердження факту зниження токсичності при порівнянні результатів тестів між аліквотами зразка *B-02* (базовий тест) та інших тестів проводять на основі оцінки статистичної достовірності різниці у смертності організмів у порівнюваних вибірках.

Контролем слугують результати тесту з водою для розбавлення. Смертність тест-організмів у контролі вище допустимого рівня (10 %) свідчить про неналежний стан культури або умов експерименту, тому унеможливорює

порівняння результатів тестів, зводячи таким чином нанівець всю роботу, і потребує проведення повторення процедури другого етапу випробувань.

Якщо базовий тест не демонструє токсичності у відповідності до результатів початкового тесту, варто розглянути необхідність повторного відбору зразку і скоригувати процедуру випробувань або припинити подальші випробування.

Інтерпретація. Висновки на підставі проведення базових тестів (рис. 5.3) є основою для порівняння ефективності фізико-хімічних маніпуляцій з аліквотами зразка, які виконувалися на першому етапі випробувань та подальших припущень і висновків щодо можливих чинників токсичності.

Іншою функцією базового тесту є відстеження стабільності токсичності зразка у часі. Зміни базової токсичності можуть вказувати на присутність летючих або нестабільних токсикантів. Готуючи досліджувані розчини для базового тестування на 2-й день важливо звернути увагу на будь-які фізичні зміни у зразку, які відбулись за добу зберігання (утворення осаду, запах тощо).

### **5.2.2. Тест після фільтрації**

Випробування токсичності зразків після проведення фільтрації надає інформацію про наявність токсичних речовин, пов'язаних з зависями. Токсичні забруднювачі, які сорбовані на зважених частках, можуть бути менш біологічно доступними, однак гідробіонти можуть зазнавати впливу цих забруднюючих речовин через аліментарний шлях надходження. Цей шлях впливу може бути значущим для гіллястовусих ракоподібних і інших організмів-фільтраторів, які поглинають мікроводорості, бактеріальні клітини та тверді частинки разом із сорбованими на них токсичними речовинами.

Не проводиться для зразків водних витяжок ДВ.

В дві чашки Петрі діаметром 6 см наливають по 20 см<sup>3</sup> приготовленого розчину, в дослідні варіанти вносять по 6 особин тест-організмів, а чашки Петрі розміщують на робочій поверхні експериментальної камери. Алгоритм прийняття рішень на підставі результатів тесту наводимо нижче (рис. 5.3).

## 2 етап

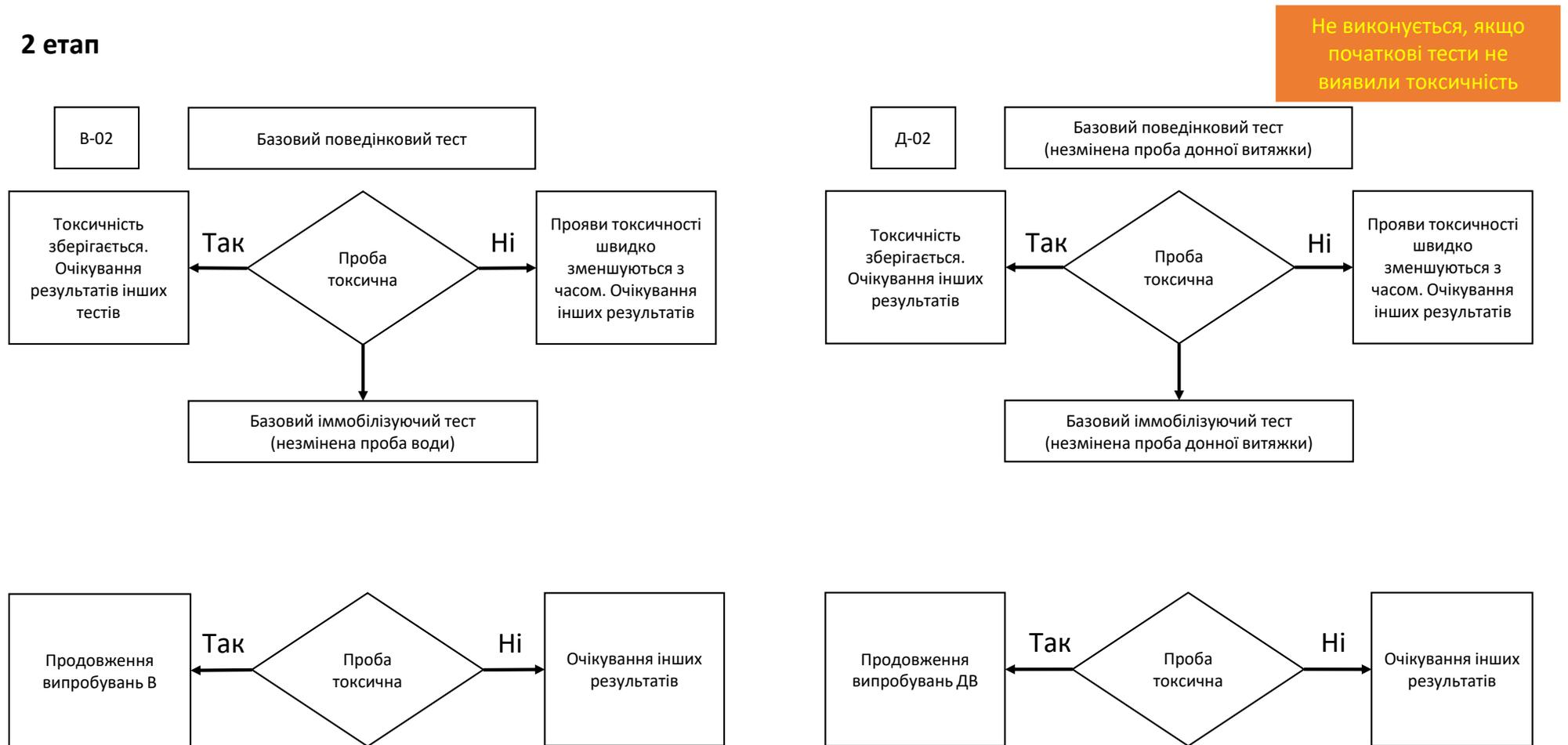


Рисунок 5.3 – Алгоритм визначення токсичності води та донних відкладів (базові тести)

## 2 етап

Не виконується, якщо  
початкові тести не  
виявили токсичність

### Алгоритм визначення токсичності води та донних відкладів (тест після фільтрації)

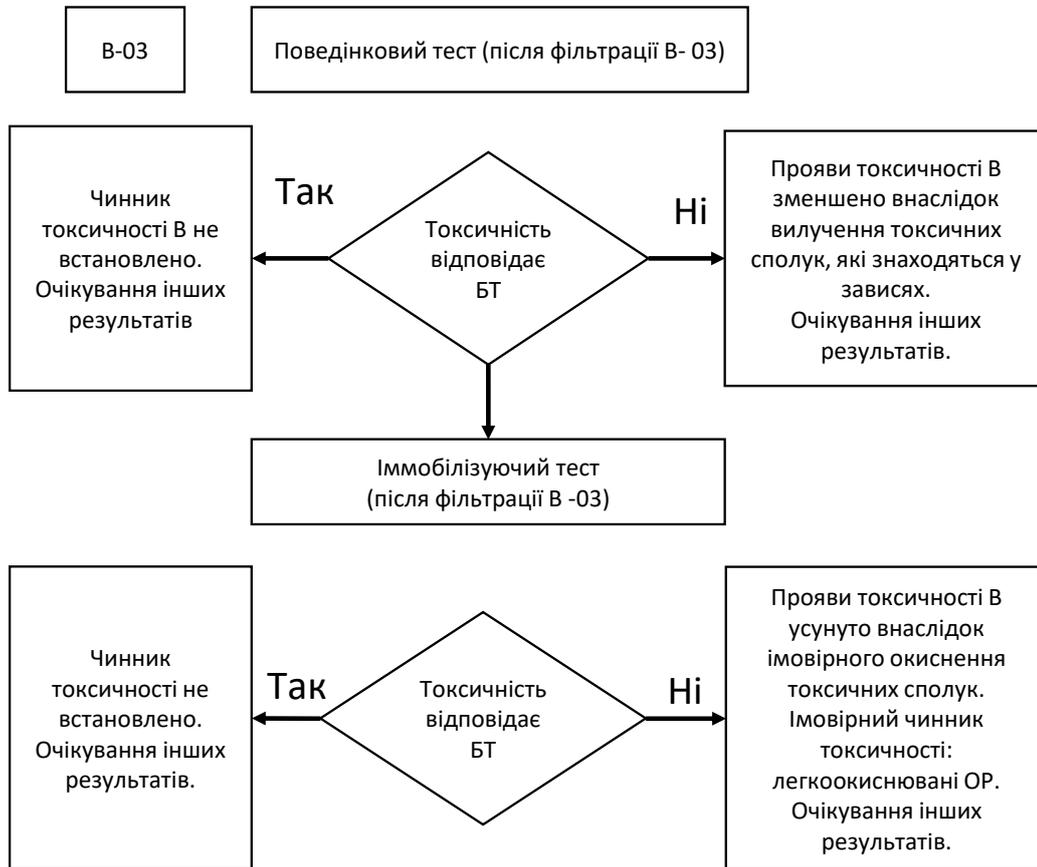


Рисунок 5.4 – Алгоритм визначення токсичності води (тест після фільтрації)

**Інтерпретація.** Відмінності у поведінкових реакціях демонструють експрес-реакції тест-організмів на усунення потенційно токсичних зависей, зміни поведінки протягом 24 год свідчать про існування чинників токсичності не пов'язаних із зависями та доповнюють остаточні результати відповідного летального тесту.

#### 5.2.3. Тест після аерації

Тест з аерацією призначений для перевірки гіпотези про те, що токсичність зразка викликана наявністю у пробі летких та легкоокиснюваних речовин.

В дві чашки Петрі діаметром 6 см наливають по 20 мл приготовленого розчину, куди вносять по 6 особин тест-організмів. Після цього чашки Петрі розміщують на робочій поверхні експериментальної камери.

Алгоритм прийняття рішень на підставі результатів тесту наводимо нижче (рис. 5.5).

Відмінності у поведінкових реакціях демонструють експрес-реакції тест-організмів на усунення токсичності внаслідок імовірного окиснення розчинних токсичних сполук та доповнюють остаточні результати відповідного летального тесту. Зміни поведінки протягом 24 год (6, 12 год) свідчать про існування чинників токсичності, які пов'язані із леткими та легкоокиснюваними речовинами.

#### **5.2.4. Тест після зміни рН**

Величина рН істотно впливає на токсичність багатьох сполук, що потрапляють в оточуюче середовище. Тому коригування рН (у цьому випадку – підкислення до рН 6) використовується, щоб отримати більше інформації про природу токсикантів. Зміни рН можуть впливати на хімічні та фізичні властивості сполук (розчинність, полярність, летючість, хімічну форму та стабільність), тим самим змінюючи їхню біодоступність та токсичність.

Дві групи сполук, на які істотно впливає рН розчину, це речовини з кислотними та оснóвними властивостями. Вплив рН на співвідношення іонізованих і неіонізованих форм кислот і основ може змінювати результати тестів на токсичність, адже сполуки можуть бути більш біодоступними і токсичними в неіонізованій формі порівняно з іонізованою.

Алгоритм прийняття рішень на підставі результатів тесту наведено на рис. 5.6.

Процедура: частина аліквоти В-05 (100 см<sup>3</sup>) за потреби розбавляється до відповідної концентрації, рН зразка перевіряють і за необхідності – знову корегують до величини рН 6. В дві чашки Петрі діаметром 6 см наливають по 20 см<sup>3</sup> приготовленого розчину, вносять по 6 тест-організмів, чашки Петрі розміщують на робочій поверхні експериментальної камери.

2 етап

Алгоритм визначення токсичності води та донних відкладів  
(тест після аерації)

Не виконується, якщо початкові тести не виявили токсичність

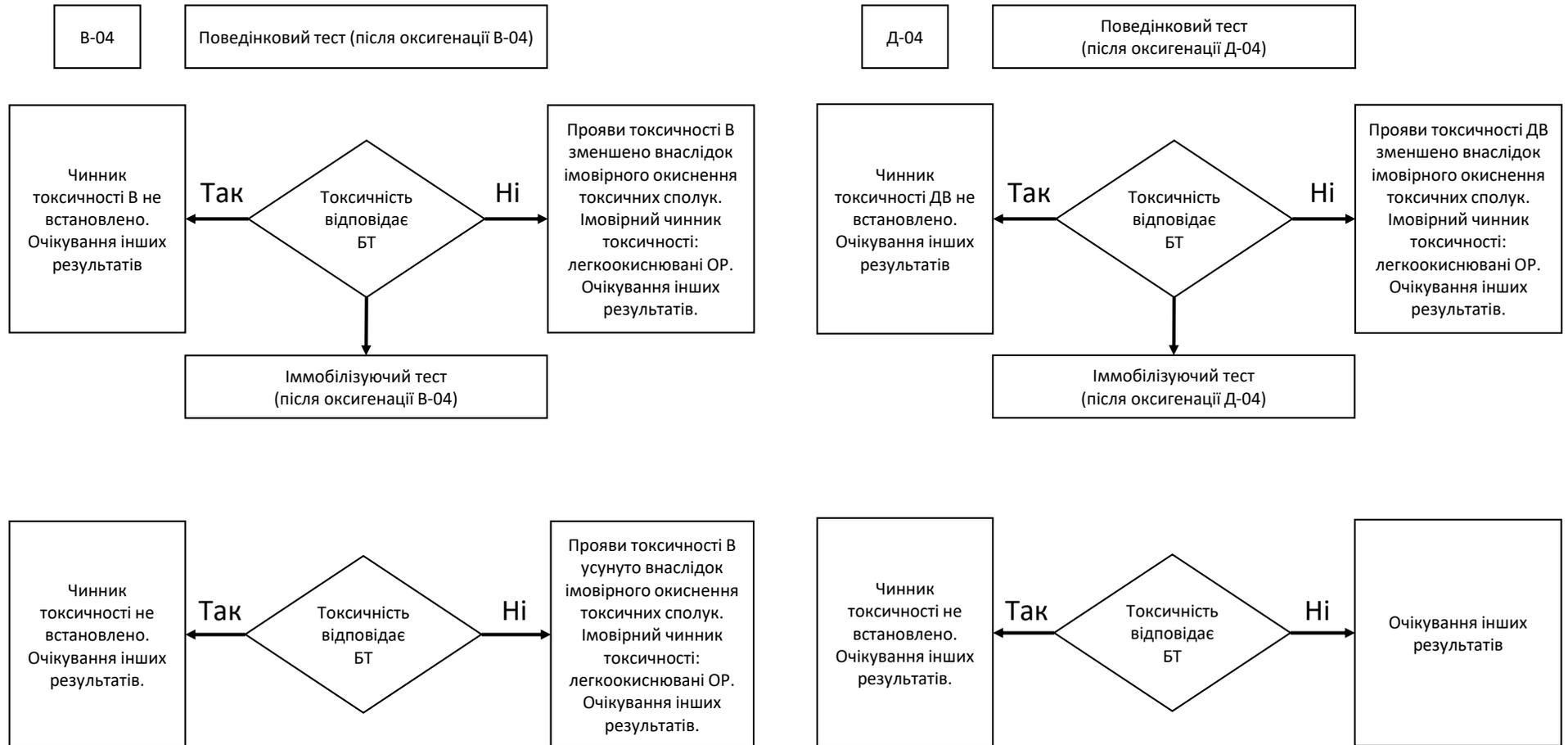


Рисунок 5.5 – Алгоритм визначення токсичності води та донних відкладів (тест після аерації)

2 етап

Алгоритм визначення токсичності води та донних відкладів  
(при рН 6)

Не виконується, якщо початкові тести не виявили токсичність

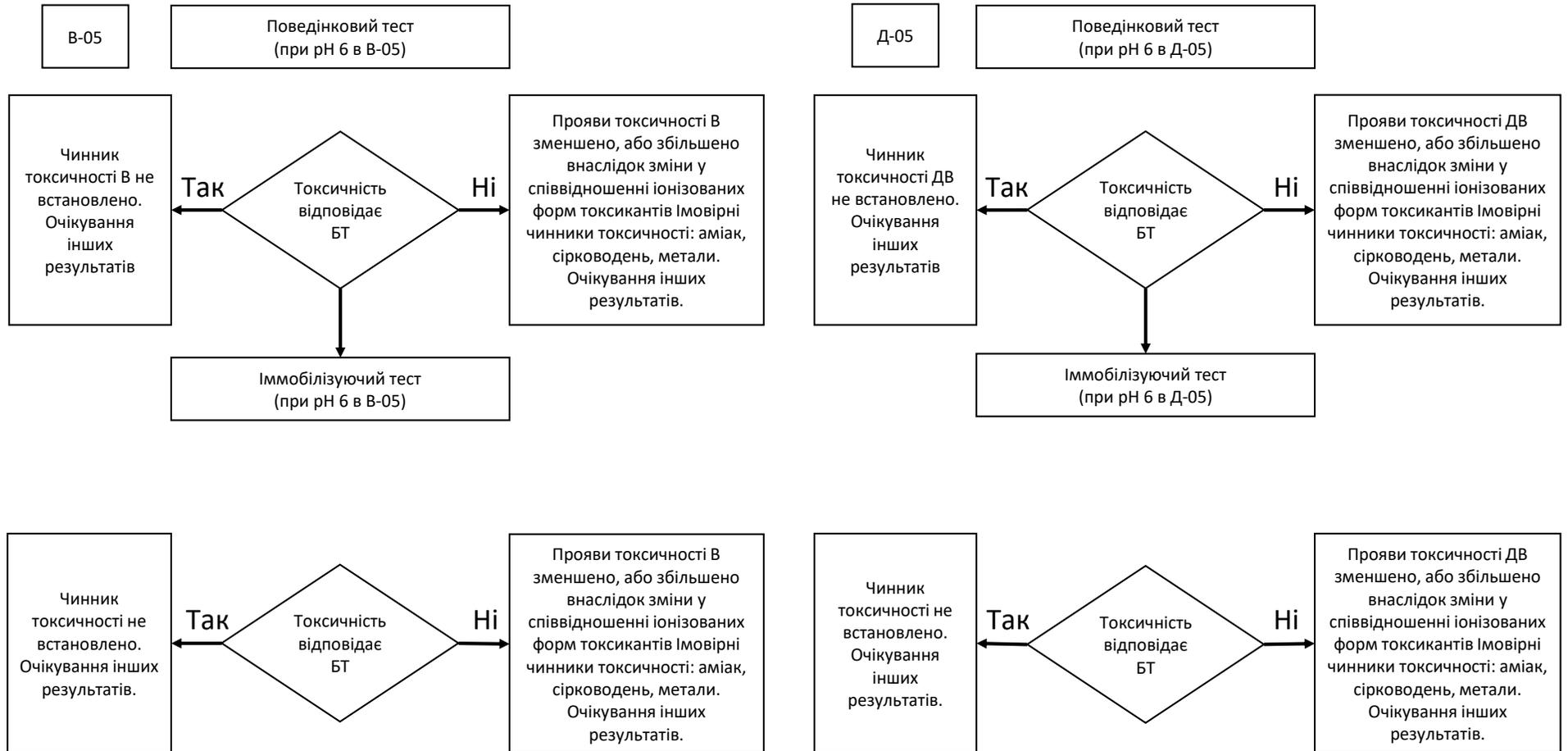


Рисунок 5.6 – Алгоритм визначення токсичності води та донних відкладів (тест після зміни рН)

Зміна рН до 6 є тестом, де допускається зростання токсичності дослідного варіанту у порівнянні з базовим тестом. Зниження, або зростання показників, що свідчать про токсичність зразка та дають проміжну інформацію щодо можливого чинника токсичності.

Можна припустити, що якщо підкислення знижує токсичність зразка, вона пов'язана зі сполуками, які переходять в іонну форму при підкисленні (наприклад, аміак), оскільки мають лужну природу. У зворотному випадку, якщо спостерігається зростання токсичності, можна припустити наявність катіонів металів, сірководню.

Інтерпретація результатів цього тесту повинна враховувати також аналіз змін токсичності при проведенні тестів з додаванням ЕДТА та цеоліту.

Відмінності у поведінкових реакціях демонструють експрес-реакції тест-організмів на зміни токсичності внаслідок фізико-хімічних трансформацій токсикантів при зміні рН до 6 та доповнюють остаточні результати відповідного летального тесту. Зміни поведінки тест-організмів протягом 6 або 12 год експозиції при збереженні величини рН свідчать про існування інших (не рН-залежних) чинників токсичності.

#### **5.2.5. Тест після ТФЕ на $C_{18}$**

Твердофазна екстракція зі зворотною фазою призначена для встановлення токсичності зразка, спричиненої присутністю переважно неполярних сполук (органічні сполуки, хелати металів). Досліджуваний зразок проходить через наповнену сорбентом колонку, при цьому сполуки у зразку взаємодіють із сорбентом і екстрагуються. ТФЕ здійснюють на аліквоті *B-04*, яку відфільтровують раніше.

Процедура: в дві чашки Петрі діаметром 6 см наливають по 20 см<sup>3</sup> приготовленого розчину, в дослідні варіанти вносять по 6 тест-організмів, чашки Петрі розміщують на робочій поверхні експериментальної камери.

Алгоритм висновків на підставі результатів тесту наведено на рис. 5.7.

2 етап

Алгоритм визначення токсичності води та донних відкладів  
(тест після ТФЕ С18)

Не виконується, якщо початкові тести не виявили токсичність

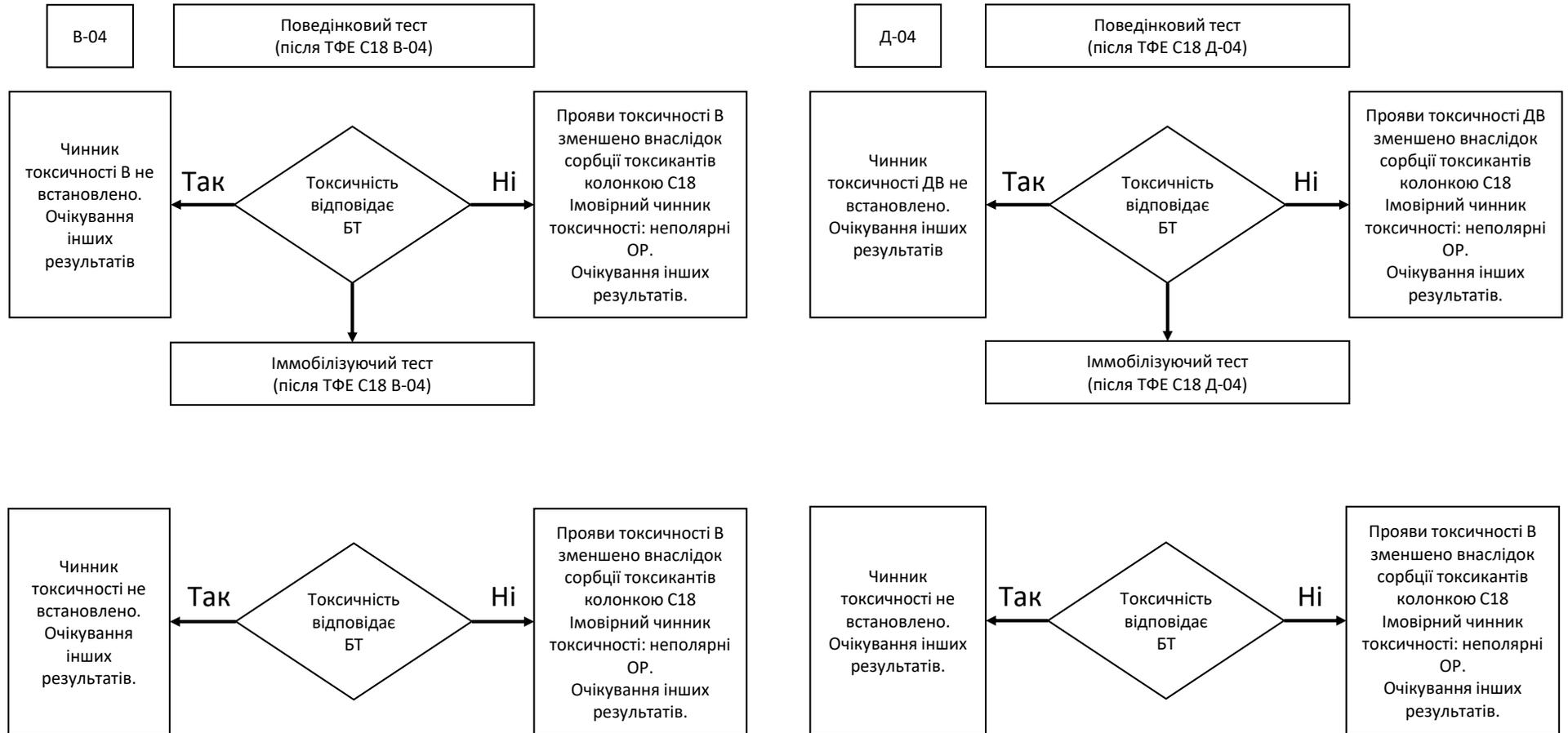


Рисунок 5.7 – Алгоритм визначення токсичності води та донних відкладів (тест після ТФЕ С18)

2 етап

Алгоритм визначення токсичності води та донних відкладів  
(тест після додавання ЕДТА)

Не виконується, якщо початкові тести не виявили токсичність

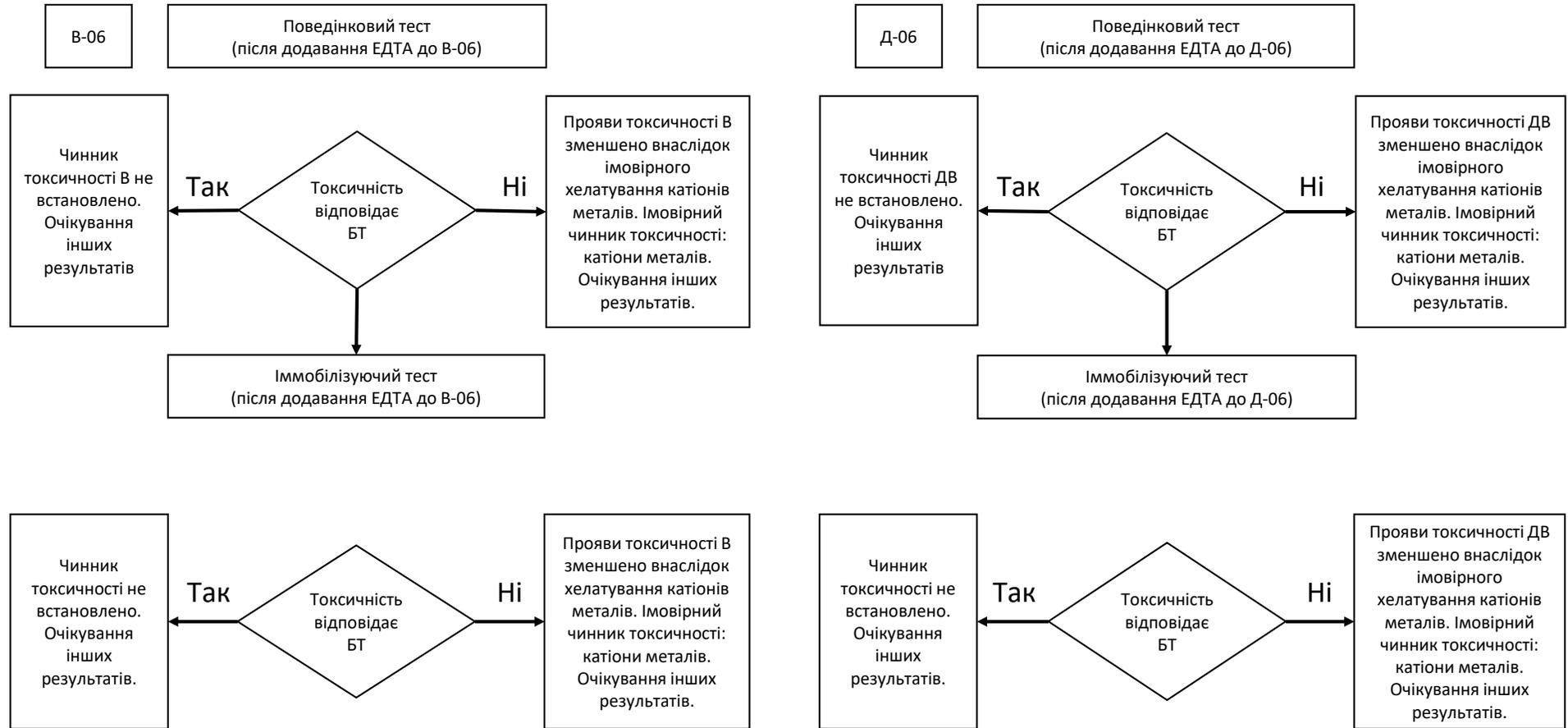


Рисунок 5.8 – Алгоритм визначення токсичності води та донних відкладів (тест після додавання ЕДТА)

Відмінності у поведінкових реакціях демонструють експрес-реакції тест-організмів на усунення токсичності внаслідок імовірного сорбування колонкою  $C_{18}$  неполярних токсичних сполук (наприклад, неполярні органічні речовини) та доповнюють остаточні результати відповідного летального тесту. Зміни поведінки протягом 6 та 12 год свідчать про існування чинників токсичності не пов'язаних із речовинами, що сорбуються  $C_{18}$ .

#### **5.2.6. Тест після додавання ЕДТА- $Na_2$**

Метою цього тесту є перевірка гіпотези про те, що токсичність зразка води спричинена певними катіонними металами.

ЕДТА є сильним хелатуючим агентом, його додавання до водних розчинів утворює відносно нетоксичні комплекси з багатьма металами, що знаходяться у катіонній формі. Ефективність ЕДТА у зниженні токсичності металу залежить від рН розчину, інших лігандів присутніх у розчині та ступеня спорідненості ЕДТА з певним металом.

Більшість позитивно заряджених іонів металів взаємодіють з ЕДТА, але двовалентні перехідні метали  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  і  $Mn^{2+}$  мають особливо високу спорідненість.

Процедура: для тесту використовують аліквоти 07-1 та 07-2 (див. розділ 5.1.2). Для кожного варіанту в дві чашки Петрі діаметром 6 см наливають по  $20\text{ см}^3$  приготовленого розчину, вносять по 6 тест-організмів, чашки Петрі розміщують на робочій поверхні експериментальної камери.

Алгоритм висновків на підставі результатів тесту наведено на рис. 5.8.

Відмінності у поведінкових реакціях демонструють експрес-реакції тест-організмів на усунення токсичності внаслідок імовірного хелатування катіонних металів та доповнюють остаточні результати відповідного летального тесту. Зміни поведінки протягом 6 та 12 год свідчать про існування чинників токсичності не пов'язаних із токсикантами, які піддаються хелатуванню. Відмінності між дослідями з різною концентрацією ЕДТА (аліквоти 07-1 та 07-2) дозволяють зробити висновки щодо кількості токсиканту у зразку.

Якщо у зразку з концентрацією ЕДТА  $200\text{ мг/дм}^3$  зареєстрована підвищена смертність тест-організмів, це може свідчити про те, що ЕДТА у пробі не хелатується з жодним агентом. У такому випадку це призводить до прояву власної токсичності цієї речовини для тест-організмів. Проте дослід з цією концентрацією є необхідним, оскільки за меншої концентрації ЕДТА ( $100\text{ мг/дм}^3$ ) вона може бути витрачена на зв'язування йонів кальцію і магнію при підвищеній жорсткості води.

### **5.2.7. Тест після обробки цеолітом**

Зниження токсичності зразків води і водних витяжок ДВ після додавання цеоліту може свідчити про те, що саме аміак є чинником токсичності. Цеоліт, як правило, має більшу спорідненість до йону амонію ( $\text{NH}_4^+$ ), ніж до токсичних катіонних металів.

Процедура: в дві чашки Петрі діаметром 6 см наливають по  $20 \text{ см}^3$  приготовленого розчину вносять по 6 тест-організмів, чашки Петрі розміщують на робочій поверхні експериментальної камери.

Алгоритм висновків на підставі результатів тесту наведено на рис. 5.9.

Відмінності у поведінкових реакціях демонструють експрес-реакції тест-організмів на усунення токсичності внаслідок імовірної сорбції цеолітом аміаку та доповнюють остаточні результати відповідного летального тесту. Зміни поведінки протягом 6 та 12 год свідчать про існування чинників токсичності не пов'язаних із сполуками, які сорбуються цеолітом.

Підтвердженням токсичної дії аміаку може бути зменшення токсичності зразку у варіанті з регулюванням рН до 6 од. та істотне зниження токсичності у порівнянні з варіантом при додаванні ЕДТА.

### **5.3. Випробування водних витяжок донних відкладів**

Оскільки токсичність донних відкладів ми оцінюємо за токсичністю водних витяжок, тобто матрицею оцінювання є вода, процедура загалом відповідає описаній для зразків води. Основні відмінності можуть бути пов'язані із достатністю кількості водних витяжок, які вдасться отримати, та ефективністю екстрагування токсичних сполук водою, яка буде різнитися в залежності від типу та консистенції донних відкладів, а також фізико-хімічних форм та характеристик присутніх в них токсичних агентів.

Ще однією особливістю є заміна фільтрування зразків центрифугуванням, яке осаджуватиме зависі під час приготування водних витяжок протягом першого етапу випробувань.

Оскільки методика комплексної оцінки в першу чергу спрямована на безпечність водокористування, дослідження зразка води є першочерговим.

2 етап

Алгоритм визначення токсичності води та донних відкладів (тест після цеоліту)

Не виконується, якщо початкові тести не виявили токсичність

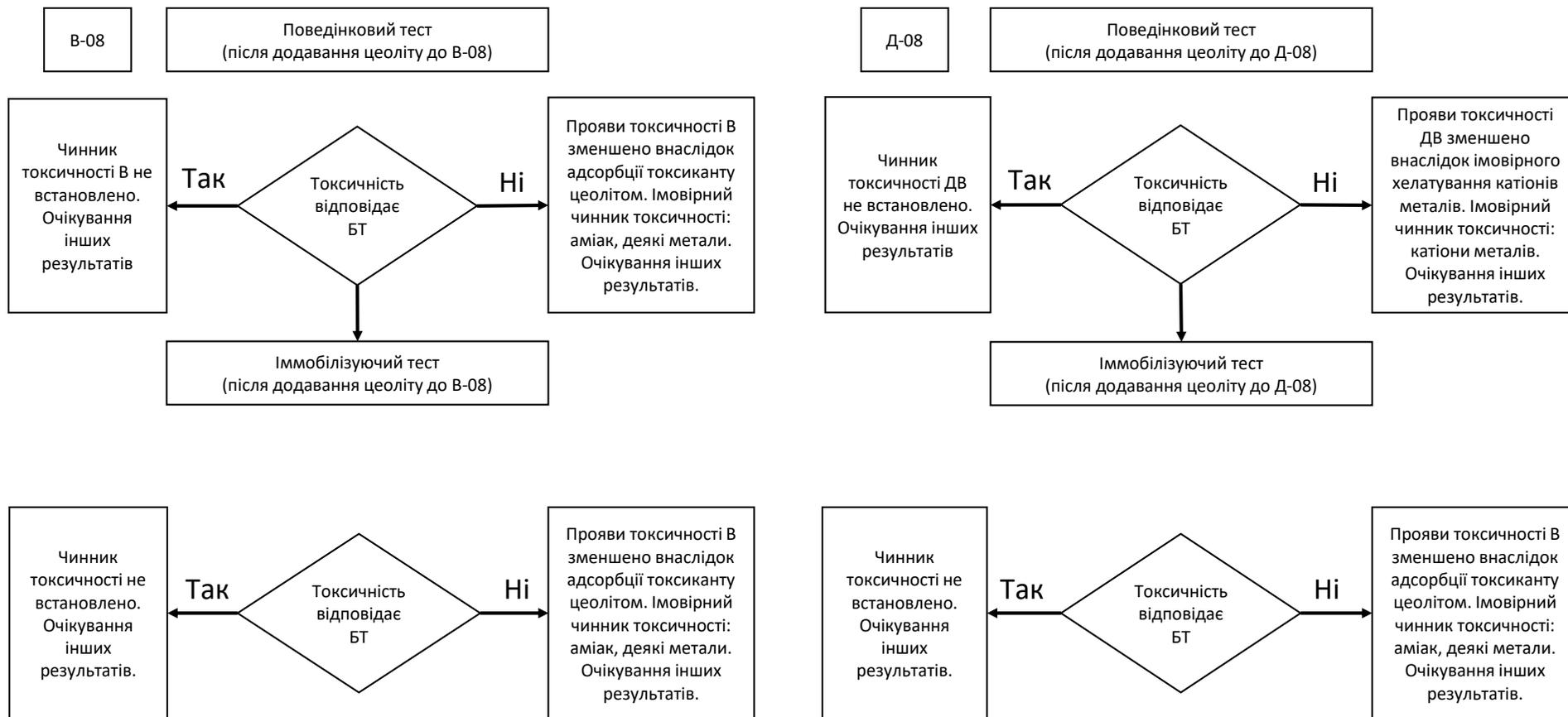


Рисунок 5.9 – Алгоритм визначення токсичності води та донних відкладів (тест після додавання цеоліту)

## 6. ОБРОБКА І ОЦІНЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

### 6.1. Статистичний аналіз результатів

Зручними критеріями оцінки токсичності матриць оточуючого середовища (вихідних та модифікованих) є показники  $LP_{50}$  та  $EK_{50}$ . ЕРА рекомендує для їхнього обрахунку відповідні статистичні підходи (Probit, Spearman-Kärber, Inhibition Concentration ( $IK_p$ , де  $p$  – інгібування у відсотках: смертність, зниження росту тощо)), які в комплексній процедурі оцінки токсичності стосуються розрахунків на першому етапі досліджень: результати початкового тесту на токсичність. Приклад розрахунку  $LP_{50}$  та відповідні методичні підходи описано у підрозділі 5.1.1.

Перетворення результатів точкових оцінок у одиниці токсичності (toxic units (TU): наприклад,  $TU = 100/LK_{50}$  або  $100/IK_p$ ) усуває обернену залежність між токсичністю та значеннями  $LK_{50}$  або  $EK_{50}$ , полегшуючи інтерпретацію ТІЕ (більшими величинам відповідає вища токсичність). Також, якщо відомі концентрації токсикантів для конкретного зразка, TU для окремих токсикантів можна порівняти з загальною величиною TU зразка. Сума TU окремих токсикантів має бути подібною до загальної TU зразка, припускаючи, що всі вони виміряні, біодоступні, та що їх токсичність є сумісною.

Порівняння подальших результатів пропонується проводити шляхом перевірки гіпотези за допомогою дисперсійного аналізу (ANOVA), щоб визначити, чи існують статистичні відмінності між результатами базового тесту та дослідними варіантами.

Існує низка статистичних програм, які виконують дисперсійний аналіз (SPSS, R, Statistica, P.A.S.T та ін.). Доступним (freeware) та зручним (працює з малими вибірками, експортує програмний формат у формати \*.txt, \*.odt, \*.xls) програмним продуктом виявилась JASP: <https://jasp-stats.org/> (Рис. 6.1).

Для проведення дисперсійного аналізу потрібно спочатку створити файл з даними – результатами випробувань (Рис. 6.2).

Перша колонка позначає предиктори (Fixed Factors) – числові еквіваленти варіантів, що порівнюються: 0 – ВТ (базовий тест), 1 – дослідний варіант після фізико-хімічних маніпуляцій. Відповідно до загальної схеми процедури на базовий тест відводиться три повторності, дослідний варіант – дві повторності.

У другу колонку (можлива робоча назва – Lethal N) вносяться дані про кількість тест-організмів які загинули, або втратили рухливість (імобілізовані).

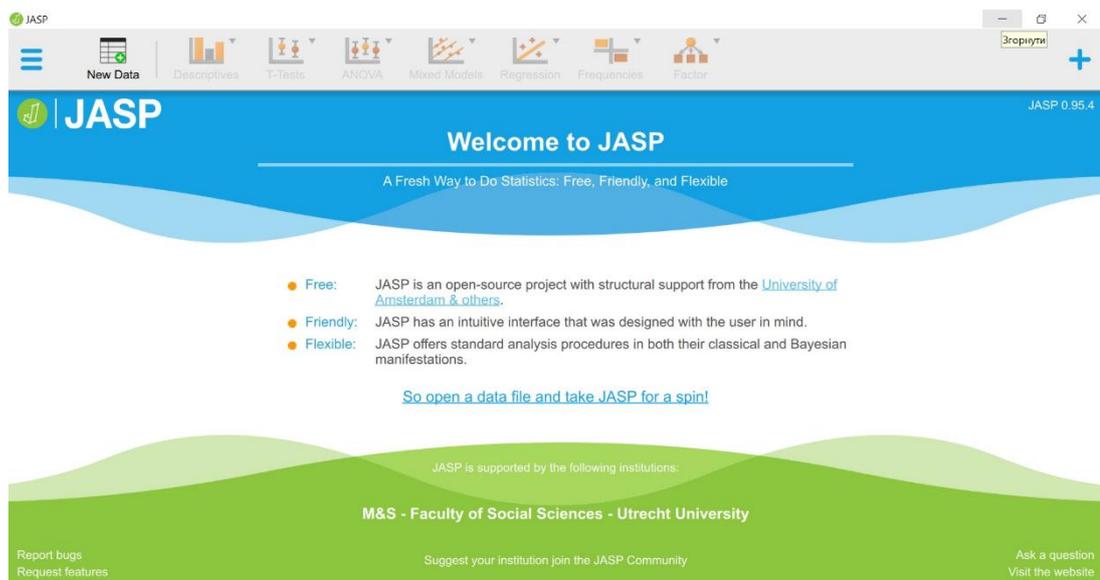


Рисунок 6.1 – Програма JASP перед початком роботи

TrainTemp\* (C:\Users\Laptopchik\Documents\WorkTags\10\_25\_MetGrey\Prylad25\InstR\last\_v\Stat25)

	Analyses	Synchronisation	Resize Data	Insert	Remove	Undo	Redo
	VAR 0-BT, 1 - Test	Lethal N					
1	0	5					
2	0	4					
3	0	5					
4	1	0					
5	1	0					
6							
7							
8							

Рисунок 6.2 – Вигляд файлу з даними – результатами випробувань

Після внесення даних можна розпочинати аналіз – натиснувши відповідну вкладку та обравши варіант ANOVA (Рис. 6.3).

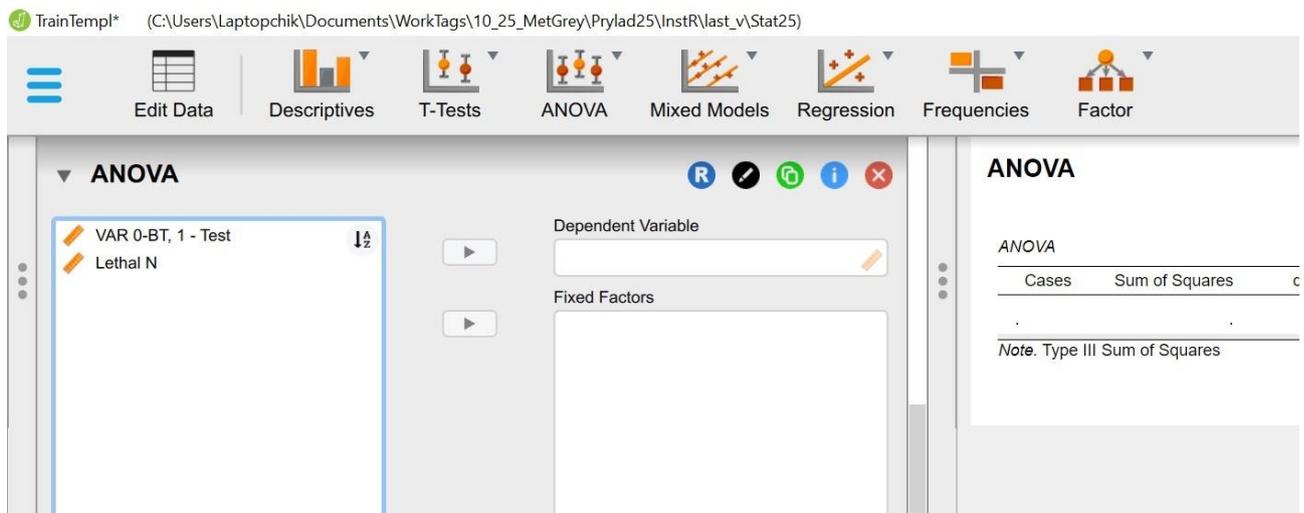


Рисунок 6.3 – Діалогове вікно ANOVA

У функціональну зону потрібно перенести відповідні змінні: Залежна змінна – кількість загинувших тест-організмів (Lethal N); Фіксовані фактори – числові вираження порівнюваних варіантів (VAR 0-BT, 1 – Test).

Після цього програма автоматично обраховує дисперсійний аналіз та у правому вікні наводить його результати. Гіпотеза про існування відмінностей між варіантами (базовий тест, дослідний варіант) вважається підтвердженою у випадку досягнення відповідного рівня достовірності  $p$ . Цей показник не повинен перевищувати величину 0,05 (рис. 6.4).

ANOVA						
ANOVA - Lethal N						
Cases	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p	
VAR 0-BT, 1 - Test	26.133	1	26.133	117.6	.002	
Residuals	0.667	3	0.222			

Note. Type III Sum of Squares

Рисунок 6.4 – Результати дисперсійного аналізу, який показує достовірні відмінності між смертністю тест-організмів у базовому тесті (4–5 особин, 80–100 %) та дослідному варіанті – смертність відсутня

## 6.2. Оцінювання результатів тестів

Після отримання усіх результатів тестів з іммобілізації, вони аналізуються сукупно.

Загальний алгоритм прийняття рішення при визначенні токсичності зразків полягає у порівнянні результатів базового тесту, дослідного варіанту та “холостої” проби – контролю.

Ці порівняння дозволяють зробити висновок щодо присутності феномену токсичності та ефективності певних фізико-хімічних процедур у зміні токсичності зразка, що дає підґрунтя для припущень щодо певних чинників токсичності (рис. 6.5, 6.6).

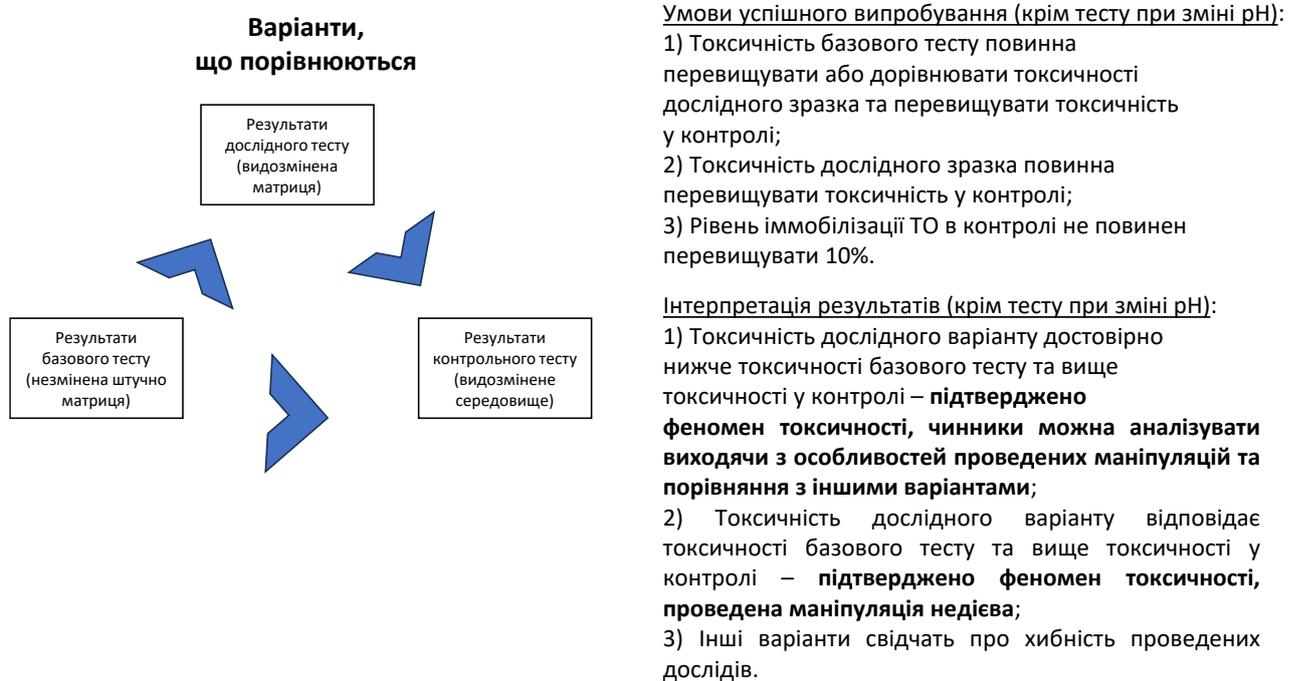


Рисунок 6.5 – Загальний алгоритм прийняття рішення при визначенні токсичності зразків (крім тестів зі зміною рН)



Умови успішного випробування (тести зі зміною рН):

- 1) Токсичність базового тесту може перевищувати (зміна рН знизила токсичність), бути меншою (зміна рН підвищила токсичність) або дорівнювати токсичності дослідного зразка та перевищувати токсичність у контролі;
- 2) Токсичність дослідного зразка повинна перевищувати токсичність у контролі;
- 3) Рівень іммобілізації ТО в контролі не повинен перевищувати 10%.

Інтерпретація результатів (тести зі зміною рН):

- 1) Токсичність дослідного варіанту достовірно відрізняється від токсичності базового тесту та вище токсичності у контролі – **підтверджено феномен токсичності, чинники можна аналізувати виходячи з особливостей поведінки речовин при дослідних змінах рН та порівняння з іншими варіантами;**
- 2) Токсичність дослідного варіанту відповідає токсичності базового тесту та вище токсичності у контролі – **підтверджено феномен токсичності, токсиканти не змінюють свого впливу при зміні рН;**
- 3) Інші варіанти свідчать про хибність проведених дослідів.

Рисунок 6.6 – Загальний алгоритм прийняття рішення при визначенні токсичності зразків (тест зі зміною рН)

Можливі варіанти інтерпретації отриманих результатів і прийняття окремих рішень наведено в таблиці 6.1. Можливі висновки на основі комплексного аналізу наведено в таблиці 6.2.

Таблиця 6.1 – Порівняльний аналіз результатів випробувань

**ЗАГАЛЬНА СХЕМА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА ОЦІНКИ ТОКСИЧНОСТІ ЗА ПРОЦЕДУРОЮ**

Терміни	Процедура	Припущення	Рішення якщо ТАК	Висновок	Рішення якщо Ні	Висновок
Перший етап	Початковий поведінковий тест	Токсичність Відсутність токсичності	Очікування результатів летального тесту	Поведінка ТО свідчить про токсичність	Очікування результатів початкового летального тесту	Поведінка ТО не свідчить про токсичність
Перший етап	Фізико-хімічні маніпуляції	-				
Перший етап	Початковий летальний тест (постановка)	-				
Другий етап	Початковий летальний тест (результати)	Токсичність Відсутність токсичності	Продовження Випробувань – Базовий тест, 6 інших тестів.	Імобілізація/смертність ТО свідчить про токсичність	Припинення випробувань	Імобілізація/смертність не підтверджують токсичність
Другий етап	Базовий поведінковий тест	Токсичність Відсутність токсичності	Очікування результатів базового летального тесту	Поведінка ТО свідчить про токсичність	Очікування результатів інших тестів	Поведінка ТО не свідчить про токсичність
Другий етап	Базовий летальний тест (постановка)	-	-			
Другий етап	6 інших поведінкових тестів	Токсичність зразка нижча ніж в базовому поведінковому тесті	Очікування летальних тестів	Поведінка ТО свідчить про зниження токсичності внаслідок ФХ маніпуляцій	Очікування результатів летальних тестів	Поведінка ТО не свідчить про зниження токсичності внаслідок ФХ маніпуляцій
Другий етап	6 інших летальних тестів (постановка)	-	-			
Другий етап	Базовий летальний тест (результати)	Токсичність Відсутність токсичності	Результати використовують для порівняння з результатами інших тестів	Імобілізація/смертність ТО (понад 50%) свідчить про токсичність	Припинення випробувань	Імобілізація/смертність не підтверджують токсичність

## Продовження таблиці 6.1

Терміни	Процедура	Припущення	Рішення якщо ТАК	Висновок	Рішення якщо Ні	Висновок
Другий етап	Тест після аерування (результати)	Токсичність зразка нижча ніж в базовому летальному тесті	Очікування результатів інших летальних тестів	Аерування знижує токсичність зразка, токсичність зразка викликається легкоокислюваними сполуками	помилка	відсутній
Другий етап	Тест після підкислення до рН 6 (результати)	Токсичність зразка нижча ніж в базовому летальному тесті	Очікування результатів інших летальних тестів	Підкислення знижує токсичність зразка, токсичність зразка пов'язана зі сполуками які іонізуються при підкисленні (наприклад, аміак) / мають лужну природу	Очікування результатів інших летальних тестів	Підкислення підвищує токсичність зразка, токсичність зразка пов'язана зі сполуками які переходять в більш токсичну форму при підкисленні (наприклад, розчинні форми металів та молекулярний сірководень - запах)
Другий етап	Тест після ТФЕ-С18 (результати)	Токсичність зразка нижча ніж в базовому летальному тесті	Очікування результатів інших летальних тестів	Токсичність зразка викликана сполуками, які сорбуються колонкою С-18 (наприклад, неполярні ОР)	помилка	відсутній
Другий етап	Тест після додавання EDTA (результати)	Токсичність зразка нижча ніж в базовому летальному тесті	Очікування результатів інших летальних тестів	Токсичність зразка викликана сполуками, які хелатуються (наприклад, катіонні метали)	помилка	відсутній
Другий етап	Тест після додавання цеоліту (результати)	Токсичність зразка нижча ніж в базовому летальному тесті	Очікування результатів інших летальних тестів	Токсичність зразка викликана сполуками, які адсорбуються цеолітом (наприклад, аміак, деякі метали)	помилка	відсутній

Таблиця 6.2 – Порівняльний аналіз результатів випробувань

**Можливі висновки на основі результатів випробувань**

<b>Випробування</b>	<b>Варіант 1</b>	<b>Варіант 2</b>	<b>Варіант 3</b>	<b>Варіант 4</b>	<b>Варіант 5</b>
Тест після аерування	+	-	-	-	-
Тест після підкислення до рН 6	-	+	Зростання токсичності	Зростання токсичності	-
Тест після ТФЕ-С18	-	-	-	-	+
Тест після додавання EDTA	-	-	+	-	-
Тест після додавання цеоліту	-	+	-/+	-	-
<b>Висновок</b>	<b>Легко-окиснювані ОР</b>	<b>Аміак</b>	<b>Катіонні метали</b>	<b>Сірководень (запах)</b>	<b>Неполярні ОР</b>

Примітка: позитивний результат зниження токсичності позначено +

### 6.3. Наступні етапи досліджень

Дослідження можуть бути продовжені після закінчення першого та другого етапів, які охопили надходження зразка, пробопідготовку, маніпуляції та постановку початкових тестів першого етапу; постановку базового та всіх дослідних тестів другого етапу; реєстрацію результатів випробувань. Як поведінкові так і летальні тести можуть бути продовжені. Для цього можуть бути використана частина проби, зарезервована після її надходження до лабораторії.

Продовження випробувань може бути необхідним для перевірки певних припущень, які виникли на стадії проведення першого і другого етапів. Як керівництво для проведення додаткових маніпуляцій пропонуємо звернутися до рекомендацій, розроблених ЕРА для оцінки та ідентифікації чинників токсичності стічних вод ТІЕ Фаза I (ЕРА 600/6-91-003).

За необхідності можуть бути проведені маніпуляції з фільтрацією після зміни рН зразка води або водних витяжок ДВ в кислий (до 3) та лужний (до 11) бік, аліквоти змінені фільтрацією після змін рН можуть бути пропущені через колонки С18. Більш детально можливі тести описано у відповідних методичних керівництвах.

Необхідною умовою є закладення щодоби нового базового тесту, який виступатиме порівняльним контролем.

## 7. ФУНКЦІОНАЛЬНІ МОЖЛИВОСТІ МІНІЛАБОРАТОРІЇ «УНІТЕСТ-ТОКСІД» У РОЗШИРЕНІЙ КОМПЛЕКТАЦІЇ

Розробка методів ідентифікації чинників токсичності в цільних донних відкладах є відносно новим підходом, спрямованим на встановлення причин негативного впливу донних відкладів на мешканців дна – представників бентосу (Но et al., 2013). Бентосні організми зазнають впливу забруднюючих речовин через поверхневий шар води або порову воду (поглинання розчинених забруднюючих речовин), частинки відкладів (проковтування), та/або поглинання забруднюючих речовин, пов'язаних із харчовими частками та іншими організмами.

Виконання таких тестів потребує більшого часу експозиції тест-організмів та пов'язане з додатковими витратами робочого часу операторів. Проте дозволяє отримати більш релевантні дані стосовно несприятливого впливу ДВ саме на ті організми, які мешкають на поверхні, або у товщі донних відкладів (у процедурі, яка була описана вище це представники амфіпод – *Chetogammarus ischnus* та *Hyaella azteca*). При проведенні тестів з цільними донними відкладами застосовується установка, яка може бути розміщена у кліматостаті – блоці підготовки тест-організмів (рис. 7.1).



Рисунок 7.1 – Експериментальна установка для проведення тестів з цільними донними відкладами

Пробу ДВ ретельно перемішують, видаляючи рештки організмів та сміття, потім необхідну наважку перетирають на металевому ситі з вічком не більше 1 мм для уникнення потрапляння живих організмів в тест-системи (див. розділ 4). При проведенні дослідів з цільними ДВ бажано встановити такі показники, як рН, вміст амонію у поровій воді, вміст загального органічного вуглецю, гранулометричний склад (відсоток піску, мулу, глини) та вологість. Підготовка донних відкладів при використанні даного методу не потребує додаткових маніпуляцій (струшування, відстоювання, фільтрації), що може модифікувати токсичну дію.

Рекомендації щодо утримання та перевірки чутливості лабораторних культур *D. magna*, *Ch. ischnus* та *H. azteca*, які рекомендовано для тестування цільних ДВ, докладно представлено у відповідних методичних публікаціях (Методи гідроекологічних досліджень 2006, Методичні рекомендації...2024).

Для випробувань використовують молодь віком 7–14 діб. Рекомендована тривалість гострих експериментів у процедурі випробувань токсичності ДВ складає 10 діб. Хронічні експерименти для цих видів можуть буди продовжені до 40 діб.

За добу до проведення у дослідні камери об'ємом 100 см<sup>3</sup> вносять 20 г підготовлених донних відкладів. На шар донних відкладів, не змучуючи їх, наливають дехлоровану водопровідну воду об'ємом 60 см<sup>3</sup>. Таким чином утворюється тест-система, яка складається з двох фаз. Дослідження виконують за температури 20±2 °С, освітлення 750 лк, співвідношення світло : темрява 16 : 8, кількість повторностей – 5. Для запобігання погіршення гідрохімічних умов необхідна помірна аерація кожної дослідної камери.

Через 24 год, протягом яких тест-система стабілізується, у камери вносять тест-організми – 6 особ. *Ch. ischnus* або *H. azteca* (вік 7–14 діб) і 6 ювенісів *D. magna* (вік 48±4 год). Як корм застосовують Tetramin® в кількості 50 мг для кожної дослідної камери за весь період експерименту, корм розділяють на 10 порцій для щоденного внесення.

Окрім показників гострої та субхронічної токсичної дії, метод дозволяє також в динаміці оцінити процеси переходу токсичних речовин з донних відкладів у водну фазу та навпаки за показниками життєдіяльності тест-організмів, проводити модельні досліди по забрудненню водного середовища і

донних відкладів, а також досліджувати чинники, що можуть впливати на біодоступність та міграцію токсичних речовин (кисневий режим, рН, температура та ін.). Для цільних донних відкладів розроблено систему відповідних фізико-хімічних маніпуляцій, які подібно до методів описаних вище здатні модифікувати токсичність зразка ДВ (ЕРА 600/R-07-080). Пробопідготовка, фізико-хімічні маніпуляції та тести з використанням тест-організмів можуть бути успішно виконані із застосуванням уніфікованої тест-системи у розширеній комплектації.

Таблиця 7.1 – Параметри тест-системи для визначення токсичності донних відкладів

Параметр	Характеристика
Об'єм камери	100 см <sup>3</sup>
Маса донних відкладів	20 г
Об'єм води	60 см <sup>3</sup>
Заміна води	Відсутня
Аерація	Помірна
Харчування	Tetramin <sup>®</sup> 50 мг за весь час експозиції на дослідну камеру
Вид і кількість бентосних тест-організмів	<i>Ch. ischnus</i> або <i>H. azteca</i> , 6 екз.
Вид і кількість планктонних тест-організмів	<i>D. magna</i> , 6 екз.
Тест-критерії	<i>Ch. ischnus</i> , <i>H. azteca</i> – виживання та приріст лінійних розмірів; <i>D. magna</i> – виживання
Тривалість експерименту	10 діб

В експериментальні камери вносять щойно приготовану суміш з перетертих через сито розміром вічок 1 мм зразків ДВ та промитої дистильованою водою певної йонообмінної смоли або змоченого активованого вугілля (20 та 4 г відповідно, що становить 20 % сирої ваги ДВ), табл. 7.2.

В кінці експозиції (10 діб) реєструють виживання амфіпод та приріст лінійних розмірів. Смертність *D. magna* реєструють через 24, 48 та 72 год. Довжина тіла амфіпод вимірюється від основи першої антени до основи третього уроподу уздовж кривої спинної поверхні з точністю  $\pm 0,1$  мм.

Таблиця 7.2 – Схема проведення досліджень по ідентифікації класу забруднюючих речовин у цільних донних відкладах

Назва		Описання
Негативний контроль		умовно чисті природні ДВ
Позитивний контроль		умовно чисті природні ДВ з додаванням модельного токсиканта
Немодифіковані ДВ		проби забруднених природних ДВ без домішок
Тип домішки	Resin Tech SIR-300	додавання катіонної іонообмінної смоли для зв'язування іонів перехідних (у тому числі важких) металів
	Resin Tech SIR-600	додавання катіонної іонообмінної смоли для зв'язування іонів амонію
	ResinTech SIR-700	додавання аніонної іонообмінної смоли для зв'язування хроматів та біхроматів
	Resin Tech ASM-10-HP	додавання аніонної іонообмінної смоли для зв'язування арсенатів
	Calgon Coconut Charcoal (CCCh)	додавання активованого вугілля для зв'язування органічних забруднювачів

Як контроль для порівняння в експериментах застосовують референтні (умовно чисті) донні відклади та «холості» контролю (референтні ДВ після відповідних маніпуляцій). Виживання тест-організмів в референтних донних відкладах має становити не менше 80 % для амфіпод та 90 % для дафній, що відповідає нормативним вимогам (ISO 16303:2013).

## ДОДАТКИ

Наведені нижче форми не є ustalеними, а лише можуть бути рекомендованими до використання. Важливо, щоб Оператор в зрозумілій формі описував ключові показники, які характеризують пробу, зразок, результати тесту. Ведення протоколів слугує підставою для незалежної верифікації та аудиту елементів описаної процедури, що є критично важливим для забезпечення об'єктивності оцінки кінцевих результатів та достовірності висновків. Основою для пропонованих шаблонів є адаптовані напрацювання ЕРА 600/6-91-003.

### Додаток 1. Шаблони тестів.

#### 1) Шаблон контролю проведення початкового тесту

Назва тесту: <u>Початковий тест</u> Початок тесту (дата та час) _____  Оператор (ПІБ) _____ Маркування зразка _____ Дата відбору зразка _____	Тест-організм, вік _____ К-ть особин у варіанті / к-ть повт. _____  Джерело ТО (культура) _____ Вода для розведення/контроль _____ Тестовий об'єм _____ Інша інф. _____
--	---

Концентрація (% розбавлення зразка)	Показники смертності/імобілізації							
	2 год		6 год		12 год		24 год	
	<b>А</b>	<b>Б</b>	<b>А</b>	<b>Б</b>	<b>А</b>	<b>Б</b>	<b>А</b>	<b>Б</b>
100								
50								
25								
12,5								
Контроль								
ЛР <sub>50</sub> *	ЛР <sub>50</sub> ____	ЛР <sub>50</sub> ____	ЛР <sub>50</sub> ____	ЛР <sub>50</sub> ____	ЛР <sub>50</sub> ____	ЛР <sub>50</sub> ____	ЛР <sub>50</sub> ____	ЛР <sub>50</sub> ____
Межі інтервалу (МІ)**	МІ____	МІ____	МІ____	МІ____	МІ____	МІ____	МІ____	МІ____

Примітки:

\* – зазначають варіант, в якому вперше спостерігається імобілізація більш ніж 50 % тест-організмів;

\*\* – зазначають інтервал розведень, де спостерігається імобілізація більш ніж 50 % тест-організмів.

Коментарі:

---



---

## 2) Шаблон контролю проведення базового тесту

Назва тесту: <u>Базовий тест</u> Початок тесту (дата та час) _____ Оператор (ПІБ) _____ Маркування зразка _____ Дата відбору зразка _____ рН _____ вміст кисню _____	Тест-організм, вік _____ К-ть особин у варіанті / к-ть повт. _____ Джерело ТО (культура) _____ Вода для розведення/контроль _____ Тестовий об'єм _____ Інша інф. _____
---	---

Концентрація (розбавлення зразка)	Показники смертності/імобілізації											
	2 год			6 год			12 год			24 год		
	А	Б	В	А	Б	В	А	Б	В	А	Б	В
100 %												
2 x ЛР <sub>50</sub>												
Контроль												
ЛР <sub>50</sub> *												

Примітки:

\* – зазначають варіант, в якому вперше спостерігається імобілізація більш ніж 50 % тест-організмів.

Коментарі:

---



---



---

### 3) Шаблон контролю проведення тесту після регулювання рН

Назва тесту: <u>регулювання рН</u> Початок тесту (дата та час) _____	Тест-організм, вік _____ К-ть особин у варіанті / к-ть повт. _____
Оператор (ПІБ) _____ Маркування зразка _____ Дата відбору зразка _____ рН _____ вміст кисню _____	Джерело ТО (культура) _____ Вода для розведення/контроль _____ Тестовий об'єм _____ Інша інф. _____

рН / концентрація (ступінь розбавлення зразка)	Показники смертності/імобілізації							
	2 год		6 год		12 год		24 год	
	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б
6 / 100 %								
6 / 2 x ЛР <sub>50</sub>								
6 / «Холоста»								
_ / 100 %								
_ / 2 x ЛР <sub>50</sub>								
_ / «Холоста»								
ЛР <sub>50</sub> *								

Примітки:

\* – зазначають варіант, в якому вперше спостерігається імобілізація більш ніж 50 % тест-організмів.

	Об'єм розчинів, що додавались	
	НСІ	NaOH
100 мл рН 6		
100 мл рН _____		
5 мл рН 6		
5 мл рН _____		

Коментарі:

---



---



---

4) Шаблон контролю проведення тесту після фільтрації (та інших варіантів крім додавання ЕДТА)

Назва тесту: <u>Фільтрація</u> Початок тесту (дата та час) _____ _____ Оператор (ПІБ) _____ Маркування зразка _____ Дата відбору зразка _____ рН _____ вміст кисню _____	Тест-організм, вік _____ К-ть особин у варіанті / к-ть повт. _____ _____ Джерело ТО (культура) _____ Вода для розведення/контроль _____ Тестовий об'єм _____ Інша інф. _____
---	--

Концентрація (ступінь розбавлення зразка)	Показники смертності/імобілізації							
	2 год		4 год		12 год		24 год	
	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б
100 %								
2 x ЛР <sub>50</sub>								
«Холоста»								
ЛР <sub>50</sub> *								

Примітки:

\* – зазначають варіант, в якому вперше спостерігається імобілізація більш ніж 50 % тест-організмів.

Коментарі:

---



---



---

## 5) Шаблон контролю проведення тесту після додавання ЕДТА

Назва тесту: <u>додавання ЕДТА</u> Початок тесту (дата та час) _____  Оператор (ПІБ) _____ Маркування зразка _____ Дата відбору зразка _____ рН _____ вміст кисню _____	Тест-організм, вік _____ К-ть особин у варіанті / к-ть повт. _____  Джерело ТО (культура) _____ Вода для розведення/контроль _____ Тестовий об'єм _____ Інша інф. _____
--	---

Концентрація (ступінь розбавлення зразка)	Показники смертності/імобілізації							
	2 год		4 год		12 год		24 год	
	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б
100 % з 100 мг/дм <sup>3</sup> ЕДТА								
100 % з 200 мг/дм <sup>3</sup> ЕДТА								
2 x ЛР <sub>50</sub> з 100 мг/дм <sup>3</sup> ЕДТА								
2 x ЛР <sub>50</sub> з 200 мг/дм <sup>3</sup> ЕДТА								
«Холоста» з 100 мг/дм <sup>3</sup> ЕДТА*								
ЛР <sub>50</sub> **								

Примітки:

\* як контроль використовують контроль базового тесту, «холоста» проба з 100 мг/дм<sup>3</sup> ЕДТА слугує для перевірки якості реагенту і усунення підозр щодо штучної токсичності;

\*\* – зазначають варіант, в якому вперше спостерігається імобілізація більш ніж 50 % тест-організмів.

Коментарі:

---



---



---

б) Шаблон контролю поведінкових (рухових) тестів у початковому тесті

Назва тесту: <u>Початковий тест (тест критерій: пройдений шлях – рухова активність)</u> Початок тесту (дата та час) _____ Оператор (ПІБ) _____ Маркування зразка _____ Дата відбору зразка _____	Тест-організм, вік _____ К-ть особин у варіанті / к-ть повт. _____ Джерело ТО (культура) _____ Вода для розведення/контроль _____ Тестовий об'єм _____ Інша інф. _____
--	---

Концентрація (% розбавлення зразка)	Величина пройденого питомого шляху 1-го тест-організму за контрольний час: 30 с., мм / кількість знерухомлених, особин							
	2 год		6 год		12 год		24 год	
	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б
100	/	/	/	/	/	/	/	/
50	/	/	/	/	/	/	/	/
25	/	/	/	/	/	/	/	/
12,5	/	/	/	/	/	/	/	/
Контроль	/	/	/	/	/	/	/	/

Примітка: істотне зниження величини питомого шляху та/або іммобілізація понад 50 % тест-організмів може бути передумовою своєчасного (раніше ніж через 24 год з початку початкового тесту) початку другого етапу випробувань.

Коментарі:

---

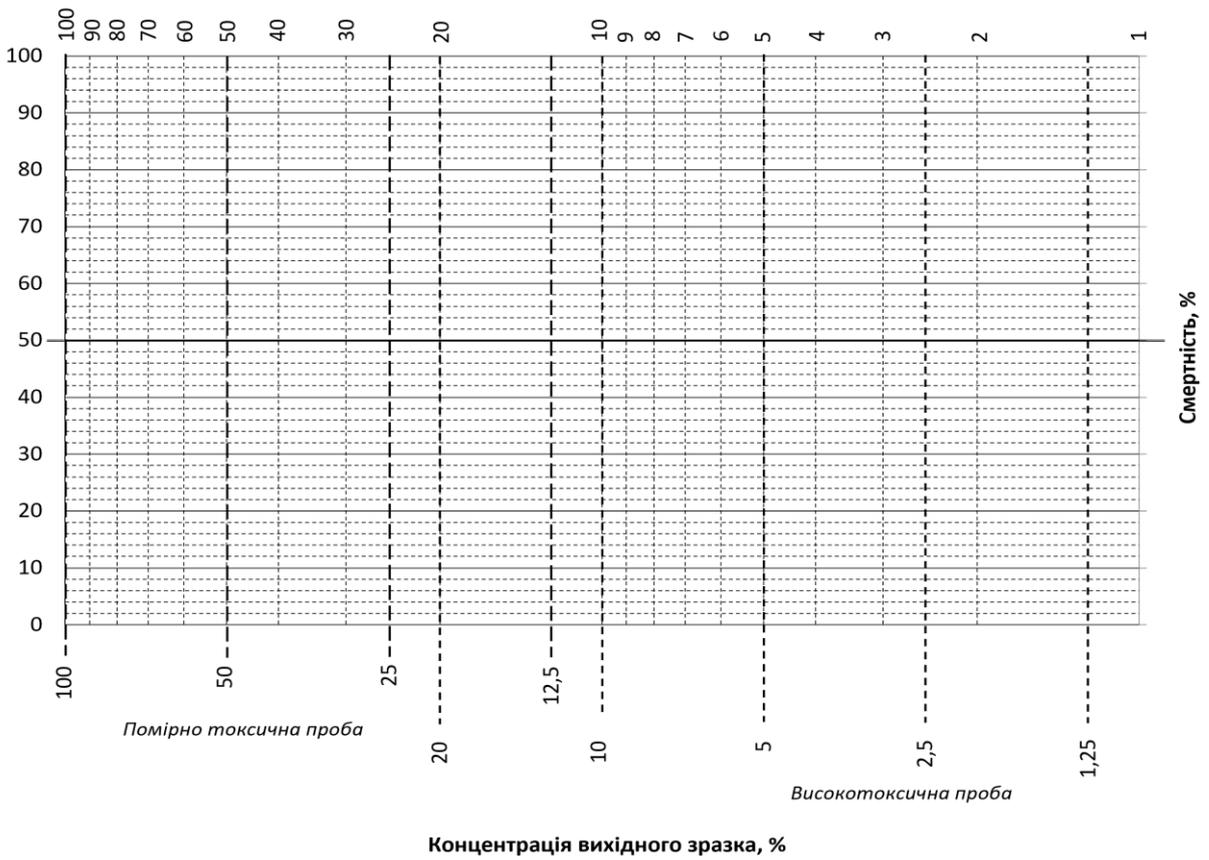
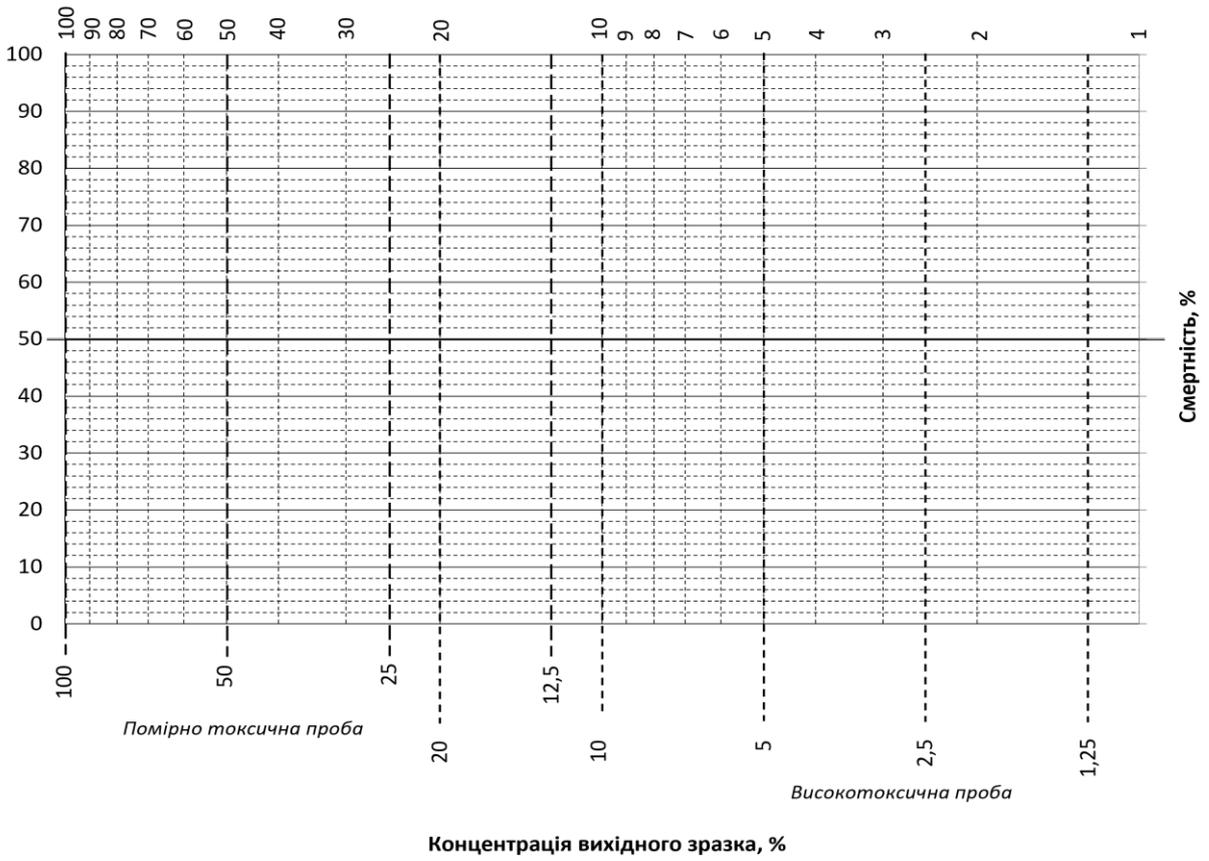


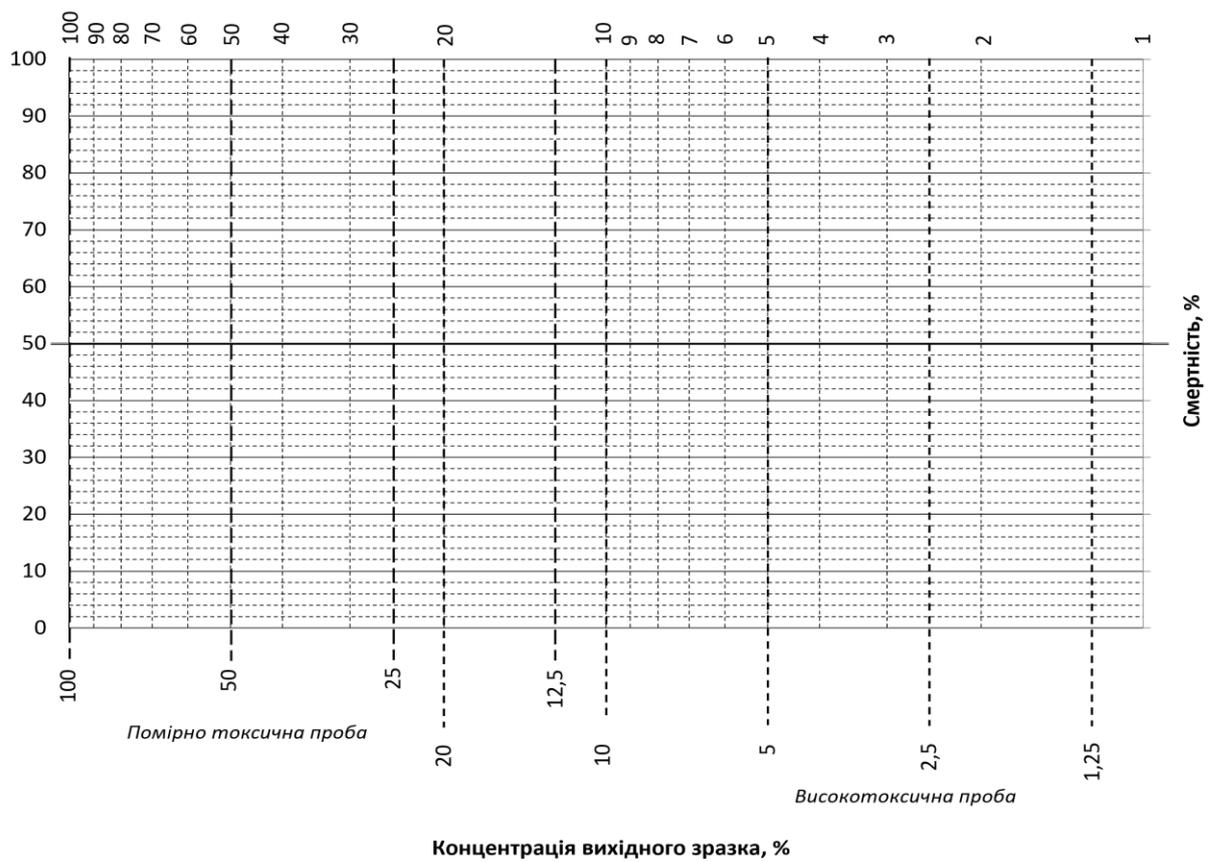
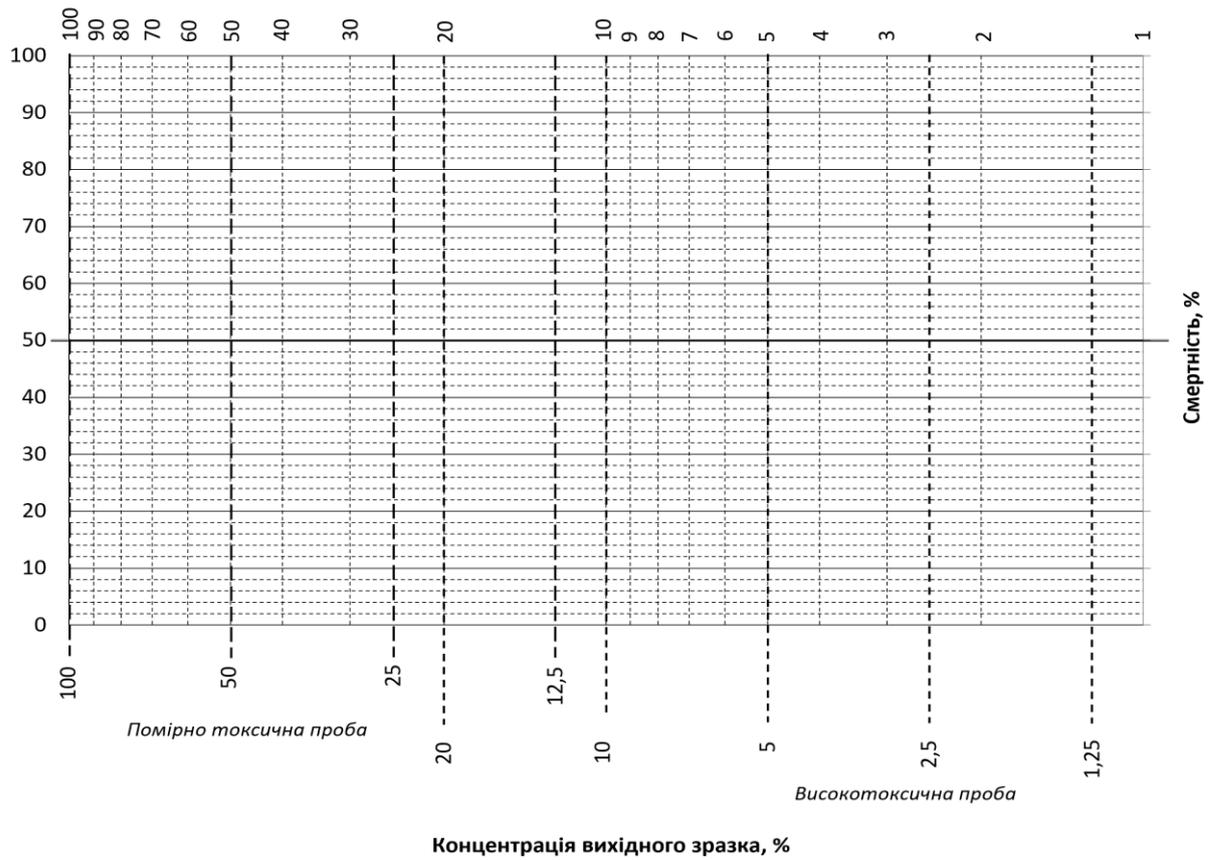
---



---

## Додаток 2. Розрахунки розбавлень





## СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

ДСТУ 4174-2003. Якість води. Визначення сублетальної та хронічної токсичності хімічних речовин та води на *Daphnia magna* Straus і *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (Cladocera, Crustacea) (ISO 1076:2000, MOD).

ДСТУ ISO 5667-12-2001 Якість води. Відбирання проб. Частина 12. Настанови щодо відбирання проб донних відкладів (ISO 5667-12:1995, IDT).

Методичні рекомендації щодо відбору зразків, культивування тест-об'єктів, оцінки токсичності та ідентифікації класу забруднювальних речовин у воді та донних відкладах / Юришинець В.І., Коновець І.М., Кіпніс Л.С., Гончарова М.Т., Леонтєва Т.О., Старосила Є.В., Романенко О.В. – Київ: Інститут гідробіології НАН України, 2024. – 100 с.

Методи гідроекологічних досліджень поверхневих вод / Арсан О.М. та ін.; за ред В.Д. Романенка. Київ: Логос, 2006. 408 с

EPA 600/6-91-003. Methods for aquatic toxicity identification evaluations. Phase I. Toxicity characterization procedures (second edition). 1991. 100 p.

EPA 600/R-07-080. Sediment Toxicity Identification Evaluation (TIE) Phases I, II, and III. Guidance Document. 2007. 145 p.

EPS 1/RM/33. Biological test method – test for survival and growth in sediment and water using the freshwater amphipod *Hyalella azteca*. Second edition. Ottawa. 2013. 184 p.

Burgess R.M., Ho K.T., Tagliabue M.D., et al. Toxicity characterization of an industrial and a municipal effluent discharging to the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* 1995. Vol. 30. P. 524–535.

Burgess R.M., Cantwell M.G., Pelletier M.C., Ho K.T., Serbst J.R., Cook H.F., Kuhn A. Development of a toxicity identification evaluation (TIE) procedure for characterizing metal toxicity in marine sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 2000. Vol. 19, № 4. P. 982–991.

Ho K.T., Burgess R.M. What's causing toxicity in sediments? Results of 20 years of toxicity identification and evaluations. *Environ. Toxicol. Chem.* 2013. Vol. 32, № 11. P. 2424–2432.

ISO 16303:2013. Water quality – Determination of toxicity of freshwater sediments using *Hyalella azteca*.

## SUMMARY

The purpose of the mini-laboratory (unified test system) is biotesting of water and bottom sediments—including those from water supply sources exposed to unpredictable negative impacts such as military activity—enables rapid detection of toxicity and subsequent identification of the most likely toxicant classes responsible for the observed effects. The results can later be integrated into broader systems for comprehensive water quality assessment and analytical detection of toxic substances.

The use of biotesting methods makes it possible to evaluate the combined impact of multiple pollutants based on overall toxicity. The main advantages of this approach include its relative simplicity and accessibility, the high speed of testing, the lack of need for expensive equipment or reagents, and the high sensitivity of appropriately selected test organisms to very low concentrations of toxic agents in aquatic environments.

The informativeness of biotesting can be enhanced by combining toxicity tests with specific sample-processing procedures that reduce the bioavailability of toxic pollutants present in environmental mixtures. This combined approach has proven to be an effective screening method for identifying the primary toxicity factor in aquatic environments.

The Toxicity Identification Evaluation (TIE) method is based on recording the response of test organisms during a sequence of physicochemical manipulations applied to a toxic sample. These manipulations allow the identification of the factor or factors causing toxicity. The approach consists of three phases: **Phase I – Characterization:** determining the physicochemical properties of the toxicity factor; **Phase II – Identification:** analytically determining the substance responsible for the toxicity; **Phase III – Confirmation:** verifying that the identified factor accounts for all observed adverse effects.

As a basic testing scheme, we propose applying Phase I of the TIE procedure to pore waters of freshwater bottom sediments (EPA/600/R-07/080). According to this scheme, both water samples and water extracts of bottom sediments and pore waters are recommended for investigation.

In our view, the toxicity identification procedure can be simplified when toxicity (or its absence) is detected as early as possible. For this purpose, we propose rapid tests that assess the effects of toxicants on the motor activity of aquatic organisms, along with fast instrumental detection of immobilization.

If toxicity is confirmed in the initial test (day 1) and baseline tests (day 2 and thereafter), efforts should focus on identifying the probable factors responsible for

toxicity in water and bottom sediments. It is well established that the predominant toxicants in freshwater ecosystems include non-ionic organic compounds and various forms of metals, particularly metal ions.

The proposed algorithm for the mini-laboratory emphasizes these most likely toxicity factors—while allowing for additional procedures if needed. These factors can be identified by assessing sample toxicity after manipulations such as aeration, filtration, adjusting sample pH to acidic conditions (pH 6), addition of EDTA- $\text{Na}_2$ , solid-phase extraction on octadecylsilane ( $\text{C}_{18}$ ), and addition of zeolite.

## CONTENTS

INTRODUCTION	4
1. GENERAL INFORMATION	5
1.1. List of abbreviations	5
1.2. Terms and definitions	6
1.3. Purpose of the mini-laboratory (unified test system)	9
1.4. General principles of conducting research using the mini-laboratory (algorithm for the procedure for assessing toxicity and identifying the class of pollutants in water and bottom sediments)	9
2. COMPLETENESS OF THE MINI-LABORATORY “UNITEST-TOXID”	12
2.1. Basic equipment	12
2.2. Additional equipment	15
3. PREPARATION OF THE MINI-LABORATORY FOR WORK	16
3.1. Technical requirements for premises and communications.	16
3.2. Preparation and procedure for working with the testing unit of the mini-laboratory "Unitest-Toxid"	16
3.3. Preparation of test organisms	22
3.4. Preparation of water, media, reagents and reagents	23
4. SAMPLE PREPARATION	25
5. PERFORMANCE OF PROCEDURES	28
5.1. The first stage of research	28
5.1.1. Initial toxicity test	28
5.1.2. Physico-chemical manipulations with aliquots of the sample	33
5.2. The second stage of research	37
5.2.1. Basic toxicity test	37
5.2.2. Test after filtration	38
5.2.3. Test after aeration	40
5.2.4. Test after pH change	41
5.2.5. Test after TFE on C <sub>18</sub>	44
5.2.6. Test after adding EDTA-Na <sub>2</sub>	47
5.2.7. Test after treatment with zeolite	48
5.3. Testing of aqueous extracts of bottom sediments	48
6. PROCESSING AND EVALUATION OF RESULTS	50
6.1. Statistical analysis of results	50
6.2. Evaluation of test results	53
6.3. Subsequent stages of research	58
7. FUNCTIONAL CAPABILITIES OF THE MINILABORATORY “UNITEST-TOXID” IN THE EXPANDED COMPLETE	59
APPENDICES	63
LIST OF RECOMMENDED LITERATURE	71

## **ДЛЯ ЗАПИСІВ**



