

**1.2. ГИГИЕНА, ТОКСИКОЛОГИЯ, САНИТАРИЯ**

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ  
ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОМАТЕРИАЛОВ НА  
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ МИКРОБИОЦЕНОЗА**

**Методические указания**

**МУ 1.2.2634-10**

**Москва - 2010**

Микробиологическая и молекулярно-генетическая оценка воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010, – 58 с.

1. Разработаны Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Г.Г.Онищенко), Учреждением Российской академии медицинских наук «Научно-исследовательский институт питания» РАМН (В.А.Тутельян, И.В.Гмошинский, С.А.Хотимченко, С.А.Шевелева, Н.Р.Ефимочкина, И.В.Аксенов, Е.А.Арианова, В.В.Бессонов, В.М.Верников, М.М.Гаппаров, Р.В.Распопов, А.А.Шумакова, В.В.Смирнова, О.Н.Тананова, О.И.Передеряев, Г.Г.Кузнецова, С.Ю.Батищева), ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (И.А.Дятлов, В.П.Холоденко, В.А.Чугунов, Е.Н.Кобзев, И.А.Ирхина, В.Б.Родин, И.И.Мартовецкая, Е.В.Тимошинова, Н.В.Александрова), Учреждением Российской академии медицинских наук «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Почетного академика Н.Ф.Гамалеи» РАМН (А.Л.Гинцбург, Б.С. Народицкий, М.М.Шмаров, Д.Ю.Логунов, Л.Н. Нестеренко, Н.А. Зигангирова, Ю.М. Романова, А.Ф. Мороз, М.В. Мезенцева, Д.В. Щепляков, И.Л. Тутыхина, Л.В. Черенова, А.И. Тухватулин, И.Ю. Грибова), Учреждением Российской академии наук «Центр «Биоинженерия» РАН (К.Г.Скрябин, О.А.Зейналов, Н.В.Равин, С.П.Комбарова), Учреждением Российской Академии наук «Институт биохимии им. А.Н. Баха» РАН (В.О.Попов, Б.Б.Дзантиев, А.В.Жердев, Н.В.Голуб), ФГУП «Всероссийский научно-исследовательский институт метрологической службы» (С.А. Кононогов, С.С. Голубев), ООО «Интерлаб» (А.Н.Веденин, Г.В.Казыдуб).

2. Разработаны в рамках реализации Федеральной целевой программы «Развитие инфраструктуры наноиндустрии в Российской Федерации на 2008 - 2010 годы».

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г.Онищенко 24 мая 2010 г.

4. Введены в действие с 24 мая 2010 г.

5. Введены впервые.

**УТВЕРЖДАЮ**

Руководитель Федеральной службы  
по надзору в сфере защиты прав  
потребителей и благополучия человека,  
Главный государственный санитарный  
врач Российской Федерации

\_\_\_\_\_ Г.Г. Онищенко

Дата введения: « 24 » 05 2010 г.

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ  
ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ НАНОМАТЕРИАЛОВ НА  
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ МИКРОБИОЦЕНОЗА**

**Методические указания**

**МУ 1.2. 2634-10**

---

**I. Введение**

В течение ближайших лет ожидается резкое увеличение объёмов производства во всём мире, в том числе в Российской Федерации, искусственных наноматериалов, в частности таких, как наночастицы оксидов кремния, титана, цинка, железа, церия, алюминия, металлические наночастицы железа, меди, кобальта, никеля, алюминия, серебра, золота, углеродные нанотрубки, фуллерены, наночастицы биополимеров и рекомбинантных вирусов. Это с неизбежностью приведёт к поступлению значительных количеств наноматериалов в окружающую среду, их накоплению в компонентах биоты и абиотических средах с последующей возможной передачей человеку.

Создание комплексной системы безопасности в процессе исследований, освоения, производства, обращения и утилизации наноматериалов в Российской Федерации требует наличия методов, позволяющих всесторонне тестировать безопасность искусственных наноматериалов и нанотехнологической продукции для широкого спектра биологических объектов. В качестве важной «мишени» воздействия наночастиц, специфически обусловленного их малыми размерами и высокоразвитой межфазной поверхностью, в настоящее время рассматриваются компоненты микробиоценоза. Воздействие наноматериалов на отдельных представителей нормальной и патологической микрофлоры

толстой кишки человека может проявляться в селективной ингибиции или, напротив, усилении роста отдельных её представителей, что может вызвать дисбиотические нарушения, приводящие к развитию разнообразных негативных последствий для организма, включая угнетение функции иммунитета, патологию желудочно-кишечного тракта. Возможное мутагенное действие, которое наночастицы способны оказывать на микроорганизмы, входящие в состав нормального микробиоценоза, может приводить к появлению новых патогенных и условно-патогенных штаммов, обладающих потенциально непредсказуемыми свойствами и влиянием на макроорганизм хозяина.

Настоящие методические указания разработаны в целях внедрения единого, научно обоснованного, количественного подхода к оценке безопасности искусственных наноматериалов на основе изучения их воздействия на нормальные и транзиторные компоненты микробиоценоза толстой кишки лабораторных животных в условиях естественного (физиологического) перорального пути введения наноматериала, а также выявления у наноматериалов способности индуцировать мутагенез (в молекулярно-генетическом тесте на модельных штаммах микроорганизмов) и приобретать гены трансмиссивной антибиотикоустойчивости. Результаты проводимых тестов должны входить как неотъемлемая часть в систему оценки безопасности новых наноматериалов, в ходе их разработки, регистрации, производства, оборота, использования и утилизации в Российской Федерации.

## **II. Область применения**

2.1. Настоящие методические указания устанавливают требования к проведению тестирования безопасности наночастиц и наноматериалов искусственного происхождения на компонентах нормального микробиоценоза толстой кишки с изучением их микробиологических и молекулярно-генетических показателей.

2.2. Требования, изложенные в настоящих методических указаниях, применяются в ходе установления безопасности наноматериалов на стадиях их производства, оборота, использования и утилизации в Российской Федерации в целях принятия решений по оценке рисков, связанных с данными процессами.

2.3. Методические указания разработаны с целью обеспечения единства измерений и адаптации имеющихся методов и средств измерений в ходе оценки безопасности наноматериалов искусственного происхождения.

2.4. Методические указания предназначены для специалистов органов Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, научно-исследовательских организаций гигиенического профиля и медицинских учебных

заведений, а также иных организаций и учреждений, проводящих исследования по оценке рисков, связанных с нанотехнологиями и использованием наноматериалов.

### **III. Общие положения**

3.1. Проведение исследований по микробиологической и молекулярно-генетической оценке воздействия наноматериалов на представителей микробиоценоза определяются правилами надлежащей лабораторной практики, в соответствии с положениями приказа Минздрава РФ от 19 июня 2003 г. N 267 «Об утверждении правил лабораторной практики» (зарегистрирован Министерством юстиции Российской Федерации 25 июня 2003 г., регистрационный номер 4809)..

3.2. Требования к стандартным наноматериалам.

3.2.1. Для верификации, стандартизации и калибровки методов, применяемых при определении безопасности наноматериалов на модельных биологических тест-системах используются стандартные образцы наноматериалов (стандарты).

3.2.2. Каждый стандарт наноматериала должен быть охарактеризован на соответствие по показателям химического состава (включая наличие примесей), размеру и форме частиц, удельной площади поверхности, типу кристаллической структуры. Указанные характеристики определяются с использованием методов масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой, трансмиссионной электронной микроскопии, определения изотерм адсорбции инертных газов, рентгенофазового (рентгенодифракционного) анализа. В случае стандартных образцов фуллеренов при проверке соответствия следует использовать метод обращённофазовой ВЭЖХ.

3.2.3. Каждый стандартный образец наноматериала должен быть снабжён «Паспортом безопасности наноматериалов», составленным на основе ГОСТ 30333-2007 «Паспорт безопасности химической продукции. Общие требования».

3.2.4. Стандартные образцы наноматериалов должны быть упакованы для защиты при транспортировке от загрязнения или порчи.

3.2.5. Хранение стандартных образцов наноматериалов осуществляется отдельно от остальных применяемых веществ с соблюдением условий хранения, указанных в «Паспорте безопасности наноматериалов» на протяжении всего срока годности образца.

3.2.6. Хранение и использование стандартных образцов наноматериалов осуществляется в соответствии с утвержденным протоколом исследования.

3.3. Требования к используемому оборудованию.

3.3.1. Организации, проводящие определение безопасности наноматериалов в отношении нормальной микрофлоры кишечника, должны быть оснащены необходимым

оборудованием, прошедшим метрологический контроль и калибровку в установленном порядке.

3.3.2. Эксплуатация оборудования проводится в соответствии с техническим паспортом и инструкцией по применению. Результаты проведения калибровки и текущего ремонта оборудования фиксируются в специальном журнале, доступном в любое время сотрудникам, эксплуатирующим оборудование или обеспечивающим его обслуживание.

3.4. Планирование и проведение исследований.

3.4.1. Определение безопасности наноматериалов в отношении нормальной микрофлоры кишечника проводится по утвержденному плану с ведением протокола и составлением отчета, в который заносятся все результаты исследований.

3.4.2. Тесты по определению безопасности наноматериалов, требующие использования лабораторных животных, проводятся только на здоровых животных, прошедших карантин в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19 июня 2003 года № 267 «Об утверждении Правил лабораторной практики» и приказом Министерства здравоохранения СССР № 755 от 12 августа 1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».

3.4.3. Помещения для лабораторных животных должны обеспечивать изоляцию (карантин) поступающих животных для наблюдения и выбраковки больных животных и животных, подозреваемых в носительстве инфекций; позволять осуществлять раздельное содержание различных видов животных и различных групп животных одного вида, соответствовать санитарно-эпидемиологическим и ветеринарным требованиям.

3.4.4. Корма, оборудование и инвентарь для ухода за животными необходимо хранить в помещениях, изолированных от мест содержания животных. Помещения, корма и инвентарь должны соответствовать требованиям, установленным в приказе Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19 июня 2003 года № 267 «Об утверждении Правил лабораторной практики» и приказе Министерства здравоохранения СССР № 755 от 12 августа 1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных» и в СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

3.4.5. Исследования безопасности наноматериалов на животных проводятся в соответствии с установленными правилами. Исполнителем должен быть обеспечен контроль за соблюдением правовых и этических норм использования лабораторных животных в соответствии с утверждённым протоколом (см.п. 3.4.7).

3.4.6. Корма и вода для животных должны обеспечивать пищевые потребности в соответствии с протоколом исследования, быть свободными от патогенных микроорганизмов и вредных примесей и не должны влиять на результаты исследования.

3.4.7. Данные исследования безопасности наноматериалов по отношению к нормальной микрофлоре кишечника заносятся в протокол, в котором отражены цели работы и методы, используемые для достижения этих целей.

Протокол исследования утверждается руководителем организации, проводящей исследования, и включает: цель и задачи исследования, имеющиеся сведения о тестируемом наноматериале (физические, химические, биологические, токсикологические свойства), используемые стандарты, схему проведения тестирования и её обоснование, методы введения наноматериала в биологический объект, применяемые дозы наноматериала, методы исследования, определяемые показатели, результаты исследований, метрологическую характеристику используемого метода анализа, статистическую обработку результатов исследования, заключение, список используемой литературы.

3.4.8. Вносимые изменения в протокол исследования утверждаются руководителем исследования, а отклонения от протокола (незапланированные события, непредвиденные обстоятельства и т.д.) записываются, пронумеровываются, подписываются руководителем исследования, датируются в приложении с указанием причин.

### 3.5. Требования к оформлению отчета.

3.5.1. По окончании проведенных исследований безопасности наноматериалов по влиянию на микробиологические и молекулярно-генетические показатели компонентов микробиоценоза оформляется отчет, в котором должны быть представлены: название, адрес организации, даты начала и завершения исследований, цель и задачи исследования; характеристика тестируемого наноматериала, включая имеющиеся сведения о физических, химических, биологических, токсикологических свойствах; перечень протестированных образцов наноматериала и применяемых стандартов, метод введения наноматериала в организм животного, схема проведения исследования, описание методов статистической обработки результатов, результаты исследования, представленные в виде обобщающих таблиц, рисунков с соответствующей статистической обработкой, и комментариев к ним, обсуждение результатов, выводы, список использованной литературы.

3.5.2. Отчет о результатах проведенного исследования составляется ответственным исполнителем, утверждается руководителем организации и скрепляется печатью организации.

3.6. Система обеспечения качества исследований по определению безопасности наноматериалов на модельных биологических тест-системах.

3.6.1. Контроль за качеством проведения исследований по определению безопасности наноматериалов по отношению к нормальной микрофлоре кишечника включает в себя оформление перечня исследований, проводимых в организации, с указанием для каждого исследования руководителя и заказчика, названия определяемого наноматериала, даты начала и окончания каждого исследования на текущий момент времени, оценку протоколов и методов исследования на соответствие правилам лабораторной практики, мониторинг текущих исследований, отчет о проведенных проверках и рекомендации по устранению недостатков.

3.6.2. Для осуществления контроля качества руководитель организации, проводящей тестирование безопасности наноматериалов по отношению к нормальной микрофлоре кишечника, назначает, в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики, ответственных лиц за мониторинг исследования из числа сотрудников, не участвующих в исследовании.

3.7. Стандартные операционные процедуры.

3.7.1. Стандартные операционные процедуры разрабатываются организацией, проводящей исследования безопасности наноматериалов по отношению к нормальной микрофлоре кишечника, на все производственные операции, включая: поступление, идентификацию, маркировку, отбор, обработку проб, использование и хранение исследуемых проб, хранение и аттестацию стандартов; обслуживание и калибровку измерительных приборов и оборудования; ведение тест-систем и их поддержание в функциональном состоянии; приготовление реактивов, ведение записей, отчетов и их хранение; обслуживание помещений; обезвреживание или утилизацию наноматериалов, содержащих их образцов (если это необходимо) и использованных компонентов тест-систем, осуществление программы по обеспечению качества, и утверждаются руководителем организации.

3.7.2. Соблюдение стандартных операционных процедур осуществляется в целях обеспечения безопасности исследования, качества, достоверности и воспроизводимости его результатов.

3.7.3. Отклонения от стандартных операционных процедур должны быть документально оформлены и согласованы с руководителем исследования.

3.7.4. Организация, проводящая исследование по определению безопасности наноматериалов по отношению к нормальной микрофлоре кишечника, обязана:



- иметь утвержденный порядок приема и учета поступления анализируемых проб и стандартов наноматериалов;

- проводить учет анализируемых проб и стандартов наноматериалов при поступлении, расходовании, возврате заказчику или их утилизации;

- принимать меры по обеспечению идентификации исследуемых веществ (указание на этикетке названия, химической формулы, номера серии, даты выпуска, условий хранения и сроков годности) и их стабильности на протяжении всего исследования. Для образцов наноматериалов на этикетке дополнительно должны указываться степень дисперсности, размер, форма частиц, при необходимости, удельная площадь поверхности и кристаллическая структура.

### 3.8. Меры конфиденциальности.

3.8.1. Сотрудники, принимающие участие в проведении исследований безопасности наноматериалов по отношению к нормальной микрофлоре кишечника, обязаны соблюдать конфиденциальность в отношении любых данных, полученных в ходе исследования, в соответствии с законодательством Российской Федерации.

3.8.2. Организация, проводящая исследования по определению безопасности наноматериалов, должна обеспечить конфиденциальность результатов исследований в рамках принятых ею обязательств и в соответствии с законодательством Российской Федерации.

## **IV. Метод оценки безопасности наноматериалов на нормальной микрофлоре кишечника в условиях *in vivo***

### **4.1. Принцип метода**

Оценку влияния наноматериалов на нормальную микрофлору кишечника в условиях *in vivo* проводят на основании изучения видового состава и количественных уровней основных микробных популяций микробиоценоза кишечника, их функциональной активности путем посевов фекальных масс или содержимого толстого кишечника лабораторных животных, которым внутривентрикулярно вводят образцы наноматериалов, при сравнении с животными, которым вводят традиционный аналог наноматериала, и с контрольными животными. В качестве групп сравнения (контроль) используют животных, которым вводят дистиллированную воду или среду-носитель наноматериала.

Проводят изучение не менее 4-х групп и родов защитных популяций микрофлоры (лактобактерии, бифидобактерии, бактероиды, лактозоферментирующие энтеробактерии) и 5-ти групп и родов транзитных (условно-патогенных) представителей микробиоты (энтеробактерии, стафилококки, энтерококки, дрожжевые и дрожжеподобные грибы,

споровые анаэробы и др.) на соответствующих дифференциально-диагностических и селективных средах.

Количественный учет бифидобактерий проводят на тиогликолевой среде или среде Блаурокка; лактобацилл - на среде МРС; энтеробактерий - на среде Эндо и цитратном агаре. Содержание стафилококков определяют на желточно-солевом агаре и среде Байрд-Паркера; стрептококков - на кровяном агаре; энтерококков - на среде МИС; количество сульфитредуцирующих клостридий - на железосульфитной среде; дрожжей на среде Сабуро, плесневых грибов - на среде Сабуро или Чапека.

У штаммов энтеробактерий, стафилококков проводят определение таксономической принадлежности до уровня вида с использованием системы мультимикротестов АРІ для биохимической идентификации, производства фирмы «Bio Merieux» (Арі 10S, Арі 20E, Арі RapiD 20E, Арі Staph), и/или классических методов исследования.

Содержание определенных групп, родов, видов микроорганизмов (плотность популяций) выражают в десятичном логарифме числа колониеобразующих единиц на 1 г сырой массы фекалий или кишечного содержимого (lg КОЕ/г).

Помимо количественных характеристик определяют наличие факторов патогенности, таких как гемолитическая активность энтеробактерий, стафилококков, энтерококков, лецитиназная и коагулазная активность стафилококков, способность к образованию хламидоспор и псевдомицелия дрожжеподобными грибами.

Определение функциональных свойств (антагонистической активности) популяций бифидобактерий, выделенных из кишечника лабораторных животных, проводят по степени их кислотообразующей активности в среде культивирования.

Полученные значения подвергают статистической обработке с помощью критерия Стьюдента и непараметрического рангового критерия Мана-Уитни. Различие между опытной и контрольными группами признаются достоверными на уровне значимости  $P < 0,05$ . Расчеты проводят с помощью пакетов программ EXCEL и SPSS.

## **4.2. Стандартные образцы наноматериалов**

При калибровке метода используются стандартные образцы из банка стандартных образцов наноматериалов.

## **4.3. Лабораторные животные, их содержание и рацион**

Тестирование выполняют на мышах-самцах инбредной линии Balb/C с исходной массой 20-22 г или крысах-самцах линии Вистар с исходной массой тела 150-160 г, в соответствии со специально разработанным дизайном эксперимента. После семи (для мышей) или десяти (для крыс) дней адаптации на рационе вивария у животных

контролируют массу тела и определяют динамику прироста массы тела. Особей, отстающих в приросте массы тела, удаляют.

Животных делят на группы, количество которых определяется количеством тестируемых видов и доз наноматериалов + 1 контрольная группа. Оптимальное число животных в каждой группе составляет 10 особей, но не менее 6. В зависимости от количества вводимых доз наноматериалов формируют следующие группы животных (по 6-10 особей в каждой): животных опытных групп подвергают воздействию тестируемого наноматериала, животных групп сравнения – воздействию его традиционного аналога, животные контрольной группы получают плацебо – среду, в которой был диспергирован наноматериал (в общем случае - дистиллированную воду).

В течение всего периода эксперимента животные получают стандартные рационы, согласно МУ 1.2.2520-09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов».

Ежедневно контролируют состояние животных, поедаемость корма; еженедельно - поведение, состояние шерстного покрова, наличие/отсутствие диареи, прирост массы тела.

Для исключения влияния на микрофлору кишечника неспецифических факторов, связанных со стрессом животных, все животные подвергаются тем же манипуляциям, что и животные, получающие наноматериалы.

#### **4.4. Методика введения тестируемого образца**

Образцы наноматериалов вводят ежедневно однократно внутрижелудочно через зонд, снабженный гладкой оливой диаметром не более 2 мм, в виде дисперсии в дистиллированной воде. При приготовлении дисперсии тестируемых наноматериалов необходимо применять физические методы диспергирования (перемешивание, встряхивание, ультразвуковая обработка). Применение органических растворителей и детергентов не допускается. В порядке исключения допустимо введение наноматериалов на носителе, биологическая инертность которого подтверждена в дополнительных контрольных тестах.

Дистиллированную воду животным контрольной группы вводят внутрижелудочно в том же объёме, в котором вводятся наноматериалы опытным группам.

Тестируемые дозы вводимого наноматериала устанавливаются на основе сведений о возможности экспонирования человека данным наноматериалом с учётом 10-кратного коэффициента запаса

Продолжительность введения наноматериалов составляет не менее 20 дней.

#### 4.5. Отбор проб

По окончании введения наноматериала животных подвергают эвтаназии одним из разрешённых для этого способов (Приказ МЗ СССР № 755).

Мышей после усыпления эфиром подвергают вскрытию и проводят отбор фекальных масс из содержимого их толстого кишечника в стерильную одноразовую посуду.

Крыс после усыпления эфиром подвергают вскрытию, в процессе вскрытия выделяют слепую кишку, помещают в стерильную одноразовую посуду и в условиях асептики отбирают её содержимое в бакпечатку для исследования микрофлоры.

Образцы хранят не более 3 часов при  $(4\pm 2)^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.6. Средства измерений и оборудование

Термостат, поддерживающий рабочую температуру в интервале от  $(+25\pm 1)^{\circ}\text{C}$  до  $(45\pm 1)^{\circ}\text{C}$  по ТУ 64-1-1382-72 или других моделей, с аналогичными характеристиками

Морозильная камера, обеспечивающая температуру  $(-20)^{\circ}\text{C}$  или ниже

Ламинарный шкаф марки ЛШ1 фирмы «Віокот» или аналогичный

Центрифуги со скоростью вращения ротора до 12000 об/мин для пробирок вместимостью 15 и 1,5 см<sup>3</sup>

Встряхиватель вибрационный типа «Вортекс» со скоростью вращения до 3000 об/мин

Холодильник бытовой электрический по ГОСТ 26678-85

Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 200 г с по ГОСТ 24104-2001

Мембранные установки для получения деионизованной воды по ОСТ 11-029.003-80

Анализатор потенциометрический, погрешность измерений pH  $\pm 0,01$  по ГОСТ 27987-88

Дозаторы с переменным объёмом дозирования по ТУ 9452-002-33189998-2002 или аналогичные:

0,2 – 2,0 мм<sup>3</sup> с шагом 0,01 мм<sup>3</sup>, с точностью  $\pm 1,2\%$ ;

2- 20 мм<sup>3</sup> с шагом 0,01 мм<sup>3</sup>, с точностью  $\pm 0,8\%$ ;

1 – 10 см<sup>3</sup> с шагом 0,1 см<sup>3</sup>, с точностью  $\pm 0,5\%$ ;

0,5 – 10,0 мм<sup>3</sup> с шагом 0,01 мм<sup>3</sup>, с точностью  $\pm 0,8\%$ ;

20– 200 мм<sup>3</sup> с шагом 0,1 мм<sup>3</sup>, с точностью  $\pm 0,6\%$ ;

100 – 1000 мм<sup>3</sup> с шагом 1 мм<sup>3</sup>, с точностью  $\pm 3\%$ .

Пробирки стерильные типа «Эппендорф» объемом 1,5 см<sup>3</sup> или аналогичные

Пробирки стерильные с крышкой «Costar» вместимостью 15 см<sup>3</sup> или аналогичные

Наконечники пластиковые объемом 1-200 мм<sup>3</sup>

Наконечники пластиковые объемом 200-1000 мм<sup>3</sup>

Ножницы медицинские по ГОСТ 21239-89

Анаэробные контейнеры с оборудованием для генерирования анаэробной атмосферы, включая систему для проверки анаэробных условий

Дистиллятор по ГОСТ 6709-72

Микроскоп биологический, обеспечивающий просмотр в проходящем свете, с увеличением 900х-1000х с иммерсионной системой или с приспособлением для фазово-контрастного микроскопирования

Облучатель бактерицидный настенный ОБН-150 по ТУ 16-535-8 или аналогичный

Стерилизатор суховоздушный для температурного режима (160±0,5)°С

Стерилизатор паровой медицинский по ГОСТ 19569-89 или аналогичный

Петля бактериологическая платино-иридиевая или никель-хромовая диаметром 3 мм

Петля бактериологическая полимерная объемом 1, 10 мм<sup>3</sup>

Пинцет медицинский по ГОСТ 21241-89

Скальпель хирургический, 15 см по ГОСТ 21240-89

Спиртовки лабораторные стеклянные по ГОСТ 23932-90

Термоконтанер (сумка-холодильник)

Отраслевой стандартный образец мутности на 5 и 10 ЕД мутности или стандарт МакФарланда по ОСО 42-28-85-04П.

#### **4.7. Материалы, лабораторная посуда и реактивы**

Бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026-76

Вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556-81

Марля медицинская по ГОСТ 9412-93

Индикаторы анаэробной атмосферы

Мешки полимерные для стерилизации и деструкции лабораторных принадлежностей

Перчатки резиновые или пластиковые по ГОСТ 3-88

Колбы плоскодонные конические разной вместимости по ГОСТ 1770-74

Цилиндры стеклянные мерные лабораторные вместимостью 25, 100, 1000 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770-74

Воронки стеклянные по ГОСТ 25336-82

Флакон – диспенсер для дозирования жидкостей

Флаконы с резьбой и крышкой стерилизуемые объемом 500-1000 см<sup>3</sup>

Пипетки градуированные по ГОСТ 29227-91 (ИСО 835-1-81)

Палочки стеклянные по ГОСТ 21400-75

Стекла предметные для микропрепаратов по ГОСТ 9284-75

Стекла предметные для микропрепаратов ГОСТ 6672-75

Стекла часовые

Шпатели бактериологические

Чашки Петри, диаметр 90 или 100 мм

Штативы для пробирок

Чашки биологические (Петри) по ГОСТ 23932-90

Пробирки типов П1, П2 по ГОСТ 25336-82

Флаконы стерильные объемом 100 и 200 см<sup>3</sup> «Costar» или аналогичные

Бакпечатки стерильные однократного применения по ТУ 64-2-279-79

Питательная среда для контроля стерильности (тиогликолевая) по ФСП 42-0010-4456-03 или ТУ 9398-040-7895326-2007

Питательная среда для культивирования и выделения бифидобактерий (Бифидум-среда) по ТУ 9398-041-7895326-2007

Среда МРС агаризованная, соответствующая требованиям ГОСТ 10444.11-89, ГОСТ 51331-99, РУ ФСЗ 2007/00435, SMDP, АРНА,

Среда Эндо по ТУ 9229-072-00419785, ТУ 9398-027-7895326-2007

Цитратный агар Симмонса, питательная среда №14 ГРМ по ФС 42-3623-98, ТУ 9398-014-7895326-2006, ТУ 9229-072-00419785

Кровяной агар, трипказо-соевый агар с 5% бараньей кровью

Трехсахарный железистый агар (TSI, среда № 13) по ТУ 9398-013-7895326-2006

Молочно-ингибиторная среда (МИС), питательная среда для выделения энтерококков, соответствующая требованиям ГОСТ 28566-90, ФСП 42-0504-7787-06

Среда Сабуро агаризованная, питательная среда №2 ГРМ (Сабуро), среда для определения дрожжей и плесеней по ФС 42-3729-99, ФСП 42-0504-0813-04, ТУ 9229-014-00419789-95, ТУ 9398-098-7895326-2008

Среда Чапека, соответствующая требованиям ГОСТ 10444.12-88

Агар Байрд-Паркера, соответствующая требованиям ГОСТ 10444.2-94, 1676РУ МЗ РФ №2003/1663, ISO6888-1983, РУ ФС 6888-2-1999

Среда для определения *S. aureus* (желточно-солевой агар)

Железосульфитная среда, соответствующая требованиям ГОСТ 10444.11-89, ТУ 9229-013-00419789-95, РУ ФС №2006/1176, ISO 7937

Среда Клиглера по ТУ 9229-072-00419785-97

Кровяной агар

Фосфатно-тиогликолевый буфер (калия дигидрофосфат 4,5 г, натрия гидрофосфат 6,0 г, агар-агар 1,0 г, тиогликолевая кислота 0,4 см<sup>3</sup> на 1000 см<sup>3</sup> воды дистиллированной)

Красители для окрашивания по Грамму

Неомицин-агар (КАБ) для определения бактериоидов (10г пептона, 3,0 г NaCl, 2,0 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 3,0 г мясо-пептонного бульона, 4,0 г дрожжевого экстракта, 6,0 г декстрозы, 1,0 см<sup>3</sup> твин-80, 20,0 г агара-агара, доводят дистиллированной водой до 1000 см<sup>3</sup>, затем добавляют 250 мг цистина, 80 мг неомицина, 200 мг дезоксихолата натрия, 30 см<sup>3</sup> крови, рН готовой среды 7,2)

Биотест для контроля паровой стерилизации

Индикаторы термовременные для контроля паровой и воздушной стерилизации

Биотест для контроля суховоздушной стерилизации;

Агар микробиологический по ГОСТ 17206-96

Ацетон по ГОСТ 2768-84

Бриллиантовый зеленый

Бромкрезол пурпурный

Бромтимоловый синий

Водорода перекись по ГОСТ 10929-76

Хлороформ по ТУ 2631-001-29483781-2004

Экстракт дрожжевой сухой

Яйца куриные пищевые по ГОСТ Р 52121-2003

Натрий хлористый по ГОСТ 4233-77

Спирт этиловый ректификованный

Масло иммерсионное для микроскопии по ГОСТ 31739-78

Вода дистиллированная

Набор реактивов для окраски по Грамму

Тест-системы для биохимической идентификации энтеробактерий API 10S, API 20E, API Rapid 20E, Enterotube или аналогичные

Мультимикротесты для биохимической идентификации стафилококков API Staph., производства фирмы «Biomerieux», Франция

Дезинфицирующий раствор типа «Жавель Солид», «Виркон», «Самаровка» или аналогичные

Неомицина сульфат

Допускаются использование других реактивов и материалов аналогичного назначения, разрешенные к применению в установленном порядке и с характеристиками, обеспечивающими проведение исследований в соответствии с данными методическими указаниями.

На питательные среды и биологические препараты импортного производства должен иметься сертификат системы качества изготовителя по ИСО 9000 или EN 29000.

Питательные среды и препараты отечественного производства должны соответствовать нормативной документации, утвержденной в установленном порядке.

## **4.8. Методика проведения анализа**

### **4.8.1. Приготовление суспензии фекалий (содержимого слепой кишки) животных**

Исследуемый материал (фекалии мышей или навеску из содержимого слепой кишки крыс) в пределах 1 г (взвешивают на электронных весах на стерильной подложке) вносят в предварительно регенерированный агаризованный (0,1%) тиогликолево-фосфатный буфер, обеспечивающий выживание анаэробных микроорганизмов, в соотношении 1 к 10. Из этой суспензии готовят последовательные десятикратные разведения на фосфатно-тиогликолевом буфере от  $10^{-1}$  до  $10^{-10}$ . Каждое разведение, начиная с исходного, гомогенизируют методом, имитирующим центрифугирование (круговыми движениями руки при согнутом локтевом суставе).

Подготовленные разведения используют для посева на дифференциально-диагностические и селективные среды для количественного учета девяти групп микроорганизмов - представителей защитной микрофлоры и представителей транзитной (сопутствующей) микрофлоры.

### **4.8.2. Проведение количественного посева**

Посев из соответствующих разведений суспензии производится строго количественно – по  $0,05 \text{ см}^3$  на различные плотные питательные среды с последующим распределением материала с помощью шпателя или бактериологической петли по всей поверхности агаризованной среды в чашке Петри (допускается посев мерного количества на  $\frac{1}{2}$  или  $\frac{1}{4}$  часть чашки Петри). В жидкие и полужидкие питательные среды вносят по  $1 \text{ см}^3$  суспензии. Схема первичного посева, питательные среды, сроки и условия инкубации приведены в таблице 1.



Таблица 1.

Схема первичного посева суспензии фекалий (содержимого слепой кишки) животных.

Микроорганизмы: группа, семейство, род, вид	Питательные среды	Разведения исследуемого материала	Сроки, условия инкубации
Общее число анаэробных микроорганизмов	Кровяной агар, 6 -10%	$10^{-3}$ , $10^{-5}$ , $10^{-7}$ , $10^{-9}$	До 7 суток в анаэробных условиях при ежедневном контроле роста
Общее число аэробных микроорганизмов	Кровяной агар 3%	$10^{-3}$ , $10^{-5}$ , $10^{-7}$	48 часов в аэробных условиях
Лактобациллы	Модифицированный агар Рогозы (МРС)	$10^{-3}$ , $10^{-5}$ , $10^{-7}$	3 суток в микроаэрофильных условиях
Стрептококки	Кровяной агар 3%	$10^{-3}$ , $10^{-5}$ , $10^{-7}$	48 часов в аэробных условиях
Бактероиды	Кровяной агар с неомицином 6%	$10^{-5}$ , $10^{-7}$ , $10^{-9}$	48 часов в анаэробных условиях или в аэробных условиях с применением часовых стекол
Бифидобактерии	Тиогликолевая среда или среда Блаурокка	$10^{-6}$ - $10^{-10}$	3-5 суток в анаэробных или микроаэрофильных условиях
Энтеробактерии	Эндо	$10^{-3}$ , $10^{-5}$ , $10^{-7}$	24 часов в аэробных условиях
	Цитратный агар	$10^{-3}$ , $10^{-5}$ , $10^{-7}$	4 суток в аэробных условиях
Энтерококки	Молочно-солевой	$10^{-3}$ , $10^{-5}$ , $10^{-7}$	48 часов в аэробных условиях

Микроорганизмы: группа, семейство, род, вид	Питательные среды	Разведения исследуемого материала	Сроки, условия инкубации
	агар с полимиксином (МИС)		условиях
Патогенные микроорганизмы: шигеллы, сальмонеллы	Висмутсульфит-агар, среда Плоскирева	$10^{-1}$	24-48 часов в аэробных условиях
Бактерии рода протей	Эндо, Цитратный агар		24 часов 4 суток
Стафилококки	Желточно-солевой агар Среда Байрд-Паркера	$10^{-1}$ , $10^{-3}$ , $10^{-5}$	48 часов в аэробных условиях
Сульфитредуцирующие клостридии*	Железосульфитная среда	$10^{-1}$ - $10^{-5}$	5 суток в анаэробных или микроаэрофильных условиях
Дрожжевые грибы, плесени	Среда Сабуро	$10^{-3}$ , $10^{-5}$	3-5 суток в аэробных условиях
*при учете клостридий следует иметь в виду, что почернение среды может быть связано с присутствием сульфитредуцирующих энтеробактерий.			

Общее число анаэробных и аэробных микроорганизмов учитывают на 6-10% кровяном агаре, инкубируемым в анаэробных условиях (в атмосфере углекислого газа 5-10%) и в аэробных условиях для сопоставления выросших колоний. Инкубация при 37<sup>0</sup>С 48 часов.

Количество бактериоидов определяют с использованием часовых стекол. Из соответствующих разведений исследуемого материала наносят автоматической пипеткой по 0,05 см<sup>3</sup> на чашки Петри на кровяной агар с неомицином для бактериоидов. После того, как капля «втягивается» в агар, на место посева накладывают часовые стекла с агаром, на который посеяна культура *Serratia marcescens*. Рост этого строго аэроба обеспечивает создание анаэробных условий, необходимых для культивирования беспоровых анаэробных бактерий.

#### **Подготовка часовых стекол:**

В часовые стекла заливают 1,0-2,0 см<sup>3</sup> кровяного агар с неомицином, подсушивают в течение 20 минут в термостате при температуре 37<sup>0</sup>С. Суточную культуру *Serratia marcescens*, выращенную на скошенном мясо-пептонном агаре, смывают 10 см<sup>3</sup> стерильной дистиллированной воды, взбалтывают и выливают в чашку Петри. Затем стерильным ватным тампоном, наносят суспензию на поверхность агар в часовых стеклах. После 4 часов инкубации при 37<sup>0</sup>С обработанные таким образом часовые стекла накладывают на поверхность питательной среды, предназначенной для культивирования бактериоидов. После инкубации в течение 48 часов выросшие колонии микроскопируют и подсчитывают. Колонии бактериоидов - плоские голубоватого цвета с матовой поверхностью, с ровными или зазубренными краями, как правило, колонии мелкие.

Для остальных представителей микробиоценоза применяют следующие условия культивации:

- бифидобактерии определяют на тиогликолевой среде или на среде Блаурокка с последующим определением рН в среде культивирования;
- лактобациллы - на среде МРС;
- энтеробактерии - на среде Эндо и цитратном агаре;
- бактерии рода *Proteus* - на средах, используемых для учета энтеробактерий;
- содержание стафилококков определяют на желточно-солевом агаре и агаре типа Байрд-Паркер, с последующим определением плазмокоагулирующей активности;
- стрептококки - на кровяном агаре;
- энтерококки - на среде МИС;
- количество сульфитредуцирующих клостридий - на железосульфитной среде;
- количество дрожжеподобных грибов - на среде Сабуро, с дальнейшим определением характера филаментации и наличия хламидоспор на рисовом агаре.

Гемолитические свойства энтеробактерий, стафилококков, энтерококков изучают на кровяном агаре.

Морфологию выделенных культур определяют микроскопированием окрашенных по Грамму мазков-препаратов.

У штаммов энтеробактерий проводят определение таксономической принадлежности до вида с использованием систем для биохимической идентификации энтеробактерий (Ари 10S, Ари 20Е, РаріD 20Е и др.) или посевом на диагностические среды для определения способности к ферментации углеводов (среды Гисса,

трехсахарный агар) и аминокислот (фенилаланин-агар, среды с лизином, орнитином, аргинином).

### **4.8.3. Учет результатов количественного посева**

Учет результатов проводят по истечении сроков инкубации по числу выросших колоний в посевах из 2-х последних разведений, с изучением культуральных, морфологических (микроскопия) и тинкториальных свойств (окраска по Грамму). При этом подсчет выросших типичных колоний проводится на чашках с числом от 5 до 30, с расчетом среднего арифметического показателя, а так же с учетом сопоставимости количества колоний из предшествующих разведений. Число выросших колоний умножают на разведение исследуемого материала и выражают в КОЕ/г по формуле:

$K = \text{число выросших колоний на чашке (секторе)} \times 20 \times n,$

где K- количество микроорганизмов КОЕ в 1 г, n – разведение суспензии, 20 - коэффициент пересчёта на 1 см<sup>3</sup> суспензии при посеве 0,05 см<sup>3</sup> (0,05 см<sup>3</sup> составляет 1/20 см<sup>3</sup>).

Например, в посеве из разведения 10<sup>7</sup> выросло 10 колоний. 10 умножают на 20 и умножают на 10<sup>7</sup> (разведение) и получают 2,0 x 10<sup>9</sup>КОЕ/г.

Полученный результат переводят в десятичный логарифм числа.

## **4.9. Исследования функциональной активности популяций микрофлоры**

### **4.9.1. Оценка функциональной активности популяции бифидобактерий, выделенных из фекалий мышей или содержимого слепой кишки крыс**

Оценку показателя проводят по способности бифидобактерий закислять среду культивирования путём измерения активной кислотности (рН) среды культивирования I генерации (в пробирках с ростом бифидобактерий на 5 сутки выращивания). Величину рН измеряют потенциометрическим методом во всех пробирках с наличием признаков роста с помощью потенциометра со стеклянным электродом и хлорсеребряным электродом сравнения, градуированным по стандартным буферным растворам рН 4, 7 и 9.

Контролем служит пробирка с исходной питательной средой. Полученные значения суммируют и усредняют.

Интенсивность кислотообразования у бифидобактерий коррелирует с антагонистической активностью. Критериями служат пределы рН: менее 4,5 – антагонистически активные бифидобактерии; 4,6—5,1 – слабый антагонизм, более 5,1 – отсутствие антагонистической активности.

#### 4.9.2. Дополнительные характеристики защитных представителей микрофлоры

При необходимости для подтверждения таксономической принадлежности микроорганизмов или расширенной оценки влияния наноматериалов на микрофлору кишечника могут быть проведены тесты, указанные в таблице 2.

Таблица 2

Дополнительные тесты для характеристики защитных популяций микрофлоры кишечника животных

Микроорганизмы	Биохимические тесты	АА
Бифидобактерии	Отсутствие каталазы Определение родовой принадлежности на тест-системах фирмы Биомерье API 50СНЕ, Enterotube	-
Лактобациллы	Отсутствие каталазы Определение родовой принадлежности на тест-системах фирмы Биомерье API 50СНЕ, Enterotube	Метод диффузии в агар с газонем из патогенных и условно-патогенных бактерий
Энтеробактерии	Отсутствие оксидазы	Метод отсроченного антагонизма

АА выделенных лактобактерий изучается по отношению не менее чем к 5-ти тест-штаммам грамотрицательных патогенных и условно-патогенных микробов (*Salmonella typhimurium*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* и др.) методом диффузии в агар в тесте отсроченного антагонизма по Фредериксу. Критерии оценки приведены в таблице 3.

Таблица 3.

Степень АА лактобацилл

Степень выраженности АА	Степень ингибиции тест-штаммов, %
Очень высокая (ОВ)	80-100
Высокая(В)	60-79
Умеренная (У)	40-59
Слабая (С)	20-39
Очень слабая (ОС)	До 20
Отсутствие АА (-)	0

#### **4.10. Обработка полученных данных**

Индивидуальные результаты определений содержания отдельных представителей микрофлоры, выраженные в lg числа колонийобразующих единиц на 1 г фекалий, подвергаются статистической обработке с помощью критерия Стьюдента и непараметрического рангового критерия Мана-Уитни. Различия между опытной и контрольной группами признаются достоверными на уровне значимости  $P < 0,05$ . Расчеты проводятся с помощью пакетов программ EXCEL и SPSS.

#### **4.11. Оформление результата**

Результаты проведения опытных и контрольных тестов оформляются в виде таблицы, пример которой представлен ниже (таблица 4). Наряду с количественными характеристиками основных изучаемых групп, родов и видов микроорганизмов, для которых в столбцах №№ 3-4 приводятся известные из литературы средние значения популяционных уровней для взрослых животных данного вида, в таблицу заносятся установленные значения lg КОЕ/г, свидетельствующие о наличии у животных дисбиотических отклонений в микрофлоре кишечника и факторов патогенности (число гемолитически активных энтеробактерий, стафилококков, энтерококков, стрептококков, плазмокоагулирующих и лецитиназноактивных стафилококков и т.п.). Для указанных видов микроорганизмов сведения о популяционных значениях в таблице не приведены, значения у опытных животных сопоставляются с контрольными.

Показатели микробиоценоза, определённые для контрольной группы в течение эксперимента, должны находиться в пределах диапазона значений, указанных в колонках №№ 3-4 таблицы 4. В противном случае, результаты тестирования влияния наноматериалов на микрофлору кишечника признаются некорректными.

Таблица 4.

Пример оформления результатов тестирования безопасности наноматериалов на модельной системе нормальной микрофлоры кишечника в условиях *in vivo*

№№	Представители микробиоценоза	Средний популяционный уровень у взрослых животных данного вида, lg КОЕ/г (пределы колебаний)		Результат				
				Контроль	Опыт 1 (нано- материал)	Опыт 2 (традиционн ый аналог)	Р	
		мыши	крысы				Контроль / Опыт 1	Опыт 1 / Опыт 2
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Анаэробные микроорганизмы	10 - 11	9-11	.....	.....	.....	.....	.....
2	Аэробные микроорганизмы	5 - 8	7-9	.....	.....	.....	.....	.....
	Бактероиды	8 -10	8-10	.....	.....	.....	.....	.....
	Бифидобактерии	7 - 9	8-9	.....	.....	.....	.....	.....
	Лактобациллы	8 -9	8-9	.....	.....	.....	.....	.....
	Энтеробактерии	4-6	4-5	.....	.....	.....	.....	.....
	В том числе лактозонегативные и замедленно ферментирующие лактозу			.....	.....	.....	.....	.....

№№	Представители микробиоценоза	Средний популяционный уровень у взрослых животных данного вида, lg КОЕ/г (пределы колебаний)		Результат				
				Контроль	Опыт 1 (нано- материал)	Опыт 2 (традиционн ый аналог)	Р	
		мышь	крысы				Контроль / Опыт 1	Опыт 1 / Опыт 2
	энтеробактерии							
	В том числе цитратассимилирующи е энтеробактерии			.....	.....	.....	.....	.....
	Бактерии рода <i>Proteus</i>							
	Патогенные микроорганизмы ( <i>Salmonella spp.</i> )	0	0					
	Стрептококки	5 - 7	7-9	.....	.....	.....	.....	.....
	В том числе гемолитические стрептококки							
	Энтерококки		5-6					
	В том числе Энтерококки гемолитические							



№№	Представители микробиоценоза	Средний популяционный уровень у взрослых животных данного вида, lg КОЕ/г (пределы колебаний)		Результат				
				Контроль	Опыт 1 (нано- материал)	Опыт 2 (традиционн ый аналог)	Р	
		мыши	крысы				Контроль / Опыт 1	Опыт 1 / Опыт 2
	Стафилококки	4 - 5	5-6	.....	.....	.....	.....	.....
	В том числе S.aureus			.....	.....	.....	.....	.....
	Клостридии	8	2	.....	.....	.....	.....	.....
	в том числе лецитиназоположитель ные клостридии							
	Дрожжи и дрожжеподобные грибы*	Не более 5	Не более 7	.....	.....	.....	.....	.....
	Плесневые грибы		Не более 6	.....	.....	.....	.....	.....
	Прочие микроорганизмы							

\*) – у части животных

## 4.12. Интерпретация результата

6.12.1. Для оценки воздействия наноматериалов на состояние кишечной микрофлоры используются следующие критерии:

- 1) ингибция роста – снижение содержания представителей защитной резидентной микрофлоры на 1 lg КОЕ/г и более.
- 2) отсутствие ингибирующего эффекта – содержание микроорганизмов, относящихся к резидентной микрофлоре, находится в пределах одного порядка
- 3) стимуляция роста потенциально-патогенных представителей кишечного микробиоценоза, обладающих факторами патогенности.

6.12.2. На основании проведённых исследований и при условии соответствия показателей микробиоценоза у контрольных животных, тестируемый наноматериал признаётся безопасным, если:

а) не обнаружено достоверных различий между группой, получавшей наноматериалы (группы 1), и контрольной группой, а также группой, получавшей традиционный аналог наноматериала (группы 2),

б) результаты тестирования свидетельствуют о сохранении популяционных соотношений анаэробного и аэробного компонента микрофлоры; отсутствии ингибции представителей защитной микрофлоры и стимуляции роста представителей кишечного микробиоценоза, обладающих факторами патогенности; отсутствии роста патогенных микроорганизмов; отсутствии снижения АА бифидобактерий.

6.12.3. Тестируемый наноматериал признаётся отрицательно воздействующим на состояние кишечного микробиоценоза, если обнаружены достоверные различия хотя бы по одному из перечисленных в п.4.12.2.пп. «б» эффектов или эффектов, тестируемых дополнительно (АА лактобактерий, энтеробактерий).

## V. Метод оценки безопасности наноматериалов по изменению активности фермента дегидрогеназы штамма бактерий *E.coli*

### 5.1. Принцип метода

Метод основан на подавлении окислительной активности фермента дегидрогеназа микроорганизмов *E.coli* под воздействием содержащихся в воде наноматериалов и оценке степени указанного воздействия путем сравнения времени обесцвечивания метиленового синего под воздействием фермента в испытываемой и контрольной пробах.

Дегидрогеназы относят к группе ферментов класса оксидоредуктаз, катализирующих отщепление водорода от органических веществ. Они встречаются во всех живых клетках, участвуя в реакциях углеводного и жирового обмена, а также

биологического окисления. Дегидрогеназы весьма чувствительны к действию токсикантов различной природы, что дает основание по степени подавления их активности судить о биологической токсичности исследуемых наноматериалов, в частности, содержащихся в пробах воды.

## **5.2. Характеристика тест-объекта**

Штамм *E.coli* с основными стандартными свойствами, присущими организмам данного вида, может быть получен из музея штаммов *E.coli*, имеющегося в каждой бактериологической лаборатории ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора.

## **5.3. Оборудование, средства измерения, материалы, реактивы, используемые при биотестировании**

### **5.3.1. Оборудование и средства измерения**

Термостат, поддерживающий рабочую температуру 28-45<sup>0</sup>С с отклонением от заданной температуры  $\pm 1^{\circ}\text{C}$  по ТУ 64-1-1382-72

Анализатор потенциометрический, погрешность измерений рН  $\pm 0,01$  по ГОСТ 27987-88

Секундомер по ГОСТ 8.423-81

Пробирки с притертыми пробками (шлиф № 14) с рабочим объемом 23 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336–82

### **5.3.2. Реактивы**

- раствор метиленового синего х.ч. 0,01% в стерильной деионизованной воде;
- раствор пептона свежеприготовленный 1%;
- раствор хлористого натрия 0,9% стерильный (физиологический раствор) по ГФ IX, №506, С.472;
- суточная культура *E.coli* ATCC (25922).

## **5.4. Условия и процедура биотестирования**

Пробу воды, содержащей тестируемые наноматериалы, доводят до рН 7,0 $\pm$ 0,2 и вносят в три пробирки по 20 см<sup>3</sup> в каждую.

В другие три пробирки вносят по 20 см<sup>3</sup> физиологического раствора (0,9% хлористый натрий) с рН 7,0 $\pm$ 0,2.

В каждую пробирку добавляют по 1 см<sup>3</sup> растворов пептона, метиленового синего и 1 см<sup>3</sup> суточной культуры *E.coli* (из расчета получения в смеси плотности клеток – 10 КОЕ/см<sup>3</sup>).

Если предполагается, что в исследуемой воде могут содержаться наноматериалы, обладающие свойствами окислителей, что может проявляться в замедлении процесса обесцвечивания метиленового синего, дополнительно готовят контрольную группу из трех пробирок, в каждую из которых вносят по 20 мл исследуемой воды и по 1 мл растворов пептона и метиленового синего (по п. 5.3.2), но не вносят культуру *E.coli*.

Жидкость во всех пробирках по мере внесения препаратов аккуратно перемешивают, после чего закрывают пробками, вытесняя небольшой избыток жидкости, чтобы избежать образования воздушной прослойки над жидкостью.

Сразу после заполнения и герметизации все пробирки с растворами помещают в термостат с  $t=37^{\circ}\text{C}$  и осуществляют наблюдение через стекло в дверце за процессом обесцвечивания метиленового синего в результате процесса окисления. Для улучшения условий наблюдения позади пробирок устанавливают экран белого цвета (лист белой бумаги).

Начало отсчета времени обесцвечивания жидкости в пробирках фиксируют с момента помещения их в термостат. В течение первых 20-25 минут наблюдения ведут периодически, начиная с 25 минут - непрерывно, отмечая время обесцвечивания раствора в каждой пробирке. В среднем время обесцвечивания для контрольных проб с физиологическим раствором и для проб воды, не содержащих токсикантов и окисляющихся компонентов, составляет 30-40 минут.

При наличии в воде токсикантов, подавляющих активность дегидрогеназы, время обесцвечивания может существенно увеличиваться.

В этом случае при отсутствии обесцвечивания жидкости в пробирках с испытываемой пробой воды опыт прекращают по истечении времени, на 30-40% превышающего время обесцвечивания смеси с контрольным физиологическим раствором.

### **5.5. Обработка и интерпретация результатов испытаний**

Расчет относительного изменения активности фермента дегидрогеназы  $\Delta A$  под воздействием химических компонентов, содержащихся в испытываемой пробе, производят по формуле:

$$\Delta A = \frac{T_{\text{оп}} - T_{\text{к}}}{T_{\text{к}}} \cdot 100\%,$$

где  $T_{\text{оп}}$  - среднее время обесцвечивания в пробирках с опытной (испытываемой) пробой воды;

$T_{\text{к}}$  - среднее время обесцвечивания в пробирках с контрольным физиологическим раствором.

При значениях  $\Delta A < 15\%$  исследуемая проба воды, содержащей дисперсию наноматериала определённой концентрации, считается нетоксичной (не вызывающей нарушения биохимических процессов при длительном воздействии).

При значениях  $\Delta A > 15\%$  отмечается проявление токсического действия содержащихся в испытываемой воде наноматериалов на сапрофитные микроорганизмы (подавление активности гидрогеназы).

В случаях, когда  $T_{оп}$  превышает время обесцвечивания раствора в контрольных пробирках, не содержащих сапрофитных микроорганизмов, (см. п. 5.4) более чем на 15%, делают заключение о наличии в испытываемой пробе веществ-восстановителей (химически или биологически окисляющихся), что свидетельствует о неприменимости метода к данному объекту тестирования.

## **VI. Метод оценки безопасности наноматериалов с помощью люминесцентного бактериального теста**

### **6.1. Принцип метода**

Метод основан на определении изменения интенсивности биолюминесценции генно-инженерного штамма фотобактерий при воздействии водорастворимых наноматериалов, присутствующих в анализируемой пробе, по сравнению с контролем.

Люминесцентные бактерии оптимальным образом сочетают в себе различные типы чувствительных структур, подверженным биоповреждениям (клеточная мембрана, цепи метаболического обмена, генетический аппарат), с экспрессностью, объективным и количественным характером отклика целостной системы на интегральное воздействие токсикантов. Это обеспечивается тем, что люминесцентные бактерии содержат фермент люциферазу, осуществляющую эффективную трансформацию энергии химических связей жизненно важных метаболитов в световой сигнал на уровне, доступном для экспрессных и количественных измерений.

Критерием токсического действия является изменение интенсивности биолюминесценции тест-объекта в исследуемой пробе по сравнению с контрольной, не содержащей токсических веществ.

Уменьшение интенсивности биолюминесценции пропорционально токсическому эффекту. Токсическое действие исследуемой пробы наноматериала на бактерии определяется по ингибированию их биолюминесценции за 30-ти минутный (в экспрессном варианте - 5 минут) период экспозиции (при необходимости экспозиция может быть увеличена до 1-2 часов). Количественная оценка параметра тест-реакции выражается в виде индекса токсичности  $T$ , безразмерной величины, рассчитываемой по

формуле:  $T=100 (I_0 - I) / I_0$ , где  $I_0$  и  $I$  - интенсивность свечения контроля и опыта, соответственно, при фиксированном времени экспозиции исследуемой пробы с тест-объектом.

Методика допускает три пороговых уровня индекса токсичности:

- 1) допустимая степень: индекс токсичности  $T$  меньше 20;
- 2) образец токсичен: индекс  $T$  равен или больше 20 и меньше 50;
- 3) образец высокотоксичен: индекс токсичности  $T$  равен или более 50.

## **6.2. Характеристика тест-объекта “Эколюм” и прибора “Биотокс-10”**

Биосенсор “Эколюм” представляет собой лиофилизированные культуры люминесцентных бактерий, содержащиеся в среде инертных газов в специальных стеклянных флаконах. Производится в Российской Федерации согласно ТУ 2639-236-00209792-01. Биосенсор, содержащийся при температуре 2-4 °С, имеет гарантированный срок хранения не менее 6 месяцев.

Специализированный люминометр “Биотокс-10” является измерительным прибором, предназначенным для проведения токсиколого-гигиенического мониторинга объектов окружающей среды с использованием микробных биолюминесцентных сенсоров серии “Эколюм”. Сочетание биохимического датчика с электронной аппаратурой позволяет обнаруживать с высокой достоверностью чрезвычайно малые количества токсических соединений и их смесей. Портативный прибор “Биотокс-10” может осуществлять следующие функции в автоматическом режиме: определение интенсивности биолюминесценции тест-объекта, индекса токсичности пробы, усредненной величины индекса токсичности, вычисление стандартного отклонения показателя токсичности, определения величин  $EC_{20}$  и  $EC_{50}$  – пороговых значений допустимой степени и острой степени токсичности образца, исследование динамики процесса взаимодействия токсикантов с тест-объектом, компьютерная обработка данных, наличие сигнала для оператора при превышении в пробе допустимого уровня токсичности.

## **6.3. Оборудование, материалы, реактивы**

Прибор серии “Биотокс” с набором кювет для измерения биолюминесценции объемом 1,5 см<sup>3</sup> по ТУ-446-У-028-00-ОТУ

Ллиофилизированная культура микроорганизмов «Эколюм» по ТУ 2639-236-00209792-01

Весы электронные РВ 214 по ГОСТ 24104-2001

pH-метр 150 МИ по ГОСТ 50.2.036-2004

Термостат суховоздушный ТС-1/80 по ТУ 9452-002-00141798-97

Термометр лабораторный 0-55<sup>0</sup>С, цена деления шкалы – 0,5<sup>0</sup>С по ГОСТ 215-73

Сушильный электрический шкаф по ГОСТ 13474-79

Холодильник бытовой, обеспечивающий замораживание (-18 ± 1<sup>0</sup>С) и хранение проб (+2 -+4<sup>0</sup>С) по ГОСТ 26678-85

Часы сигнальные по ТУ 25-07-57

Дозаторы с переменным объемом дозирования 0,02-0,5 см<sup>3</sup> ± 1,0% по ТУ 9452-002-33189998-2002

Цилиндры вместимостью 25, 50 см<sup>3</sup> второго класса точности по ГОСТ 1770-74

Пипетки объемом 0,5 и 1,0 см<sup>3</sup> по ГОСТ 29227-91

Стаканы стеклянные лабораторные вместимостью 10 и 50 см<sup>3</sup> по ГОСТ 25336-82

Воронки лабораторные по ГОСТ 25336-82

Стаканчики для взвешивания (бюксы) диаметром 30 и 40 мм по ГОСТ 25336-82

Бумажные фильтры обеззоленные типа ФОБ (красная, белая ленты) по ТУ 6-09-1678-95

Флаконы и банки стеклянные с навинчивающейся крышкой или с притертой пробкой для хранения проб и реактивов вместимостью 10, 50, 100 см<sup>3</sup>

Подставка (из пластика, дерева) с углублением для пенициллиновых пузырьков или измерительных кювет, на которой можно разместить не менее 12 кювет

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328-77

Кислота соляная по ГОСТ 3118-77

Кислота серная по ГОСТ 4204-77

Калия бихромат по ГОСТ 4220-75

Спирт этиловый, х.ч. по ТУ 6-09-1710-77

Цинк серноокислый 7-водный по ГОСТ 4174-77

#### **6.4. Правила безопасного проведения работ**

1. При работе с химическими веществами необходимо соблюдать требования техники безопасности по ГОСТ 12.4.021-75.

2. Безопасность при работе с электроустановками обеспечивается по ГОСТ 12.1.019-79 и в соответствии с требованиями инструкций к используемому оборудованию.

3. Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004-91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009-83.

4. Используемые в качестве биотестов лиофилизированные бактерии не патогенны, однако после каждого анализа необходимо стерилизовать всю использованную посуду, остатки растворов в сушильном шкафу при 105<sup>0</sup>С в течение 1 часа.

5. Хранить тест-культуру “Эколюм” в холодильнике при температуре от  $-18^{\circ}\text{C}$  до  $+2 - +4^{\circ}\text{C}$ , следует беречь культуру лиофилизированных бактерий от нагревания и резкой смены температуры.

6. Биотестирование проводится в нормальных лабораторных условиях в соответствии с ГОСТ 15150-69 при температуре окружающего воздуха в лаборатории от  $+18$  до  $25^{\circ}\text{C}$ , атмосферном давлении 84-106 кПа (630-800 мм рт.ст.), относительной влажности воздуха  $80 \pm 5\%$ . Помещение не должно содержать токсичных паров и газов

## **6.5. Подготовка к проведению измерений**

Предварительная подготовка к выполнению биотестирования должна обеспечивать подготовку посуды, рабочего места и образцов наноматериалов для исследования их на токсичность. Все процедуры предварительной подготовки должны исключать попадание посторонних токсичных, органических и каких-либо других веществ в исследуемый образец.

### **6.5.1. Подготовка посуды для хранения проб и биотестирования**

Обычно используется посуда из стекла. Посуда для хранения проб и биотестирования промывается смесью бихромата калия и серной кислоты (хромовой смесью). Стенки посуды осторожно смачиваются хромовой смесью, после чего на 2-3 час посуда оставляется, затем она тщательно промывается водопроводной водой, нейтрализуется раствором пищевой соды и промывается 3-4 раза дистиллированной водой. Для мытья посуды не разрешается пользоваться синтетическими поверхностно-активными веществами и органическими растворителями. Посуду для хранения проб сушат на воздухе, а используемую для биотестирования, за исключением мерной, - в сушильном шкафу при  $105^{\circ}\text{C}$  в течение 1 часа.

### **6.5.2. Подготовка проб**

#### ***Подготовка проб наноматериалов***

Навеску наноматериала 0,5 мг растворить (диспергировать) в 50 мл дистиллированной воды, довести pH раствора до 6,8 – 7,4 и использовать в тестировании на токсичность. Если исследуемое нановещество высокотоксично, значение индекса токсичности T может оказаться близким к 100, в этом случае подготовленную пробу следует разбавить в 10 раз дистиллированной водой с pH 7,0 - 7,2 и повторить измерение T с учетом разведения.

#### ***Подготовка тест-объекта “Эколюм” и прибора “Биотокс-10”***

#### ***Реконструкция биосенсора «Эколюм»***



1) Вскрыть флакон с лиофилизированным биореагентом. Для получения суспензии бактерий добавить 10 см<sup>3</sup> охлажденной до 4-8<sup>0</sup>С дистиллированной воды, рН 7,0-7,4. Желательно использовать стерилизованную дистиллированную воду. Рекомендуется несколько раз встряхнуть флакон с суспензией бактерий.

2) Выдержать суспензию в холодильнике при температуре +2 - +4<sup>0</sup>С в течение 30 минут.

3) Довести температуру суспензии бактерий до комнатной температуры (15-25<sup>0</sup>С). Рекомендуется перемешивание рабочей суспензии бактерий перед отбором определенных объемов для проведения анализа.

#### *Подготовка прибора “Биотокс-10”*

Подготовку прибора “Биотокс-10” проводят в соответствии с методикой поверки прибора и инструкцией по эксплуатации.

#### *Определение рабочей концентрации биосенсора “Эколюм”*

1) Измерить фоновое значение прибора “Биотокс-10” (по инструкции к прибору, при счете 10 с без кюветы) и записать это значение.

2) Добавить 0,1 см<sup>3</sup> суспензии бактерий из флакона в кювету люминометра. Затем туда же добавить 0,9 см<sup>3</sup> дистиллированной воды (рН 7,0-7,4; комнатная температура).

3) Вставить кювету с биореагентом в люминометр и измерить величину интенсивности биолюминесценции за 10 с. Записать эту величину.

Свечение рабочей суспензии бактерий должно находиться в интервале, превышающим фоновое значение прибора в 25 - 250 раз. Если обнаруженная величина меньше указанного интервала, то увеличить добавку биосенсора (например, добавлять 0.2 мл и т.д.) и повторить измерение. Если величина больше интервала, то следует разбавить суспензию бактерий дистиллированной водой и повторить измерение.

3.4. Если у биосенсора истек гарантийный срок хранения и/или он стал плохо растворяться в холодной дистиллированной воде, рекомендуется более энергично его встряхивать и отфильтровать суспензию бактерий через бумажный фильтр.

## **6.6. Процедура биотестирования**

### **6.6.1. Оценка общей токсичности исследуемого наноматериала**

При определении индекса токсичности необходимо проводить параллельное измерение контрольных и опытных проб.

Рекомендуется выполнять не менее трех повторов опытной пробы. Для большей достоверности данных число повторов опытной пробы может быть увеличено до 10 измерений. Возможны два варианта измерений.

Первый вариант – измеряется контрольная проба и запоминается значение интенсивности свечения. Затем измеряются повторности опытной пробы, и прибор автоматически фиксирует значения индекса токсичности каждой пробы, усредненное значение индекса токсичности и погрешности измерения.

Второй вариант - измеряются последовательно три (или более) пары контрольно-опыт. В каждой паре прибор автоматически фиксирует индекс токсичности и в конце измерения выдает значения усредненного индекса токсичности пробы и значения погрешности измерения. Объем добавляемой суспензии бактерий к пробе должен быть равным в контроле и исследуемой пробе.

В стандартном анализе отбирают из флакона по  $0,1 \text{ см}^3$  рабочей суспензии бактерий и добавляют в три кюветы от люминометра контрольные и в три (или более) кюветы для пробы. Добавляют в контрольные кюветы по  $0,9 \text{ см}^3$  дистиллированной воды (рН 7,0-7,4). Добавляют в остальные кюветы опытную пробу раствора наноматериала по  $0,9 \text{ см}^3$  и фиксируют время экспозиции.

Измерение интенсивности биолюминесценции проводят с помощью прибора “Биотокс-10” согласно инструкции по эксплуатации прибора в стандартном варианте через 30 минут экспозиции. Эффективность действия токсического вещества часто изменяется во времени. Изменение во времени показаний анализа характеризует действие исследуемого вещества на свечение биосенсора: временный эффект или усиление ингибирования (аккумулирование эффекта) токсического действия. В данном случае целесообразно проследить динамику изменения индекса токсичности, проводя замеры через каждые 15 мин в течение не менее двух часов. В случае, если наблюдают в опытной пробе стимуляцию свечения биосенсора, превышающую показатель интенсивности свечения биотеста в контроле, т. е. величина  $T$  является отрицательной. Механизм стимуляции биолюминесценции неясен. Наличие эффекта стимуляция свечения биосенсора затрудняет интерпретацию оценки токсичности. В этом случае можно лишь сделать вывод о биологической активности исследуемого наноматериала.

### **6.6.2. Определение токсикологических параметров пробы ( $EC_{20}$ и $EC_{50}$ )**

Эта операция предназначена для быстрого выяснения вопроса, при каких концентрациях образца достигается установленный предел токсичности ( $EC_{20}$  и/или  $EC_{50}$ ) или при каких разведениях токсический образец станет безопасным (величины менее  $EC_{20}$ ).

$EC_{20}$  – эффективная концентрация образца наноматериала, вызывающая 20%-ное тушение свечения биосенсора по сравнению с контролем.

$EC_{50}$  – эффективная концентрация образца, вызывающая 50% тушение свечения биосенсора по сравнению с контролем.

Вычисление величин ЕС производят с использованием применяемой в токсикологии гамма-функции. Гамма-функция (G) представляет собой отношение потери интенсивности свечения пробы к оставшейся интенсивности свечения пробы и описывается формулой:  $G = (I_0 - I) / I$ , где  $I_0$  и  $I$  - интенсивность биолюминесценции в контроле и опыте, соответственно.

Функция G очень удобна для точного определения величин  $EC_{20}$  и  $EC_{50}$  путем экстраполяции графической зависимости в случаях, когда токсичность образца очень небольшая или, наоборот, когда образец сильно токсичен. График G-функции в логарифмических координатах против концентрации исследуемого вещества есть теоретически прямая линия молекулярности реакции токсического вещества с одной или несколькими мишенями, связывающими эти токсиканты в тест-объекте. Люминометр “Биотокс” позволяет автоматически представлять величины G для каждой пробы, а также вычисляет величины  $EC_{20}$  и  $EC_{50}$ . Порядок расчёта представлен в описании к прибору “Биотокс”. Применяется следующий алгоритм определения ЕС.

1) Перед измерением коэффициентов ЕС рекомендуется убедиться при измерении токсичности неразбавленной пробы, что величина G для данной пробы не превышает значения 25. В случае, если величина G больше, может увеличиться погрешность измерения величин ЕС. В таком случае необходимо развести пробу дистиллированной водой до указанного предела и учесть предварительное разбавление.

2) После вывода прибора в режим измерения ЕС для измерения параметров исследуются 4 пробы, получаемые путем разбавления исследуемого наноматериала дистиллированной водой в следующих отношениях 1:1, 1:2, 1:4 и 1:8. Для всех 4-х проб автоматически определяется G-функция, значения которой заносятся в оперативную память микроконтроллера прибора. По данным этих 4-х измерений микроконтроллер при нажатии специальной кнопки клавиатуры управления производит автоматически вычисление коэффициентов  $EC_{20}$  и  $EC_{50}$  и представляет данные на дисплее.

3) Определение гамма-функции для каждого из предварительно разведенных образцов проводят в соответствии с процедурой определения показателя индекса токсичности (п. 5.7.) за исключением введения дополнительной команды. При этом микроконтроллер по данным, хранящимся в оперативной памяти об интенсивности биолюминесценции в контрольных и опытных пробах (соответственно  $I_0$  и  $I$ ), производит вычисление G-функции с представлением результата на дисплее. При интенсивности биолюминесценции опыта большей или равной контролю вычисление не производится.

## 6.7. Обработка, интерпретация и оформление результатов

1) Оценку токсичности пробы проводят по относительному различию в интенсивности биолюминесценции контрольной и опытной проб и вычислению индекса токсичности  $T$  (прибор “Биотокс-10” позволяет автоматически вычислять индекс токсичности). Абсолютная величина интенсивности биолюминесценции контроля не имеет принципиального значения в диапазоне допустимых значений прибора “Биотокс”.

2) Индекс токсичности  $T$  есть величина безразмерная, и определяется по формуле  $T = 100 (I_0 - I) / I_0$ , где  $I_0$  и  $I$ , соответственно, интенсивность свечения контроля и опыта при фиксированном времени экспозиции исследуемого раствора с тест-объектом. Обработку результатов измерений токсичности выполняют путем расчета среднеарифметического значения величины индекса токсичности  $T$  по формуле  $T = (T_1 + T_2 + T_3) / 3$ , где  $T_1$ - $T_3$  - повторности опытной пробы. Величины  $T_1$ ,  $T_2$  и  $T_3$  получают из трех параллельных измерений контроль-опыт в короткий промежуток времени или при измерении в последовательности контроль, и затем серия опытных образцов.

3) По величине индекса токсичности анализируемые пробы наноматериалов классифицируются на три группы:

Группы	Значение «Т»	Вывод о степени токсичности пробы
1	меньше 20	допустимая степень
2	от 20 до 50	образец токсичен
3	равно или больше 50	образец высокотоксичен

4) Прибор “Биотокс-10” обеспечивает в автоматическом режиме вычисление усредненного значения индекса токсичности, погрешности измерения индекса токсичности и гамма-функции исследуемой пробы (токсикологических характеристик EC20 и EC50).

## 6.8. Контроль качества токсикологического анализа

Контроль качества оценки токсичности проводится по определению чувствительности используемых тест-организмов к модельному “эталонному” токсиканту: цинку сернокислому 7-водному ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ), растворенному в дистиллированной воде (рН 6,8-7,4). Концентрация модельного токсиканта, при действии которого через 30 минут экспозиции интенсивность биолюминесценции ингибируется не менее чем на 50%, должна быть не более  $4,4 \text{ мг/см}^3$ . В случае, если это условие не соблюдается, биосенсор не пригоден для использования.

## 6.9. Обработка данных и представление результатов анализа

Результат токсикологического анализа – индекс токсичности – представляется в виде:

$$\bar{X} \pm \sigma$$

$\bar{X}$  – среднее арифметическое определений индекса токсичности для  $n$  повторов,

$\sigma$  – среднее квадратичное отклонение,

которые определяют по общепринятым формулам

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{X} - x_i)^2}{n-1}}$$

где  $x_i$  –  $i$ -й результат определения индекса токсичности,  $n$  – число повторов.

Указанные статистические параметры вычисляются измерительным прибором «Биотокс-10» автоматически по команде оператора.

Допустимая погрешность метода, определяемая по формуле

$$\delta = (\sigma / \bar{X}) \cdot 100\%,$$

не должна превышать 15%. В противном случае измерение должно быть повторено и (или) применяемая тест-система нуждается в замене.

## VII. Количественный метод оценки безопасности наноматериалов при помощи ростовых микробиологических тестов

### 7.1. Принцип метода

Безопасность наноматериалов оценивается путем изучения влияния на ростовые свойства колоний почвенных микроорганизмов, растущих на поверхности агаризованных питательных сред. Водные суспензии или растворы образцов наноматериалов растирают по поверхности плотных питательных сред. После впитывания образцов в агар, его засевают суспензиями микробных тест-культур и проводят культивирование по стандартной методике. Этот способ нанесения наноматериала обеспечивает его непосредственный контакт с вырастающими колониями микробных тест-культур даже в том случае, если размер частиц наноматериала больше размера пор в агаровом геле.

О токсичном действии испытуемого наноматериала судят по результатам количественной оценки выживаемости и скорости роста диаметра колоний тест-культуры.

## 7.2. Характеристика используемых микроорганизмов и тест-систем

В качестве тест-микроорганизмов используют выделенные из почвы штаммы следующих микроорганизмов:

*Pseudomonas fluorescens* ATCC 27663 – Прокариот, типичный представитель почвенных аэробных грамотрицательных бактерий.

*Bacillus subtilis* ATCC 6633 – прокариот, типичный представитель почвенных аэробных грамположительных бактерий.

*Candida lipolytica* – эукариот, типичный представитель почвенных дрожжей.

Указанные штаммы могут быть получены из коллекции музейных культур ФГУН ГНЦ ПМБ, Оболенск.

## 7.3. Приборы и оборудование

Термостат, поддерживающий рабочую температуру + 28-45°C с отклонением от заданной  $\pm 1$  °C по ТУ 64-1-1382-72

Шейкер “Heidolph” или аналогичный

Ламинарный шкаф фирмы “Labconco” или аналогичный

Световой микроскоп “ZEISS” (Германия). Окуляры PL 10×/18, окулярная шкала 1 мм с ценой деления 0,01 мм, объектив CP – ACHROMAT 5×/0,12 или аналогичный

Водяная баня «TW-2» фирмы «ELMI» или аналог с диапазоном рабочих температур от +20 до +60°C

Холодильник бытовой электрический по ГОСТ 26678-85

Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности по ГОСТ 24104-2001

Анализатор ГОСТ 27987-88 потенциометрический, погрешность измерений pH  $\pm 0,01$

Дозаторы с переменным объемом дозирования «Ленпипет» 20-200 мм<sup>3</sup> с шагом 0,1 мм<sup>3</sup>, с точностью  $\pm 0,6\%$ ; 100-1000 мм<sup>3</sup> с шагом 1 мм<sup>3</sup>, с точностью  $\pm 3\%$  по ТУ 9452-002-33189998-2002

Перчатки резиновые по ГОСТ 3-88

Колбы плоскодонные конические разной вместимости по ГОСТ 1770-74

Чашки Петри одноразового применения диаметром 90 мм по ТУ 9393-018-17121966-2004

Цилиндры стеклянные мерные лабораторные вместимостью 25, 100, 1000 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770-74

Наконечники пластиковые объемом 1-200 мм<sup>3</sup>

Наконечники пластиковые объемом 200-1000 мм<sup>3</sup>.

#### **7.4. Материалы и реактивы**

Питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-агар) (ФГУН ГНЦ ПМБ, Оболенск)

Физиологический раствор (0,85% NaCl; ГФ СССР IX, №506, С.472) для титрования микроорганизмов.

Допускаются к использованию реагенты и материалы аналогичного назначения других изготовителей, разрешенные к применению в установленном порядке и с характеристиками, обеспечивающими проведение исследований в соответствии с данными методическими указаниями.

#### **7.5. Методика введения тестируемого образца**

Стерильные водные суспензии наноматериалов в различных концентрациях вносят дозатором на поверхность ГРМ-агара и далее засевают тестируемыми микроорганизмами, как описано в п.7.6. Диспергирование наноматериалов проводится в воде путём встряхивания и обработки ультразвуком. Не допускается применение при диспергировании детергентов и органических растворителей. В исключительных случаях допускается внесение наноматериала на носителе (матрикс), токсичность которого должна быть проверена в серии отдельных тестов.

#### **7.6. Методика проведения анализа**

1. Из тест-культур, находящихся в экспоненциальной (4-6 ч роста на косяке ГРМ-агара) фазе роста, в физиологическом растворе готовят серию десятикратных разведений от  $10^8$  до  $10^2$  КОЕ/мл.

2. В чашки с ГРМ-агаром вносят по 0,1 мл из двукратных разведений испытуемых наноматериалов. Суспензию наноматериала растирают по поверхности агара и через 30 мин вместе с контрольными чашками без наноматериала засевают по 0,1 мл из пробирок, содержащих  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  и  $10^2$  КОЕ/мл тест-культуры. Инкубацию опытных и контрольных чашек проводят в термостате при 28 °С в течение 24-72 часов, просматривая чашки 2 раза в сутки.

3. По мере появления колоний на чашках производят их подсчёт и измерение диаметра при помощи окулярной шкалы микроскопа. Для измерений выбирают от пяти до десяти хорошо изолированных колоний, диаметр каждой из которых в процессе роста измеряют четыре раза в диапазоне от 0,2 до 1,5 мм.

## 7.7. Обработка и интерпретация данных

Статистическую обработку данных и расчеты проводят при помощи стандартного пакета программ “Excel”.

Количественную оценку действия наноматериалов на микробные тест-культуры производят, характеризуя летальный, угнетающий, стимулирующий и модифицирующий рост эффекты (таблица 5).

Таблица 5.

Виды действующих эффектов наноматериалов, определяемых количественным ростовым микробиологическим тестом

Вид эффекта	Определяющие признаки
Летальный	Полная или частичная гибель клеток
Угнетающий	Клетки не гибнут, но скорость их роста (размножения) замедляется
Стимулирующий	Скорость роста (размножения) клеток увеличивается
Модифицирующий	Клетки не гибнут, скорость их роста не меняется, но изменяются пространственные характеристики роста колоний

Летальный эффект оценивают через следующие показатели:

-  $LC_{50}$  – концентрация наноматериала, при которой число КОЕ относительно контроля уменьшилась на 50%.

-  $LC_{90}$  – концентрация наноматериала, при которой число КОЕ относительно контроля уменьшилась на 90%.

Значения  $LC_{50}$  и  $LC_{90}$  определяют из эмпирических уравнений регрессии, построенных по данным опыта в координатах “ $C - КОЕ$ ”. Стандартную ошибку находят из уравнений регрессии, построенных в координатах “ $C - (КОЕ - \sigma)$ ” и “ $C - (КОЕ + \sigma)$ ”, где  $C$  – концентрация наноматериала, КОЕ – арифметическое среднее полученных в опыте результатов подсчета числа выросших колоний при данной концентрации наноматериала, а  $\sigma$  – их стандартное отклонение по выборке. Из двух значений найденных таким образом величин стандартной ошибки выбирают наибольшую по абсолютной величине.

Угнетающий, стимулирующий и модифицирующий рост эффекты оценивают через следующие показатели:

-  $K_D$  – линейная скорость роста диаметра колоний;

-  $D_{24}$  – диаметр колоний к 24 часам инкубирования;

-  $t_{1mm}$  – время достижения колониями диаметра в 1 мм;

-  $\mu_m$  – максимальная удельная скорость роста биомассы колоний.



Значения  $K_D$  определяют как тангенс угла наклона из эмпирических уравнений линейной регрессии, построенных по результатам измерения диаметра колоний в координатах “ $t - D$ ”, где  $t$  – время инкубации (в часах), а  $D$  – диаметр колоний (в мм). Пример определения представлен на рисунке 1.

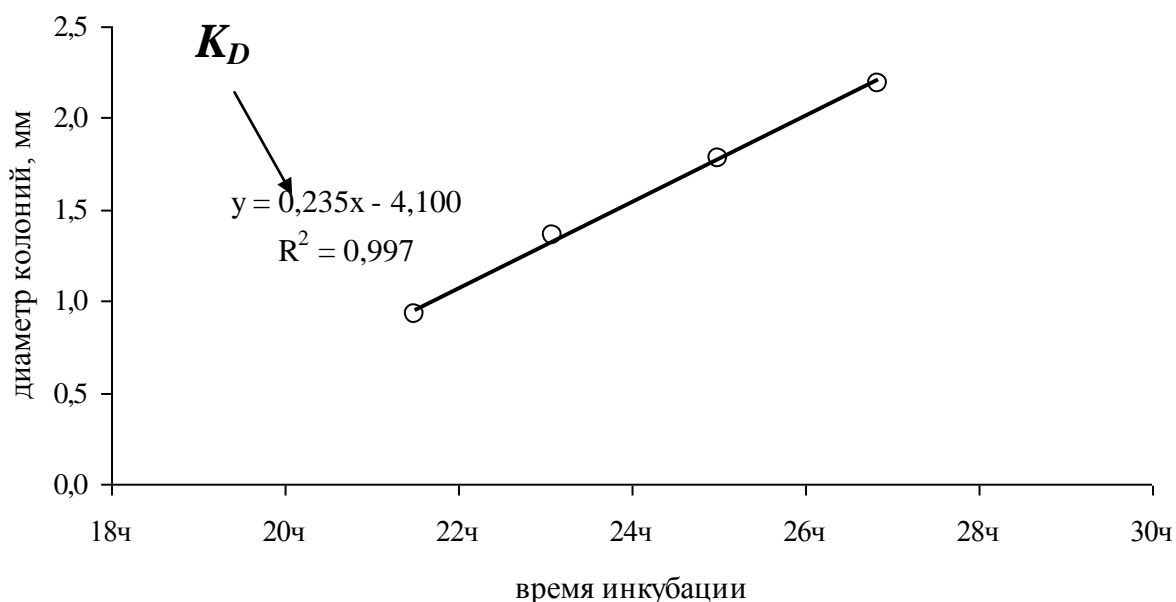


Рисунок 1. Пример определения значения показателя  $K_D$  для роста колоний *Ps. fluorescens* ATCC 27663 на ГРМ-агаре.

Значения  $D_{24}$  определяют построенных по формуле:

$$D_{24} = D + K_D(24 - t),$$

где  $D$  – измеренная в опыте величина диаметра колонии в момент инкубации  $t$ .

Значения  $t_{1mm}$  определяют по формуле:

$$t_{1mm} = t - \frac{D - 1}{K_D}.$$

Значение величины  $\mu_m$  определяют в соответствии с математической упрощенной моделью роста диаметра колоний одноклеточных микроорганизмов [2,3] по формуле:

$$t = \frac{D}{K_D} + \frac{2[\ln(2K_D / \mu'_m D_0) - 1]}{\mu'_m},$$

где  $D_0$  – эффективный диаметр клетки – родоначальницы колонии.

Пример учёта результатов представлен в таблицах 6 и 7.

Пример учета результатов летального эффекта наноматериала

Образец наноматериала, мг/мл	<i>Ps. fluorescens</i>		
	разведение	КОЕ	
		в чашках	среднее, в % от контроля
0	$10^2$	21	100±11
	$10^2$	22	
	$10^3$	175	
	$10^3$	241	
Концентрация 1	$10^2$	8	36±6
	$10^2$	9	
	$10^3$	65	
	$10^3$	54	
Концентрация 2	$10^3$	3	0,9±0,35
	$10^4$	14	
	$10^4$	18	
	$10^5$	120	

Таблица 7.

Порядок представления результатов определения угнетающего, стимулирующего и модифицирующего рост эффектов наноматериалов

<i>Ps. fluorescens</i>									
Образец 1, мг/мл	посев -	Дата	час	мин	диаметр колонии №..., мм				
					№1	№2	№3	№4	№5
	1-е измерение								
	2-е измерение								
	3-е измерение								
	4-е измерение								

Используются следующие критерии для оценки воздействия наноматериалов на тест-объекты:

- если количество КОЕ/чашку и величина  $\mu_m$  тест-штаммов на средах с испытуемым наноматериалом и на средах без него достоверно не отличаются, то делается вывод об отсутствии влияния испытуемой концентрации наноматериала (безопасный наноматериал);

- если количество КОЕ/чашку тест-штаммов на средах с испытуемым наноматериалом и на средах без него достоверно отличается, то делается вывод о летальном эффекте испытуемой концентрации наноматериала (сильно токсичный наноматериал);

- если количество КОЕ/чашку тест-штаммов в средах с испытуемым наноматериалом и в средах без него достоверно не отличается, а величина  $\mu_m$  на опытных

чашках меньше, чем в контрольных, то делается вывод об угнетающем влиянии испытуемой концентрации наноматериала (умеренно токсичный наноматериал);

- если количество КОЕ/чашку тест-штаммов в средах с испытуемым наноматериалом и в средах без него достоверно не отличается, а величина  $\mu_m$  на опытных чашках больше, чем в контрольных, то делается вывод о стимулирующем действии испытуемой концентрации наноматериала (безопасный наноматериал);

- если количество КОЕ/чашку и величина  $\mu_m$  тест-штаммов на средах с испытуемым наноматериалом и на средах без него достоверно не отличается, а отличны показатели  $K_D$ ,  $D_{24}$  и  $t_{1mm}$ , то делается вывод о модифицирующем действии испытуемой концентрации наноматериала (слабо токсичный наноматериал).

## 7.8. Представление результата

Результаты представляются в виде таблиц, примеры которых приведены ниже (таблицы 8 и 9).

Таблица 8.

Порядок предоставления результатов тестов по оценке летального эффекта наноматериалов

Наноматериал	<i>Ps. fluorescens</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>C. lipolytica</i>	
	$LC_{50}$ , МГ/МЛ	$LC_{90}$ , МГ/МЛ	$LC_{50}$ , МГ/МЛ	$LC_{90}$ , МГ/МЛ	$LC_{50}$ , МГ/МЛ	$LC_{90}$ , МГ/МЛ
Образец 1						
Образец 2						
Образец 3						
Образец 4						

Таблица 9.

Порядок предоставления результатов тестов по оценке угнетающего, стимулирующего и модифицирующего рост эффектов наноматериала

<i>Ps. fluorescens</i>				
показатели роста	Концентрация наноматериала			
	0 (контроль)	Концентрация 1	Концентрация 2	Концентрация 3
$D_{24}$ , (мм)				
$t_{1mm}$ (ч)				
$K_D$ (мм/ч)				
$\mu_m$ , (ч <sup>-1</sup> )				
Вид эффекта				
Токсичность				

## **VIII. Оценка мутагенной активности наноматериалов в тесте Эймса**

### **8.1. Принцип метода**

Данный метод предназначен для выявления способности наноматериалов индуцировать генные мутации (замена пар оснований в молекуле ДНК или сдвиг рамки считывания генетического кода) у индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium*. При наличии мутаций у индикаторных штаммов наблюдается индукция реверсий от ауксотрофности по гистидину к прототрофности.

В тесте Эймса нецелесообразно изучать наночастицы и наноматериалы с выраженной антибактериальной активностью (например, нанодисперсные или наноинкапсулированные антибактериальные препараты).

Бактерии обрабатывают тестируемым наноматериалом и его традиционным аналогом с системой метаболической активации или без метаболической активации. После инкубации подсчитывают количество ревертантных колоний у разных тестерных штаммов, обработанных наноматериалом, в сравнении с количеством спонтанных ревертантов в вариантах негативного контроля (необработанные культуры, культуры, обработанные носителем наноматериала или его традиционным аналогом).

### **8.2. Лабораторные штаммы**

Исследования выполняют на бактериях *Salmonella typhimurium*, минимальный набор состоит из штаммов TA 97, TA 98 и TA 100, сконструированных из исходного штамма *S.typhimurium* LT-2 дикого типа. Все эти штаммы содержат различного типа мутации в гистидиновом опероне, что приводит к их ауксотрофности по гистидину.

При необходимости могут использоваться другие виды и штаммы микроорганизмов.

Каждый штамм должен быть проверен на ауксотрофность по гистидину, чувствительность к кристаллическому фиолетовому и устойчивость к ампициллину. Тестерные штаммы должны иметь уровень спонтанных ревертантов в пределах ожидаемого на основании данных литературы.

### **8.3. Приборы и оборудование**

Термостат, поддерживающий рабочую температуру 28-45°C с отклонением от заданной  $\pm 1^{\circ}\text{C}$  по ТУ 64-1-1382-72

Морозильная камера, обеспечивающая температуру  $-20^{\circ}\text{C}$  или ниже

Ламинарный шкаф марки ЛШ1 фирмы «Віокот» или аналогичный

Центрифуги со скоростью вращения ротора до 12000 об/мин для пробирок вместимостью 15 см<sup>3</sup> и 1,5 см<sup>3</sup>

Встряхиватель вибрационный типа «Вортекс» со скоростью вращения до 3000 об/мин

Холодильник бытовой электрический по ГОСТ 26678-85

Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности по ГОСТ 24104-2001

Мембранные установки для получения деионизованной воды по ОСТ 11-029.003-80

Анализатор потенциометрический, погрешность измерений pH  $\pm 0,01$  по ГОСТ 27987-88

Облучатель бактерицидный настенный ОБН-150

Дозаторы с переменным объемом дозирования «Gilson» 0,2 – 2,0 мм<sup>3</sup> с шагом 0,01 мм<sup>3</sup>, с точностью  $\pm 1,2\%$ ; 2- 20 мм<sup>3</sup> с шагом 0,01 мм<sup>3</sup>, с точностью  $\pm 0,8\%$ ; 1 – 10 см<sup>3</sup> с шагом 0,1 см<sup>3</sup>, с точностью  $\pm 0,5\%$ .

Дозаторы «Ленпипет» 0,5 – 10,0 мм<sup>3</sup> с шагом 0,01 мм<sup>3</sup>, с точностью  $\pm 0,8\%$ ; 20– 200 мм<sup>3</sup> с шагом 0,1 мм<sup>3</sup>, с точностью  $\pm 0,6\%$ ; 100 – 1000 мм<sup>3</sup> с шагом 1 мм<sup>3</sup>, с точностью  $\pm 3\%$  по ТУ 9452-002-33189998-2002

Пробирки стерильные типа «Эппендорф» объемом 1,5 см<sup>3</sup>

Пробирки стерильные с крышкой «Costar» вместимостью 15 см<sup>3</sup> или аналогичные

Наконечники пластиковые объемом 1-200 мм<sup>3</sup>

Наконечники пластиковые объемом 200-1000 мм<sup>3</sup>

Перчатки резиновые по ГОСТ 3-88

Колбы плоскодонные конические разной вместимости по ГОСТ 1770-74

Цилиндры стеклянные мерные лабораторные вместимостью 25, 100, 1000 см<sup>3</sup> по ГОСТ 1770-74

Воронки стеклянные по ГОСТ 25336-82

Флаконы стерильные объемом 100 и 200 см<sup>3</sup> «Costar» или аналогичные

Гомогенизатор Поттера с тефлоновым пестиком

Камера Горяева по ТУ 64-1-816-77

Чашки Петри пластиковые, диаметр 100 мм по ТУ 9453-010-00480201-95

#### **8.4. Материалы и реактивы**

Фенобарбитал

Хлорид калия, производства фирмы «Sigma»

Хлорид магния, производства фирмы «Sigma»

Хлорид натрия, производства фирмы «Sigma»

Нитрозометилмочевина, производства фирмы «Sigma»

2,7-диамино-4,9-диокси-5,10-диоксо-4,5,9,10-тетрагидро-4,9-дiazопирен  
(ДДТДП), производства фирмы «Sigma»

9-аминоакридин производства фирмы «Sigma»

Циклофосфан производства фирмы «Sigma»

Мясо-пептонный бульон

Мясо-пептонный агар

Фосфатный буфер,

Никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ), производства фирмы «Sigma»

Глюкозо-6-фосфат, производства фирмы «Sigma»

L-гистидин, производства фирмы «Merck»

Ампициллин

Кристаллический фиолетовый

Допускаются к использованию реагенты и материалы аналогичного назначения других изготовителей, разрешенные к применению в установленном порядке и с характеристиками, обеспечивающими проведение исследований в соответствии с данными методическими указаниями.

## 8.5. Приготовление препарата для метаболической активации

В качестве системы экзогенной метаболической активации используется фракция S9 печени крыс, обработанных фенобарбиталом. Самцам крыс массой 200 г внутрибрюшинно вводят фенобарбитал в дозе 80 мг/кг (трехкратно, в течение 3-х суток до забоя). Крыс кормят по стандартному рациону вивария, позволяют свободно пить.

Перед забоем в течение 12 часов крысам не дают пищи, забивают животных оглушающим ударом по голове или декапитацией после цервикального смещения.

В асептических условиях извлекают из животных печени, взвешивают их, промывают стерильным раствором 0,1 М хлорида калия, охлажденным до 0-2°C, измельчают стерильными ножницами, а затем в гомогенизаторе Поттера с тефлоновым пестиком. При гомогенизации на 1 г сырой массы печени берут 3 см<sup>3</sup> 0,15 М хлорида натрия, все операции проводят на льду. Центрифугируют гомогенат в центрифуге с охлаждением при 9000 g в течение 10 мин и разливают надосадочную жидкость (S9 фракция) на аликвоты, которые быстро замораживают с помощью смеси твердой углекислоты (сухой лёд) со спиртом или ацетоном или в жидком азоте и хранят в морозильной камере при -80°C (либо в жидком азоте) до момента использования.

При проведении эксперимента аликвоты S9 фракции размораживают на льду и используют в течение одного дня. Образцы следует проверить на бактериальное

загрязнение, в случае необходимости смесь S9 перед использованием можно профильтровать через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

### **8.6. Дозы тестируемого наноматериала**

Максимальная доза тестируемого наноматериала определяется его токсичностью и растворимостью. Токсичность тестируемого вещества может изменяться при использовании экзогенной метаболической активации.

Для нетоксичных хорошо растворимых наноматериалов максимальная доза может быть в пределах 1000-5000 мкг/чашку. Для наноматериалов, обладающих бактерицидной активностью, максимальная доза должна подавлять рост бактерий не более, чем на 50%, что определяется либо по уменьшению количества спонтанных ревертантов, либо по подавлению роста бактериального газона (для 10 см чашки площадь зоны лизиса бактерий должна составлять не более 40 см<sup>2</sup>).

Традиционный аналог наноматериала при постановке теста Эймса вносят в тех же дозах, что и тестируемый наноматериал.

Использование нерастворимых наноматериалов допускается в виде порошков, суспензий, взвесей, возможно применение специальных носителей, которые не должны оказывать мутагенное действие на используемые в тесте микроорганизмы, что подтверждается дополнительными исследованиями.

При приготовлении дисперсии тестируемых наноматериалов необходимо применять физические методы диспергирования (перемешивание, встряхивание, ультразвуковая обработка). Применение детергентов не допускается. В порядке исключения допустимо введение дисперсии наноматериалов в органических растворителях, отсутствие у которых мутагенного действия подтверждено в дополнительных контрольных тестах.

В эксперименте необходимо проверять не менее 5 различных доз тестируемого наноматериала и его традиционного аналога, различающихся в 10 раз. Обычно исследуемые образцы берут в стандартных концентрациях 0,1; 1; 10; 100 и 1000 мкг/чашку.

### **8.7. Методика проведения анализа**

В каждом эксперименте обязательны одновременно проводимые негативный (необработанный или обработанный дисперсионной средой) и позитивный контроли.

Позитивные контроли должны быть специфичны для каждого тестерного штамма. Позитивный контроль для вариантов с метаболической активацией должен соответствовать типу используемой системы экзогенной метаболической активации.

Опыт параллельно ведут с использованием полной (ПМАС) и неполной (НМАС) микросомальной активирующей среды для регистрации действия как прямых мутагенов, так и непрямых, образующихся под влиянием микросомальных монооксигеназ печени млекопитающего и учитываемых при работе с микросомальной фракцией.

В качестве позитивных контролей, индуцирующих мутации у тест-штаммов в условиях отсутствия метаболической активации (НМАС), используют нитрозометилмочевину (100 мкг/чашку) для штамма ТА100; 2,7-диамино-4,9-диокси-5,10-диоксо-4,5,9,10-тетрагидро-4,9-диазопирен (ДДТДП) (100 мкг/чашку) для штамма ТА98; 9-аминоакридин (50 мкг/чашку) для штамма ТА97. В качестве позитивного контроля, индуцирующего мутации у тест-штаммов в присутствии метаболической активации (ПМАС), используют циклофосфан в дозе 500 мкг/чашку.

На каждый контрольный и опытный образец берут по 3 чашки. Эксперимент повторяют дважды. Результаты эксперимента учитывают при наличии мутагенного эффекта во всех вариантах позитивного контроля.

Ночную культуру *S.typhimurium* подращивают до плотности  $2-3 \times 10^8$  клеток/мл при  $37^\circ\text{C}$  и покачивании в мясо-пептонном бульоне, центрифугируют при 1800 g 15 минут, осадок ресуспендируют в 0,02 М фосфатном буфере, повторно центрифугируют в этом же режиме и ресуспендируют в том же буфере до плотности  $10^9$  клеток/мл. Количество клеток в суспензии определяют при помощи счетных камер, например камеры Горяева. Подсчитывают число клеток микроорганизмов в камере Горяева в 10 больших квадратах. Для получения достоверного результата общее число подсчитанных клеток микроорганизмов должно быть не более 600. При подсчете количество клеток в большом квадрате не должно превышать 20, в противном случае исходную суспензию разводят водой. Затем находят среднее арифметическое значение и вычисляют количество клеток по формуле:

$$M = a \times 1000 \times n / h \times S,$$

где M – число клеток в 1 мл суспензии; h - глубина камеры (0,1 мм); S - площадь квадрата сетки ( $1/25 \text{ мм}^2$ ); a - среднее число клеток в квадрате; n - степень разведения.

Готовят микросомальную активирующую смесь: на 1 мл смеси - 0,3 мл фракции S9, нормированной по содержанию белка (4 мг на чашку), 4 мМ НАДФ, 5 мМ глюкозо-6-фосфат, 8 мМ хлорид магния, 30 мМ хлорид калия, 0,1 М фосфатный буфер (рН 7,4). Полная микросомальная активирующая смесь (ПМАС) содержит фракцию S9 и кофакторы (НАДФ и глюкозо-6-фосфат), необходимые для активного функционирования системы микросомального окисления. Неполную микросомальную активирующую смесь (НМАС) получают, добавляя вместо кофакторов растворитель (либо воду).



Далее составляют инкубационную смесь, включающую 100 мкл индикаторных бактерий, тестируемый наноматериал или его традиционный аналог или дисперсионную среду в объеме 100 мкл и 500 мкл ПМАС (или НМАС), которую вносят в 2 мл полужидкого агара при 45-46°C, перемешивают и выливают на слой селективного агара в чашки Петри. Продолжительность времени внесения микросомальной активирующей смеси и разлива полужидкого агара на чашки не должна превышать 10-15 секунд. Чашки оставляют при комнатной температуре на 30-40 мин и после полного застывания агара переносят в термостат на 37°C. Учет результатов проводят через 48-72 часа.

### **8.8. Обработка результатов**

Учет результатов проводят путем подсчета среднего числа колоний ревертантов, выросших на опытных и контрольных чашках, и стандартного отклонения.

Если ни в одном из вариантов на данном штамме (штаммах) не получено статистически значимых результатов, эксперимент прекращают.

В случае обнаружения позитивного результата опыт повторяют только на том штамме (штаммах), на котором был выявлен эффект.

Если максимальный эффект зарегистрирован на одной из промежуточных доз наноматериала (что возможно при работе с образцами, обладающими бактерицидными свойствами), прибегают к дроблению доз. При этом за среднюю точку принимают дозу, на которой был выявлен максимальный эффект. В опыт вводят еще 4 варианта: дозы в 2 и 5 раз меньше и больше средней дозы.

Если при проведении повторного опыта эффект не обнаруживается, проводится еще один дополнительный опыт, результат которого сравнивают с первыми двумя экспериментами. Заключение о наличии или отсутствии мутагенной активности испытуемого наноматериала делают на основании двух опытов с совпадающими результатами.

Статистический анализ выполняют с помощью метода множественных сравнений Даннета. Различие между положительными и отрицательными контрольными группами признаются достоверными на уровне значимости  $P < 0,05$ . Расчеты проводят с помощью пакетов программ EXCEL и SPSS.

### **8.9. Представление и интерпретация результатов**

Результаты проведения эксперимента представляются в виде таблицы, пример которой представлен ниже (таблица 10).

Представление результатов оценки мутагенной активности наноматериалов в тесте Эймса.

Варианты опыта	Концентрация, мкг/чашку	Среднее число колоний ревертантов на чашку с различными штаммами <i>S.typhimurium</i>					
		ТА 97		ТА 98		ТА 100	
		НМАС	ПМАС	НМАС	ПМАС	НМАС	ПМАС
Отрицательный контроль:							
Дистиллированная вода	-						
Тестируемое вещество:							
Нано-материал	0,1						
	1						
	10						
	100						
	1000						
Традиционный аналог наноматериала	0,1						
	1						
	10						
	100						
	1000						
Позитивные контроли:							
Циклофосфан	500						
Нитрозо-метил-мочевина	100						
ДДТДП	100						
9-амино-акридин	50						

Результаты проведённого эксперимента признаются корректными, если все позитивные контроли дают статистически достоверное увеличение количества

ревертантных колоний по сравнению с отрицательным контролем ( $P < 0,05$ ). Заключение о наличии или отсутствии мутагенной активности испытуемого наноматериала делают на основании двух опытов с совпадающими результатами. В случае применения растворителей или каких-либо носителей, для них должно быть доказано отсутствие мутагенного эффекта на используемые в работе штаммы микроорганизмов.

На основании проведённых тестов наноматериал признаётся мутагенным, т.е. способным индуцировать генные мутации типа замены пар оснований или сдвига рамки считывания у данного штамма микроорганизма, если наблюдается статистически достоверное, зависимое от дозы увеличение количества колоний ревертантов в нескольких либо в одной экспериментальной точке в вариантах с использованием ПМАС и НМАС при сравнении с отрицательным контролем и традиционным аналогом наноматериала. Статистически достоверное увеличение количества колоний ревертантов в вариантах с использованием НМАС говорит о прямом мутагенном действии наноматериала, а в вариантах с использованием ПМАС – о прямом и непрямом мутагенном действии, обусловленном действием мутагенных метаболитов, образующихся под влиянием наноматериала.

На основании проведённых тестов наноматериал признаётся немутагенным для использованных штаммов *Salmonella typhimurium*, если не наблюдается статистически достоверное увеличение количества колоний ревертантов в нескольких либо в одной экспериментальной точке при сравнении с показателями в отрицательном контроле и группе с традиционным аналогом наноматериала.

Статистическая достоверность увеличения количества колоний ревертантов оценивается методом множественных сравнений с контрольной группой Даннета. Для статистической оценки результатов высчитываются критерии Даннета по формуле:

$$q' = \bar{X}_a - \bar{X}_k / \sqrt{S^2 (1/N_k + 1/N_a)},$$

где  $\bar{X}_k$  и  $\bar{X}_a$  – сравниваемые средние значения в контроле и опыте соответственно,  $S^2$  – внутренняя групповая дисперсия,  $N_k$  и  $N_a$  – численность контрольной и опытной групп. Средние значения для всех групп упорядочиваются по абсолютной величине их отличия от контрольной группы, сравнения начинают с группы, наиболее отличной от контрольной. Если различия с очередной группой не найдены, вычисления прекращают. Внутреннюю групповую дисперсию вычисляют по следующей формуле:

$$S^2 = \sum S^2_n / n,$$

где  $\sum S^2_n$  – сумма квадратов стандартных отклонений в сравниваемых группах,  $n$  – число групп.

Вычисленное значение критерия Даннета  $q'$  сравнивается с критическим табличным значением. Критическое значение зависит от уровня значимости (для биологических экспериментов его значение равно 0,05), числа степеней свободы  $\nu$  и интервала сравнения  $l$ , который равен числу групп сравнения, включая контрольную (в данном случае  $l$  постоянно и равно 6). Число степеней свободы  $\nu$  равно разности суммы численностей всех групп и числа групп, в нашем случае оно равно:  $6 \times 3 - 6 = 12$ . Таким образом, в данном эксперименте критическое табличное значение критерия Даннета  $q = 2,90$ . Если вычисленное значение критерия Даннета  $q'$  больше критического ( $\geq 2,90$ ), то различия между группами являются статистически достоверными и наноматериал является мутагенным для использованных штаммов *Salmonella typhimurium*, а если вычисленное значение критерия Даннета  $q'$  меньше критического, то исследуемый наноматериал является немутагенным.

**Список использованных сокращений**

АА	Антагонистическая активность
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ДДТДП	2,7-диамино-4,9-диокси-5,10-диоксо-4,5,9,10-тетрагидро-4,9- диазопирен
КОЕ	Колониеобразующая единица
НМАС	Неполная микросомальная активирующая среда
ПМАС	Полная микросомальная активирующая среда
P	Вероятность
ЕС	Эффективная концентрация

## Термины и определения

**Наночастицы** - частицы, линейные размеры которых по каждому из трех измерений более 1 и менее 100 нм;

**Наноматериалы** - материалы и продукция, в которых существенным компонентом, определяющим их свойства и назначение, являются входящие в их состав наночастицы;

**Нанотехнологии** - совокупность методов и приемов, обеспечивающих возможность контролируемым образом создавать и модифицировать объекты, включающие компоненты с размерами менее 100 нм хотя бы в одном измерении, и в результате этого получившие принципиально новые качества, позволяющие осуществить их интеграцию в полноценно функционирующие системы большого масштаба;

**Традиционный аналог наноматериала** – материал с химическим составом, эквивалентным химическому составу наноматериала, но имеющий минимальные размеры частиц по любому из измерений не менее 1000 нм.

**Безопасность наноматериалов** – отсутствие у наноматериалов вредных (неблагоприятных) эффектов воздействия на организм человека, домашних и сельскохозяйственных животных, культурные растения, организмы, доминирующие в природных биоценозах, гидробионты, почвенные микроорганизмы на всех стадиях жизненного цикла наноматериалов, включая их разработку, производство, транспортировку, хранение, оборот, использование и утилизацию.

**Стандартные образцы (стандарты)** – образцы наноматериалов, включенные в банк эталонных образцов и используемые при калибровке применяемых методов оценки безопасности наноматериалов.

**Документация** — записи в любой форме, которые описывают методы проведения и/или результаты исследования наноматериалов, а также факторы, влияющие на проведение исследования, и действия, совершаемые при проведении исследования.

**Материалы исследования наноматериалов** — комплект документов изучения содержания наноматериалов в объектах природной среды, включающий описание методов исследований, протоколы проведенных испытаний и отчеты по результатам исследований, оформленные в соответствии с утвержденными формами.

**Отчет** — представленные в письменной форме результаты исследования наноматериалов в объектах природной среды, включающие описание инструментальных, биологических и статистических методов, данные, полученные в ходе исследования, и выводы.

**Первичные данные исследования** — документы, отражающие наблюдения и манипуляции, проводимые во время исследования (записи в рабочих листах, лабораторных журналах, фотографии, распечатки с автоматизированных приборов, записи на магнитных носителях, записи об эксплуатации и техническом обслуживании оборудования, расчетные процедуры).

**Протокол исследования** — документ, который описывает задачи, методологию, процедуры, методы статистической обработки данных и организацию исследования.

**Руководитель исследования** — лицо, ответственное за проведение исследования.

**Стандартные операционные процедуры** — документы, в которых детально изложено выполнение определенных лабораторных процедур, которые, как правило, не детализированы в протоколах исследований и методических руководствах.

**Тест-объект(ы)** – специально подобранный(е) микроорганизм(ы) или их компоненты, чувствительный(е) к действию наноматериалов и подготовленный(е) в лабораторных условиях к биотестированию, а также естественные микробиоценозы, ассоциированные с определенными органами (системами) органов организма животного.

**Тест-реакция** – изменение выбранного показателя жизнедеятельности тест-объекта под воздействием наноматериала.

**Микробиологическое тестирование наноматериалов** – экспериментальное определение токсичности наноматериала на основе оценки изменений определенных показателей жизнедеятельности микробиологического(их) тест-объекта(ов) *in vitro* или состава и свойств нормальной микрофлоры кишечника *in vivo*.

**Молекулярно-генетическое тестирование наноматериалов** - экспериментальное определение токсичности наноматериала на основе изменений в структуре и функции наследственного аппарата (ДНК) микробиологического тест-объекта.

**Воспроизводимость результатов биотестирования** – характеристика качества биотестирования, отражающая близость результатов, полученных по одной методике, на одном и том же эталонном наноматериале, но в различных условиях.

**Запасной раствор наноматериалов** – концентрированная водная дисперсия исследуемого наноматериала, из которой готовят растворы (дисперсии) с разными концентрациями этого вещества.

**Концентрация средняя летальная (LC<sub>50</sub>)** – концентрация токсического вещества, вызывающая гибель 50 % тест-объектов при установленных условиях экспозиции в течение заданного срока наблюдений.

**Критерий токсичности** – установленное значение изменения выбранного показателя жизнедеятельности тест-объекта, на основании которого делают вывод о токсичности тестируемого наноматериала.

**Токсичность наноматериала** – способность наноматериала, нарушать жизнедеятельность тест-объектов.



## Нормативные ссылки

1. Закон Российской Федерации от 30 марта 1999 года № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».
2. Закон Российской Федерации от 02 января 2000 года № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов».
3. Закон Российской Федерации от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании».
4. Закон Российской Федерации от 26 июня 2008 года N 102-ФЗ «Об обеспечении единства измерений».
5. Закон Российской Федерации от 10.01.2002 г. № 7-ФЗ «Об охране окружающей среды».
6. Постановление Правительства Российской Федерации от 21 декабря 2000 года № 987 «О государственном надзоре и контроле в области обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов».
7. Постановление Правительства Российской Федерации от 21 декабря 2000 года № 987 «О государственной регистрации новых пищевых продуктов, материалов и изделий».
8. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 23 июля 2007 года № 54 «О надзоре за продукцией, полученной с использованием нанотехнологий и содержащей наноматериалы».
9. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 31 октября 2007 года № 79 «Об утверждении Концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов».
10. Приказ Минздрава Российской Федерации от 19 июня 2003 г. N 267 «Об утверждении Правил лабораторной практики».
11. Приказ Министерства здравоохранения СССР № 755 от 12 августа 1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных».
12. Санитарные правила СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»

13. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы СанПиН 2.1.4.1074-01 "Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества".

14. Методические указания МУ 1.2.2520-09 «Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности наноматериалов»

15. Методические рекомендации МР 1.2.2522-09 «Выявление наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека».

16. Методические рекомендации МР 1.2.2566-09 «Оценка безопасности наноматериалов *in vitro* и в модельных системах *in vivo*».