



КонсультантПлюс
надежная правовая поддержка

"Методика экспрессного определения интегральной химической токсичности питьевых, поверхностных, грунтовых, сточных и очищенных сточных вод с помощью бактериального теста "Эколюм". Методические рекомендации N 01.021-07"
(утв. Роспотребнадзором 15.06.2007)

Документ предоставлен **КонсультантПлюс**

www.consultant.ru

Дата сохранения: 24.09.2018

Источник публикации

М., Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007

Примечание к документу

Название документа

"Методика экспрессного определения интегральной химической токсичности питьевых, поверхностных, грунтовых, сточных и очищенных сточных вод с помощью бактериального теста "Эколюм". Методические рекомендации N 01.021-07"
(утв. Роспотребнадзором 15.06.2007)

Утверждаю
Главный врач ФГУЗ
"Федеральный центр гигиены
и эпидемиологии"
Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека,
Председатель Лабораторного
Совета Федеральной службы
по надзору в сфере защиты
прав потребителей
и благополучия человека
А.И.ВЕРЕЦАГИН
15 июня 2007 года

**МЕТОДИКА
ЭКСПРЕССНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНТЕГРАЛЬНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ
ТОКСИЧНОСТИ ПИТЬЕВЫХ, ПОВЕРХНОСТНЫХ, ГРУНТОВЫХ, СТОЧНЫХ
И ОЧИЩЕННЫХ СТОЧНЫХ ВОД С ПОМОЩЬЮ БАКТЕРИАЛЬНОГО
ТЕСТА "ЭКОЛЮМ"**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
N 01.021-07**

1. Методические рекомендации разработаны: ГУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина РАМН (Михайлова Р.И., Ревазова Ю.А., Севостьянова Е.М.), Московским государственным университетом им. М.В. Ломоносова (Данилов В.С.), ФГУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора (Брагина И.В., Ластенко Н.С., Федосеева Т.А.).

2. С выходом настоящих методических рекомендаций утрачивают силу методические рекомендации "Методика экспрессного определения интегральной токсичности воды с помощью люминесцентного бактериального теста "Эколюм" от 8 июня 2000 г. МР N 11-1/133-09.

1. Назначение и область применения

Настоящий документ устанавливает методику определения интегральной химической токсичности питьевых, поверхностных пресных, грунтовых, сточных и очищенных сточных вод, атмосферных осадков в лабораторных и полевых условиях. Тест-система представлена биосенсорами серии "Эколюм" и измерительным прибором серии "Биотокс-10". Биосенсор реагирует на токсичные соединения разнообразной химической природы и смеси веществ.

Документ предназначен для учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации и специальных служб федеральных органов исполнительной власти, осуществляющих ведомственный санитарно-эпидемиологический надзор.

Опасность загрязнения воды определяется уровнем ее возможного отрицательного влияния на контактирующие среды, пищевые продукты и прямо или опосредовано на человека.

Результаты обследования качества воды учитывают при определении и прогнозе степени ее опасности для здоровья и условий проживания населения в населенных пунктах, технических решений по реабилитации и охране водосборных территорий, оценке эффективности санитарно-противоэпидемических мероприятий и текущего санитарно-эпидемиологического надзора контроля над объектами, воздействующими на окружающую среду населенного пункта.

2. Нормативные ссылки

1. Федеральный закон "О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения" от 30 марта 1999 г. N 52-ФЗ в редакции Федерального закона от 22 августа 2004 г. N 122-ФЗ.

2. СанПиН 2.1.5.980-2000. Санитарные правила и нормы. Гигиенические требования к охране поверхностных вод. Водоотведение населенных мест, санитарная охрана водных объектов.

3. СанПиН 2.1.4.1116-2002. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. Питьевая вода и водоснабжение населенных мест. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества.

4. ГОСТ 17.1.1.01-07 "Охрана природы. Гидросфера. Использование и охрана вод. Основные термины и определения".

ГОСТ 15.1.5.05-85 "Охрана природы. Гидросфера. Общие требования к отбору поверхностных и морских вод, льда и атмосферных осадков".

5. ГОСТ 27065-86 "Качество вод. Термины и определения".

6. ГОСТ Р 8.563-96. ГСИ "Методики выполнения измерений".

3. Термины и определения

Экотоксикологический государственный контроль осуществляется с целью регулярного слежения за соблюдением нормативов качества окружающей среды и предупреждения попадания токсических веществ в водные объекты.

Химическое загрязнение воды - изменение химического состава воды, возникшее под прямым или косвенным воздействием производственной деятельности и вызывающее снижение ее качества и возможную опасность для здоровья населения.

Токсичность - степень проявления ядовитого действия разнообразных химических соединений и их смесей. Токсичность - один из важных факторов, определяющих качество воды, достаточно информативный, существенно дополняющий наше представление о степени опасности или безопасности воды при ее использовании, являющийся необходимой составной частью комплексной системы контроля при стандартном анализе воды.

Критерий токсичности (индекс токсичности) - достоверное количественное значение тест-параметра, на основании которого делается вывод о токсичности воды. Среди тест-параметров наиболее часто используются выживаемость, плодовитость, подавление ферментативной и метаболической активности организмов.

Тест-реакция - это изменение какого-либо биохимического, морфологического, поведенческого или функционального показателя у тест-объекта под воздействием токсиканта или их смесей.

Биотестирование - проведение анализов по определению токсичности с помощью живых организмов. Результаты оперативно сигнализируют об опасном воздействии химического загрязнения на жизнедеятельность организмов, причем не по отдельным компонентам, а по их смесям, часто неизвестной природы и не выявляемых другими методами анализа токсических веществ.

Токсические эффекты, регистрируемые методами биотестирования, включают комплексный, синергический, антагонистический и дополнительные воздействия всех химических, физических и биологических компонентов, присутствующих в исследуемой воде, неблагоприятно влияющие на физиологические, биохимические и генетические функции тест-организмов.

Биолюминесценция - интенсивное свечение в видимой области спектра, отражающее специфическую ферментативную функцию и общую метаболическую активность организмов.

4. Принцип методики

В качестве тест-объекта используются препараты лиофилизированных люминесцентных бактерий или ферментные препараты бактериальной люциферазы. Методика основана на определении изменения

интенсивности биолюминесценции биосенсора при воздействии химических веществ, присутствующих в анализируемой пробе воды, по сравнению с контролем. Люминесцентные бактерии оптимальным образом сочетают в себе различные типы чувствительных структур, ответственных за генерацию биоповреждений (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.

При изучении токсикологических свойств водных образцов люминесцентный бактериальный тест показывает хорошую корреляцию с их действием на животных, культуры клеток человека и другие известные биотесты.

Критерием токсического действия является измерение с помощью прибора "Биотокс-10" интенсивности биолюминесценции тест-объекта под воздействием химических соединений, содержащихся в анализируемой пробе воды по сравнению с раствором, не содержащим токсических веществ. Уменьшение интенсивности биолюминесценции пропорционально токсическому эффекту.

5. Количественная оценка параметров тест-реакции

Токсическое действие исследуемой пробы на тест-объект определяется по уменьшению интенсивности биолюминесценции за 30-минутный (в экспрессном варианте - 5 минут) период экспозиции. Количественные оценки тест-реакции выражаются в виде безразмерной величины - индекса токсичности "Т" и функциональными токсикологическими параметрами ЕС20 и ЕС50.

Индекс токсичности "Т", равный отношению $T = 100 (I_0 - I) / I_0$, где I_0 и I - соответственно интенсивность биолюминесценции контроля и опыта при фиксированном времени экспозиции исследуемой пробы с биосенсором.

Токсикологические параметры пробы. ЕС20 и ЕС50, определяемые также посредством измерения I_0 и I , позволяют быстро и экономно выяснить вопрос, при каких объемах исходного слабо токсического образца достигается установленный предел токсичности (ЕС20 и/или ЕС50) или при каких разведениях сильно токсический образец станет нетоксичным (величины менее ЕС20). ЕС50 есть эффективный объем образца (в опытах с чистым химическим соединением - концентрация), вызывающий тушение свечения биосенсора на 50% по сравнению с контролем. В этом случае образец высоко токсичен (индекс токсичности равен 50). ЕС20 есть эффективный объем образца (в опытах с чистым химическим соединением - концентрация), который приводит к 20%-ному тушению свечения биосенсора по сравнению с контролем. В этом случае образец токсичен (индекс токсичности равен 20). Все значения величин менее ЕС20 свидетельствуют о том, что образец не токсичен. Вычисление величин ЕС проводят с использованием гамма-функции. Гамма-функция (G) представляет собой зависимость отношения потери интенсивности свечения пробы к оставшейся интенсивности свечения пробы и описывается формулой $G = (I_0 - I) / I$, где I_0 и I - соответственно интенсивность биолюминесценции в контроле и опыте. Функция G очень удобна для точного определения величин ЕС20 и ЕС50 путем экстраполяции графической зависимости в случаях, когда токсичность образца очень небольшая или, наоборот, когда образец высоко токсичен. График G-функции в логарифмических координатах как функция изменения объема пробы (или концентрации отдельного вещества) есть теоретически прямая линия молекулярности реакции токсического вещества с одной или несколькими мишенями, связывающими эти токсиканты в тест-объекте. Люминометр "Биотокс-10" позволяет представлять величины G для каждой пробы, а также автоматически вычисляет величины ЕС20 и ЕС50.

Методика предусматривает три пороговых уровня индекса токсичности:

- допустимая степень токсичности образца: индекс токсичности T меньше 20; объем пробы или концентрация вещества в пробе меньше величины ЕС20;

- образец токсичен: индекс T равен или больше 20 и меньше 50; объем пробы (или концентрация вещества в пробе) меньше величины ЕС50 и больше или равен ЕС20;

- высокая токсичность образца: индекс токсичности Т равен или более 50; объем пробы (или концентрация вещества в пробе) равен или больше величины ЕС50.

6. Оборудование, материалы, реактивы

1. Лиофилизированная культура микроорганизмов "Эколюм" или ферментные препараты бактериальной люциферазы, ТУ 2639-236-00209792-01.

2. Прибор серии "Биотокс-10", сертификат об утверждении типа средств измерений RU.C.31,003.A N 21703, с набором кювет для измерения биолюминесценции объемом 1,5 мл.

3. Весы лабораторные общего назначения, ГОСТ 24104.

4. рН-метр, ГОСТ 25.7416.0171, или аналоги.

5. Термометр лабораторный 0 - 55 °С, цена деления шкалы - 0,5 °С, ГОСТ 215.

6. Сушильный электрический шкаф, ГОСТ 13474.

7. Холодильник бытовой, обеспечивающий замораживание (-18 +/- 1 °С) и хранение проб (2 - 4 °С).

8. Часы сигнальные, ТУ 25-07-57.

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

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

11. Пипетки автоматические, дозаторы любого типа объемом 0,02 - 0,5 мл +/- 1,0%.

12. Цилиндры вместимостью 25, 50 мл второго класса точности, ГОСТ 1770.

13. Стаканы стеклянные лабораторные вместимостью 10, 50 мл, ГОСТ 25336.

14. Пипетки объемом 0,5 и 1,0 мл, ГОСТ 29227.

15. Пробоотборник любого типа объемом не менее 5 мл.

16. Флаконы и банки, стеклянные с навинчивающейся крышкой или с притертой пробкой для отбора и хранения проб и реактивов вместимостью 10, 50, 100 мл.

17. Воронки лабораторные, ГОСТ 25336.

18. Стаканчики для взвешивания (бюксы) диаметром 30, 40 мм, ГОСТ 7148.

19. Вода дистиллированная, ГОСТ 6709.

20. Натрия гидроокись, ГОСТ 4328.

21. Кислота соляная, ГОСТ 3118.

22. Кислота серная, ГОСТ 4204.

23. Спирт этиловый, х.ч., ТУ 6-091710.

24. Цинк сернокислый 7-водный, ГОСТ 4174;

25. Бумага индикаторная универсальная для измерения рН.

7. Характеристика тест-объекта "Эколюм" и прибора

"Биотокс-10"

Биосенсор "Эколюм" представляет собой лиофилизированные люминесцентные бактерии или бесклеточные препараты, содержащие бактериальную люциферазу. Производится в соответствии с требованиями ТУ 2639-236-00209792-01. Биосенсор находится в стеклянных флаконах в среде инертных газов. При температуре 2 - 4 °С и ниже имеет гарантированный срок хранения не менее 1 года.

Специализированный люминометр "Биотокс-10" является измерительным прибором, предназначенным для проведения экологического мониторинга объектов окружающей среды с использованием биолюминесцентных биосенсоров серии "Эколюм". Сочетание биохимического датчика с современной электронной аппаратурой позволяет обнаруживать с высокой достоверностью чрезвычайно малые количества токсических соединений и их смесей. В приборе используется простая и надежная технология отбора и предъявления проб, которая безопасна при проведении экологической экспертизы как в лабораторных, так и полевых условиях.

Портативный прибор "Биотокс-10" может осуществлять следующие функции в автоматическом режиме: определение интенсивности биолюминесценции тест-объекта, индекса токсичности пробы и усредненной величины индекса токсичности; вычисление стандартного отклонения показателя токсичности. Прибор проводит определение величин ЕС20 и ЕС50 - пороговых значений допустимой степени и высокой степени токсичности образца; исследование динамики процесса взаимодействия токсикантов с тест-объектом, компьютерную обработку данных измерения.

8. Условия безопасного проведения работ

8.1. При работе с химическими веществами и сточными водами необходимо соблюдать требования техники безопасности по ГОСТ 12.4.021.

8.2. Рабочие столы и поверхности должны содержаться в чистоте. В конце дня проводится влажная уборка рабочих поверхностей.

8.3. Безопасность при работе с электроустановками обеспечивается по ГОСТ 12.1.019 и в соответствии с требованиями инструкций к оборудованию.

8.4. Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

8.5. Используемые в качестве биотестов лиофилизированные бактерии не патогенны, однако после каждого анализа необходимо стерилизовать всю использованную посуду, остатки растворов в сушильном шкафу при 105 °С в течение 1 часа.

8.6. Хранить биосенсор "Эколюм" в холодильнике при температуре от -18 °С до 2 - 4 °С, следует беречь биосенсор от нагревания и резкой смены температуры.

9. Требования к квалификации лиц, проводящих биотестирование

Определение токсичности по настоящей методике выполняется оператором с квалификацией лаборант, имеющий опыт работы в области водной токсикологии.

10. Условия выполнения измерений

Биотестирование проводится в нормальных лабораторных условиях в соответствии с ГОСТ 15150. Помещение не должно содержать токсичных паров и газов. Возможно проведение измерений в полевых условиях при наличии источника питания 12 вольт.

Температура окружающего воздуха в лаборатории от 15 до 30 °С. Относительная влажность воздуха 80 +/- 5%. Атмосферное давление 84 - 106 кПа (630 - 800 мм рт. ст.).

При использовании электроприборов частота переменного тока 50 +/- 1 Гц. Напряжение сети 220 +/-

10 В. При использовании прибора "Биотокс-10" в полевых условиях питание от аккумулятора напряжением 12 В.

Освещение помещения естественное или искусственное, не ограничивается особыми требованиями.

11. Подготовка к проведению измерений

Предварительная подготовка к отбору проб и выполнению биотестирования должна обеспечивать подготовку посуды, пробоотборников, мест хранения отобранных проб, а также подготовку рабочего места для обработки доставленных в лабораторию проб и исследования их на токсичность. Все процедуры предварительной подготовки должны исключать попадание каких-либо химических веществ в исследуемую воду.

11.1. Подготовка посуды для отбора, хранения проб и биотестирования

Обычно используется посуда из стекла, а при наличии в воде нефтепродуктов, моющих средств и пестицидов используются банки из темного стекла.

Посуда для отбора проб и биотестирования должна быть химически чистой. Она 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 отбора проб сушат на воздухе, а используемую для биотестирования - в сушильном шкафу при 105 °С в течение 1 часа.

Химически чистая посуда для биотестирования должна храниться закрытой стеклянными притертыми пробками или завинчивающимися крышками в защищенных от пыли ящиках лабораторного стола или на закрытых полках, стеллажах и т.п.

11.2. Отбор, транспортировка, хранение и подготовка проб

11.2.1. Объем пробы воды для определения токсического действия составляет 10 мл.

Отбор проб, транспортировка и хранение грунтовых вод осуществляется в соответствии с ГОСТ Р 51592-00 "Вода. Общие требования к отбору проб".

Отбор проб в поверхностных проточных и непроточных водоемах осуществляется в соответствии с ГОСТ 17.1.5.05-85 "Охрана природы. Гидросфера. Общие требования к отбору проб поверхностных и морских вод, льда и атмосферных осадков".

Отбор проб питьевых вод осуществляется в соответствии с ГОСТ Р 51593-00 "Вода. Отбор проб".

Пробы питьевой воды в источнике водоснабжения и сточной воды с глубиной менее 0,5 м отбираются пробоотборником любого типа объемом 10 - 50 мл.

Водопроводную воду отбирают из-под крана после 5-минутного слива, кран антисептической обработке не подвергается.

Отбор сточных вод осуществляется в соответствии с ГОСТ Р 51592-2000 "Вода. Общие требования к отбору проб".

Отбор природных и сточных вод следует проводить в местах наибольшего перемешивания. Сточные воды отбираются на средней глубине потока, где твердые частицы равномерно распределены.

При исследовании сточных вод на токсичность не допускается отбор разовой пробы. Количество необходимых порций выбирают на основе опыта проведения анализа. Предпочтительно отбирать

среднесуточную пробу каждый час в течение 24 часов, после тщательного перемешивания всего объема отобранной пробы для исследования берется необходимое количество воды.

Допустимое минимальное количество отбираемых единичных проб для последующего смешения - три, с интервалом между отборами не менее часа.

Не допускается консервирование проб, предназначенных для исследования на токсичность.

Обычно используется посуда из стекла, а при наличии в воде нефтепродуктов, моющих средств и пестицидов используются банки из темного стекла. Посуда для отбора проб и биотестирования должна быть химически чистой. Она 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 отбора проб сушат на воздухе, а используемую для биотестирования, за исключением мерной, - в сушильном шкафу при 105 °С в течение 1 часа.

Химически чистая посуда для биотестирования должна храниться с закрытыми стеклянными притертыми пробками или завинчивающимися крышками в защищенных от пыли ящиках лабораторного стола или на закрытых полках, стеллажах и т.п.

Стеклянные кюветы к люминометру промывают хромовой смесью. Затем они тщательно промываются водопроводной водой и в конце - несколько раз дистиллированной водой. Пластиковые кюветы рекомендуется использовать один раз.

При отборе пробы составляется протокол по утвержденной форме, в котором указывается цель пробоотбора, число, время, место отбора пробы, температура воды, номер пробы, Ф.И.О. отбравшего. На бутылку или флакон наклеивается этикетка с указанием номера пробы, места и даты отбора.

11.2.2. Биотестирование проб воды проводят не позднее 6 часов после их отбора. При невозможности проведения анализа в указанный срок пробы воды охлаждают (2 - 4 °С). Хранить пробы следует не более 24 часов после отбора. В исключительных случаях допускается замораживание проб (-18 °С) и их хранение до двух недель, однако следует помнить, что после размораживания токсичность воды может измениться. В случае предполагаемого замораживания пробы при ее оттаивании не следует заполнять сосуды полностью, чтобы избежать их разрыва. Если пробы требуется оттаивать или фильтровать, то фильтрация и оттаивание должны предшествовать замораживанию.

Перед биотестированием предварительно охлажденные или замороженные пробы доводят до комнатной температуры.

При наличии в сточных водах крупнодисперсных включений (с диаметром частиц более 3,5 мкм) необходима фильтрация пробы через пористые обеззоленные фильтры - белая или красная ленты.

Природные воды фильтруют через фильтр с диаметром пор 3,5 мкм.

Проба воды, подлежащая биотестированию, должна иметь рН 6,5 - 8,0, если рН пробы выходит за указанные пределы, подкисление осуществляют раствором HCl, подщелачивание - раствором NaOH.

Образцы атмосферных осадков в виде снега и воды в форме льда перед анализом нагреваются до комнатной температуры.

11.3. Подготовка тест-объекта "Эколюм" и прибора "Биотокс-10"

11.3.1. Подготовка прибора "Биотокс-10" проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

11.3.2. Реконструкция тест-системы "Эколюм".

11.3.2.1. Вскрыть флакон с лиофилизированным биосенсором. Добавить 10 мл дистиллированной воды (комнатная температура, pH 6,8 - 7,4) - получают исходную суспензию биопрепарата. В случае необходимости pH дистиллированной воды доводят до нужного диапазона подщелачиванием раствором NaOH или подкислением раствором HCl. При отсутствии такой воды или ее плохом качестве можно использовать стандартный физиологический раствор.

11.3.2.2. Выдержать суспензию биопрепарата в течение 30 минут, периодически перемешивая.

11.3.2.3. Держать флакон с суспензией можно на лабораторном столе при нормальном освещении. Рекомендуется перемешивание суспензии перед каждым отбором определенных объемов для проведения анализа.

11.3.2.4. 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 через бумажный фильтр.

11.3.3. Определение рабочей концентрации тест-системы "Эколюм".

11.3.3.1. Измерить фоновое значение прибора "Биотокс-10" (по инструкции к прибору) и записать это значение.

11.3.3.2. Добавить 0,1 мл исходной суспензии из флакона в кювету люминометра. Затем туда же добавить 0,9 мл дистиллированной воды (pH 6,8 - 7,4; комнатная температура).

11.3.3.3. Вставить кювету с биосенсором в люминометр и измерить величину интенсивности биолюминесценции.

11.3.3.4. Рекомендуется, чтобы интенсивность свечения биосенсора находилась в интервале, превышающем фоновое значение прибора в 100 - 500 раз. Если величина свечения намного больше верхнего предела, то рекомендуется разбавить исходную суспензию дистиллированной водой и повторить измерение.

12. Процедура биотестирования

12.1. Определение индекса токсичности

При определении индекса токсичности необходимо проводить параллельное измерение контрольных (не содержащих токсических веществ) и опытных проб. Рекомендуется иметь не менее трех повторностей опытной пробы. Для большей достоверности данных число повторностей опытной пробы может быть увеличено до 10 измерений. Существует два варианта измерений. Первый вариант - измеряется контрольная проба и прибор запоминает 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 контроль-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 может быть произвольным, но равным в контроле и исследуемой пробе.

12.1.1. При стандартном анализе отбирают из флакона по 0,1 мл рабочей суспензии биосенсора и добавляют в три кюветы от люминометра контрольные и три (или более - до 10) кюветы для пробы. Добавляют в контрольные кюветы по 0,9 мл дистиллированной воды (pH 6,8 - 7,4). Добавляют в остальные кюветы по 0,9 мл опытной пробы, замечают время экспозиции и через определенный интервал измеряют интенсивность биолюминесценции бактерий.

12.1.2. Измерение интенсивности биолюминесценции и индекса токсичности проводят с помощью прибора "Биотокс-10" согласно инструкции по эксплуатации прибора в стандартном варианте через 30 минут экспозиции. В экспрессном варианте допустимо проведение анализа через 5 минут.

12.2. Определение токсикологических параметров пробы, ЕС20 и ЕС50

КонсультантПлюс: примечание.

В официальном тексте документа, видимо, допущена опечатка: имеется в виду п. 12.1, а не п. 11.1.

Эта операция предназначена для быстрого выяснения вопроса, при каких объемах исходного слабо токсического образца достигается установленный предел токсичности (ЕС20 и/или ЕС50) или при каких разведениях сильно токсический образец станет безопасным (величины менее ЕС20). При этом происходит регистрация величины индекса токсичности измеряемого образца, и поэтому этот вариант измерения токсикологических параметров автоматически включает в себя определение индекса токсичности образца согласно п. 11.1.

ЕС50 есть эффективный объем образца, вызывающий тушение свечения биосенсора на 50% по сравнению с контролем. В этом случае образец высоко токсичен. ЕС20 есть эффективный объем образца, который приводит к 20%-ному тушению свечения биосенсора по сравнению с контролем. В этом случае образец токсичен. Все значения величин менее ЕС20 свидетельствуют о том, что образец не токсичен.

Вычисление величин ЕС проводят с использованием достаточно известной в токсикологии гамма-функции. Гамма-функция (G) представляет собой зависимость отношения потери интенсивности свечения пробы к оставшейся интенсивности свечения пробы и описывается формулой $G = (I_0 - I) / I$, где I_0 и I - соответственно интенсивность биолюминесценции в контроле и опыте. Функция G очень удобна для точного определения величин ЕС20 и ЕС50 путем экстраполяции графической зависимости в случаях, когда токсичность образца очень небольшая или, наоборот, когда образец высоко токсичен. График G-функции в логарифмических координатах концентрации пробы есть теоретически прямая линия молекулярности реакции токсического вещества с одной или несколькими мишенями, связывающими эти токсиканты в тест-объекте. Люминометр "Биотокс-10" позволяет автоматически представлять величины G для каждой пробы, а также вычисляет величины ЕС20 и ЕС50 (см. описание к прибору "Биотокс-10").

КонсультантПлюс: примечание.

В официальном тексте документа, видимо, допущена опечатка: имеется в виду п. 12.1, а не п. 10.1.

12.2.1. Рекомендуется перед измерением коэффициентов ЕС убедиться при измерении токсичности (п. 10.1) 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.

12.2.2. После вывода прибора в режим измерения ЕС (см. инструкцию к прибору) для измерения параметров исследуются 4 пробы: исходная (обозначена на дисплее прибора, как 1:1) и 3 пробы, получаемые путем последовательного разбавления в два раза исходной пробы дистиллированной водой в отношениях 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 специальных кнопок клавиатуры управления производит автоматически вычисление коэффициентов ЕС20 и ЕС50 и представляет данные на дисплее.

При интенсивности биолюминесценции любого из 4-х образцов больше контроля или равных ему вычисление параметров ЕС не производится. Если исходный образец имеет интенсивность биолюминесценции больше контроля, то для изучения параметров ЕС его необходимо концентрировать. В случае если исходный образец имеет интенсивность биолюминесценции меньше контроля, но последние разбавления дают активацию свечения, рекомендуется сильно уменьшить степень разбавления исходного образца.

13. Обработка и оценка результатов

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

13.2. Индекс токсичности "Т" 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 "Т" по формуле $T = (T_1 + T_2 + T_3) / 3$, где $T_1 - T_3$ - повторности (до 10) 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.

13.3. В случае наличия токсичности пробы (T равно или больше 20) можно определить, насколько это связано со значениями рН исследуемого раствора. Для этого измеряют рН пробы и, если величина рН находится за пределами 6,5 - 8,0, приводят рН до значений 6,8 - 7,4 и повторяют измерение токсичности.

13.4. В ряде случаев возможен вариант, когда интенсивность биолюминесценции в анализируемой пробе больше, чем в контроле. В таком случае независимо от величины отрицательного значения "Т" делается вывод об отсутствии токсичности образца, и индекс токсичности принимает нулевое значение.

13.5. Представленные прибором показатели параметров ЕС показывают, насколько надо разбавить анализируемую пробу, чтобы достичь уровня токсичности (ЕС20) или острой токсичности (ЕС50).

13.6. По величине индекса токсичности и параметров ЕС анализируемые пробы классифицируются на три группы:

Таблица 1

Группы	Величина индекса токсичности "Т"	Величина параметра ЕС	Степень токсичности пробы
1	меньше 20	концентрация пробы меньше величины ЕС20	допустимая степень токсичности
2	от 20 до 49,99	концентрация пробы меньше величины ЕС50 и больше или равна ЕС20	образец токсичен
3	равна или больше 50	концентрация пробы, равная или больше величины ЕС50	высокая токсичность образца

13.7. Прибор серии "Биотокс-10" обеспечивает в автоматическом режиме вычисление усредненного значения индекса токсичности, погрешности измерения индекса токсичности и гамма-функции исследуемой пробы (токсикологических характеристик - ЕС20 и ЕС50).

13.8. Результат токсикологического анализа представляется в виде [протокола](#) (Приложение 1).

14. Контроль погрешности методики токсикологического анализа

14.1. Контроль качества оценки токсичности воды проводится по определению чувствительности тест-системы "Эколюм" к модельному "эталонному" токсиканту цинку сернокислому 7-водному ($ZnSO_4 \times 7H_2O$), растворенному в дистиллированной воде (рН 6,8 - 4 2

7,4). Концентрация модельного токсиканта, при действии которого через 30 минут экспозиции интенсивность биолюминесценции ингибируется не менее чем на 50%, должна быть не более 7,0 мг/куб. дм цинка сернокислого.

Испытания проводят в соответствии с прописью методики в трех независимых опытах. Если концентрация модельного токсиканта, вызвавшая острую токсичность, находится в интервале 6,0 - 7,0 мг/куб. дм цинка сернокислого, то чувствительность тест-объекта соответствует необходимым требованиям. Если концентрация модельного токсиканта, вызвавшая острую токсичность, не находится в данном интервале, то следует проверить точность приготовления исследуемых растворов, условий проведения опытов. Если ошибки при проведении опытов исключены, необходимо сменить исходный материал.

14.2. Оперативный контроль сходимости проводится при анализе каждой рабочей пробы.

15. Форма представления результатов анализа

Результат токсикологического анализа в документах - индекс токсичности, предусматривающих его использование, представляется в виде:

$$\bar{X} \pm s, \text{ при } P = 0,95,$$

\bar{X} - среднее арифметическое определений.

За результат анализа (\bar{X}) принимают среднее арифметическое результатов трех (или более - до 10) параллельных измерений индекса токсичности. Индекс токсичности Т вычисляется по формуле $T = 100 (I_{\text{контр.}} - I_{\text{опыт.}}) / I_{\text{контр.}}$, где $I_{\text{контр.}}$ и $I_{\text{опыт.}}$ - соответственно интенсивности биолюминесценции бактерий в контрольной и опытной пробах.

Среднее квадратичное отклонение (сигма) результатов определений количественного выражения тест-реакции - индекса токсичности вычисляется по формуле:

$$\text{сигма} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}},$$

где:

X_i - i -й результат определений;

i

n - число параллельных определений.

Среднее арифметическое \bar{X} результатов определений количественного выражения тест-реакций вычисляется по формуле:

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

Все указанные статистические параметры вычисляются измерительным прибором "Биотокс-10" автоматически по команде оператора.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ

1. Федеральный закон "О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения" от 30 марта 1999 г. N 52-ФЗ в редакции Федерального закона от 22 августа 2004 г. N 122-ФЗ.
2. СанПиН 2.1.5.980-2000. Санитарные правила и нормы. Гигиенические требования к охране поверхностных вод. Водоотведение населенных мест, санитарная охрана водных объектов.
3. СанПиН 2.1.4.1116-2002. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. Питьевая вода и водоснабжение населенных мест. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества.
4. МУ 2.1.4.1184-03. Методические указания по внедрению и применению санитарно-эпидемиологических правил и нормативов СанПиН 2.1.4.1116-2002 "Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. Питьевая вода и водоснабжение населенных мест. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества".
5. ГОСТ 17.1.1.01-07 "Охрана природы. Гидросфера. Использование и охрана вод. Основные термины и определения".
6. ГОСТ 15.1.5.05-85 "Охрана природы. Гидросфера. Общие требования к отбору поверхностных и морских вод, льда и атмосферных осадков".
7. ГОСТ 30813-2002 "Вода и водоподготовка. Термины и определения".
8. ГОСТ Р 8.563-96. ГСИ "Методики выполнения измерений".
9. Фомин Г.С. Вода. Контроль химической, бактериальной и радиационной безопасности по международным стандартам. Энциклопедический справочник. М., Протектор, 1995.
10. Методы биотестирования качества водной среды. /Под ред. О.Ф. Филенко. М., Изд-во МГУ, 1989.
11. Методы биотестирования вод. Черноголовка, ГК ОП СССР, 1988.
12. Оценка и регулирование качества окружающей природной среды. Учебное пособие для инженера-эколога. /Под ред. А.Ф. Порядина и А.Д. Хованского. М., НУМЦ Минприроды России, Изд. дом "Прибой", 1966.
13. Жмур Н.С. Государственный и производственный контроль токсичности вод методами биотестирования в России. М., Межд. Дом сотрудничества, 1997.
14. Данилов В.С., Егоров Н.С. Бактериальная биолюминесценция. М., Изд-во МГУ, 1985.
15. Альтернативные методы исследований (экспресс-методы) для токсиколого-гигиенической оценки материалов, изделий и объектов окружающей среды. Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России. М., 1999.
16. МР N 11-1/133-09. Методические рекомендации "Методика экспрессного определения интегральной токсичности воды с помощью люминесцентного бактериального теста "Эколюм" от 8 июня 2000 г.
17. Оценка токсичности материалов, изделий и объектов окружающей среды на альтернативных биологических моделях (экспресс-методы). М., Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004, 220 с.

18. Скачков В.Б. Обоснование и разработка экспресс-методов контроля гигиенической безопасности среды обитания. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук. Москва, 2002, 46 с.

Приложение 1
(рекомендуемое)

Наименование учреждения, выдавшего протокол

ИСПЫТАТЕЛЬНЫЙ ЦЕНТР

Аттестат аккредитации
Регистрация в реестре

ПРОТОКОЛ N
определения токсичности пробы с помощью биотеста "Эколюм"
и прибора "Биотокс-10"

Наименование учреждения/отдела

Вид испытаний

Токсикологической

N образца

оценки

От "___" _____ 200_ г.

Наименование образца:

Наименование предприятия-изготовителя:

Наименование заявителя (отдела):

Упаковка, маркировка, описание образца:

НД на методы испытаний:

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ

Показатели токсичности	Критерии оценки	Вывод о степени токсичности пробы
Индекс токсичности	меньше 20 - допустимая степень токсичности; от 20 до 50 - образец токсичен; равно или больше 50 - образец сильно токсичен.	
Величина ЕС	объем или концентрация пробы меньше величины ЕС20 - допустимая степень токсичности; объем или концентрация пробы меньше величины ЕС50 и больше или равно ЕС20 - образец токсичен; объем или концентрация пробы меньше величины ЕС50 и больше или равно ЕС20 - образец сильно токсичен.	

Испытания проведены: _____
(Ф.И.О. лиц, проводивших испытание)

(Дата)

Заключение, рекомендации:

Вывод о токсичности образца

Результаты испытаний распространяются только на представленные образцы.

Частичная перепечатка протокола запрещена.

Руководитель ИЛЦ _____
(Ф.И.О.)

(Дата)