“УТВЕРЖДАЮ” Руководитель Департамента госсанэпиднадзора Минздрава России
А.А.Монисов 08 июня 2000 г. МР№ 11-1/134-09
Дата введения 2000 г.

# Определение общей токсичности почв по интенсивности биолюминесценции бактерий

**Методические рекомендации**

## 1. Назначение и область применения

Настоящий документ устанавливает методику быстрого и количественного контроля степени интегральной химической токсичности водных вытяжек из почвы в лабораторных условиях с использованием в качестве тест-объекта препаратов лиофилизированных бактерий “Эколюм” и измерительного прибора серии “Биотокс”. Тест-система реагирует на токсические соединения разнообразной химической природы и смеси веществ.

Документ предназначен для учреждений Государственной санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации и специальных служб федеральных органов исполнительной власти, осуществляющих ведомственный санитарно-эпидемиологический надзор.

Опасность загрязнения почв определяется уровнем ее возможного от-рицательного влияния на контактирующие среды (вода, воздух), пищевые продукты и прямо или косвенно на человека.

Результаты обследования почв учитывают при определении и прогнозе степени их опасности для здоровья и условий проживания населения в населенных пунктах, разработке мероприятий по их рекультивации, тех-нических решений по реабилитации и охране водосборных территорий, оценке эффективности санитарно-экологических мероприятий и текущего санитарного контроля за объектами, воздействующими на окружающую среду населенного пункта.

## 2. Нормативные ссылки

1. Закон Российской Федерации “Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан”.
2. Закон Российской Федерации “О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения”.
3. “Положение о государственной санитарно-эпидемиологической службе Российской Федерации”, утвержденное постановлением Прави-тельства Российской Федерации от 30 июня 1998 г. № 680.
4. “Положение о государственной санитарно-эпидемиологическом нор-мировании”, утвержденное постановлением Правительства Российской Федерации от 5 июня 1994 г. № 625 с изменениями и дополнениями от 30 июня 1998 г. №680.
5. Порядок разработки, экспертизы, утверждения, издания и распро-странения нормативных и методических документов системы санитарно-эпидемиологического нормирования. Р 1.1.001-1 Л.005-96.

## 3. Термины и определения

*Санитарно-гигиенический государственный контроль* осуществляется с целью регулярного слежения за соблюдением гигиенических нормативов качества окружающей среды.

*Химическое загрязнение почвы* - изменение химического состава почвы, возникшее под прямым или косвенным воздействием антропогенного фактора (промышленного, сельскохозяйственного, коммунального и т.п.), вызывающее снижение ее качества и возможную опасность для здоровья человека.

*Фоновые почвы* - почвы территорий, не подвергающихся техногенно-му воздействию или испытывающих его в минимальной степени.

*Токсичность* - степень проявления вредного действия разнообразных химических соединений и их смесей. Токсичность - один из важных фак-торов, определяющих качество окружающей среды, достаточно информа-тивный, существенно дополняющий наше представление о степени опас-ности или безопасности объектов при их использовании, являющийся не-обходимой составной частью комплексной системы контроля при стан-дартном анализе.

*Критерий токсичности (индекс токсичности)* - достоверное количе-ственное значение тест-параметра, на основании которого делается вывод о токсичности изучаемого объекта. Среди тест-параметров наиболее часто используют выживаемость, плодовитость, подавление ферментативной и метаболической активности организмов.

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

*Биотестирование* - проведение анализов по определению токсично-сти с помощью живых организмов. Результаты оперативно сигнализиру-ют об опасном воздействии химического загрязнения на жизнедеятель-ность 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 дополни-тельные воздействия всех химических, физических и биологических ком-понентов, присутствующих в исследуемом объекте, неблагоприятно влияющие на физиологические, биохимические и генетические функции тест-организмов.

*Биолюминесценция* - интенсивное свечение в видимой области спек-тра, отражающее специфическую ферментативную функцию и общую ме-таболическую активность организмов.

## 4. Принцип методики

Методика основана на определении изменения интенсивности био-люминесценции генно-инженерного штамма бактерий при воздействии токсических веществ, присутствующих в анализируемой пробе, по сравне-нию с контролем. Люминесцентные бактерии оптимальным образом соче-тают в себе различные типы чувствительных структур, ответственных за генерацию биоповреждений (клеточная мембрана, цепи метаболического обмена, генетический аппарат), с экспрессностью, объективным и количе-ственным характером отклика целостной системы на интегральное воз-действие токсикантов. Это обеспечивается тем, что люминесцентные бак-терии содержат фермент люциферазу, осуществляющую эффективную трансформацию энергии химических связей жизненно важных метаболи-тов в световой сигнал на уровне, доступном для экспрессных и количест-венных измерений.

Критерием токсического действия является изменение интенсивности биолюминесценции тест-объекта в исследуемой пробе по сравнению с контролем. Уменьшение интенсивности биолюминесценции пропорцио-нально токсическому эффекту.

Острое токсическое действие исследуемой пробы на бактерии опре-деляется по ингибированию их биолюминесценции за 30-ти минутный (в экспрессном варианте - 5 минут) период экспозиции. Количественная оценка параметра тест-реакции выражается в виде безразмерной величи-ны - индекса токсичности “Т”, равной отношению Т=100(1о-1)Ло, где 1о и I соответственно интенсивность свечения контроля и опыта при фиксированном времени экспозиции исследуемого раствора с тест-объектом.

Методика допускает три пороговых уровня индекса токсичности:

1) допустимая степень токсичности: индекс токсичности Т меньше 20;

2) образец токсичен: индекс Т равен или больше 20 и меньше 50;.

3) образец сильно токсичен: индекс токсичности Т равен или более 50.

## 5. Характеристики погрешности

Метрологические характеристики биотеста в соответствии с аттестацией 4/7-93, проведенной органами Госстандарта: сходимость результатов определения тест-параметра - 5%, воспроизводимость результатов определения тест-параметра - 5%.

## 6. Характеристика тест-объекта “Эколюм” и прибора “Биотокс”

Биосенсор “Эколюм” представляет собой лиофилизированные культу-ры люминесцентных бактерий, содержащиеся в среде инертных газов в специальных стеклянных флаконах. Производится согласно ТУ 6-09-20-236-93. Биосенсор, содержащийся при температуре 2-4° С, имеет гаранти-рованный срок хранения не менее 6 месяцев.

Специализированный люминометр “Биотокс-10” является измери-тельным прибором, предназначенным для проведения токсиколого-гигиенического мониторинга объектов окружающей среды, с использова-нием микробных биолюминесцентных сенсоров 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 биолю-минесценции тест-объекта, индекса токсичности пробы, усредненной величины индекса токсичности, вычисление стандартного отклонения пока-зателя токсичности, определения величин ЕС20 и ЕС50 - пороговых зна-чений допустимой степени и острой степени токсичности образца, иссле-дование динамики процесса взаимодействия токсикантов с тест-объектом, компьютерная обработка данных, наличие сигнала для оператора в случае превышения пробой допустимого уровня токсичности.

## 7. Оборудование,материалы, реактивы

Прибор серии “Биотокс”, производимый согласно ТУ-446-У-028-00-ОТУ, с набором кювет для измерения биолюминесценции объемом 1,5 мл;

весы лабораторные общего назначения ГОСТ 24104;

pH-метр ГОСТ 25.7416.0171 или аналоги;

термометр лабораторный 0-5 5°С, цена деления шкалы - 0,5°С, ГОСТ 215;

сушильный электрический шкаф ГОСТ 13474;

термостат суховоздушный электрический ТС 80 МУ 4.2 ТУ 64-1-1382-76Е;

холодильник бытовой, обеспечивающий замораживание (-18 ± 1°С) и хранение проб (+2 - +4°С);

лабораторный дисковый истиратель для измельчения проб почвы, тип ИДА-175, ЛДИ-65, ТУ 482251;

аппараты для встряхивания, тип АВУ-1, АВУ-10Р, ТУ 64-1-1081;

**часы сигнальные ТУ** 25-07-57;

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

буры почвенные, ножи почвенные, ГОСТ 2307;

лопаты ГОСТ 19596;

бумажные фильтры обеззоленные типа ФОБ (красная, белая ленты), ТУ 6-09-1678;

пипетки автоматические дозаторы любого типа объемом 0.02-0.5 мл ± 1,0%;

цилиндры вместимостью 25, 50 мл второго класса точности ГОСТ 1770;

стаканы стеклянные лабораторные вместимостью 10, 50 мл ГОСТ 25336;

пипетки вместимостью 0,5, 1,0 мл ГОСТ 29227;

пробоотборник любого типа, объемом не менее 5 мл;

стаканчики для взвешивания, ГОСТ 7148;

флаконы и банки стеклянные с навинчивающейся крышкой или с притертой пробкой для отбора и хранения проб и реактивов вместимостью 10,50, 100мл;воронки лабораторные ГОСТ 25336;

вода дистиллированная ГОСТ 6709;

натрия гидроокись ГОСТ 4328;

кислота соляная ГОСТ 3118;

кислота серная ГОСТ4204;

спит этиловый ТУ 6-091710;

цинк сернокислый 7-водный ГОСТ 4174;

бумага индикаторная универсальная для измерения pH;

лиофилизированная культура тест-организмов “Эколюм” ТУ 6-09-20-236-93

## 8. Условия безопасного проведения работ

8.1.При работе с химическими веществами 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 пожаротуше-ния по ГОСТ 12.4.009.

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

8.6. Хранить тест-культуру “Эколюм” в холодильнике при температу-ре от -18°С до +2 - +4°С, следует беречь культуру лиофилизированных бактерий 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 токсикологии.

## 10. Условия выполнения измерений

Биотестирование проводится в нормальных лабораторных условиях в соответствии с ГОСТ 15150. Помещение не должно содержать токсичных паров и газов.

Температура окружающего воздуха в лаборатории от + 18 до 25°С. Относительная влажность воздуха 80 ±5%. Атмосферное давление 84-106кПа (630-800 мм рт.ст.).

При использовании электроприборов частота переменного тока 50±1 Гц. Напряжение сети 220± 10 В.

Освещение помещения естественное или искусственное, не ограничи-вается особыми требованиями.

## 11. Подготовка к проведению измерений

Предварительная подготовка к отбору проб и выполнению биотес-тирования должна обеспечивать подготовку посуды, пробоотборников, мест хранения отобранных проб, а также подготовку рабочего места для обработки доставленных в лабораторию проб и исследования их на ток-сичность. Все процедуры предварительной подготовки должны исключить попадание токсичных, органических и каких-либо других веществ в ис-следуемый образец.

**11.1. Подготовка посуды для отбора, хранения проб и биотестирова-ния.**

Обычно для отбора почв используются матерчатые мешки. Посуда для 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 водо-проводной 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 завинчивающими 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. Программа обследования почвы определяется целями и зада-чами исследования с учетом санитарного состояния района, уровня и ха-рактера техногенной нагрузки, условий землепользования.

11.2.2. При выборе объектов в первую очередь обследуют почвы тер-риторий повышенного риска воздействия на здоровье населения (детские дошкольные, школьные и лечебные учреждения, зоны санитарной охраны водоемов, питьевого водоснабжения, земли, занятые под сельхозкультуры и т.д.).

11.2.3. Отбор проб почвы, ее хранение и транспортировка осуществ-ляется в соответствии с ГОСТ 17.4.4.02-84.

11.2.4. Контроль над загрязнением почв населенных пунктов прово-дится с учетом функциональных зон города. Пробная площадка должна располагаться на типичном для изучаемой территории месте. При неодно-родности рельефа площадки выбирают по элементам рельефа. На террито-рию, подлежащую контролю, составляют описание с указанием адреса, точки отбора, общего рельефа микрорайона, расположение мест отбора и источников загрязнения, типа почвы и других данных, необходимых для правильной оценки и трактовки результатов анализов образцов.

11.2.5. При контроле над загрязнением почв промышленными источ-никами площадки для отбора проб располагают на площади трехкратной величины санитарно-защитной зоны вдоль векторов розы ветров на рас-стоянии 100, 200, 300, 500, 1000, 2000, 5000 м и более от источника за-грязнения (ГОСТ 17.4.4.02-84).

11.2.6. Для контроля санитарного состояния почв детских дошколь-ных, школьных и лечебно-профилактических учреждений, игровых пло-щадок и зон отдыха отбор проб проводят не менее 2 раза в год - весной и осенью. Размер пробной площадки должен быть не более 5 х 5 м. При кон-троле санитарного состояния почв территорий детских учреждений и иг-ровых площадок отбор проб проводится отдельно из песочниц и общей территории с глубины 1-10 см. С каждой песочницы отбирается одна объ-единенная проба, составленная из 5 точечных.

11.2.7. В том случае если известны границы какого-либо локального участка загрязнения или проводятся мониторинг за степенью общего за-грязнения почвы в местах захоронения вредных веществ, отвалах, свалках и т.п, одновременно с отбором образцов в предполагаемых загрязненных участках проводится отбор “фоновых” почв. Под фоновыми почвами по-нимаются почвы прилегающих территорий, со сходными условиями, ко-торые можно считать не загрязненными по отношению к исследуемым участкам.

Так при контроле почв в районе точечных источников загрязнения (выгреба, мусоросборники и т.п.) пробные площадки размером не более 5 х 5 м закладываются на разном расстоянии от источника и в относительно чистом участке (контроль).

11.2.8. При изучении загрязнения почв транспортными магистралями подобные площадки закладываются на придорожных полосах с учетом рельефа местности, метео- и гидрологических условий. Пробы почвы от-бирают с узких полос длиной 200-500 м на расстоянии 0-10, 10-50, 50-100 м от полотна дороги. Одна смешанная проба составляется из 20-25 точеч-ных, отобранных с глубины 1-10 см.

11.2.9. При оценке сельскохозяйственных территорий пробы почвы отбирают из верхнего почвенного горизонта (до 20 см) в 5 точках по типу “конверта”. Масса объединенной пробы (из 5 точечных) должна состав-лять не менее 0,5 кг. Размер пробной площади определяется целями по-ставленных исследований и представляет собой часть исследуемой терри-тории, характеризующейся сходными условиями. При оценке сельскохо-зяйственных территорий на предмет их пригодности для производства экологически чистой продукции она может составлять от 1 до 5 га. при однородным почвенным покрове и от 0,5 до 1 га. - при неоднородным. При необходимости проведении более детального картирования общего уровня загрязнения размер пробной площади может составлять десятки $м^2$.

11.2.10. Отобранные образцы освобождают от крупных корней, камней и высушивают при 105°С в течении 1 часа. Воздушно-сухую пробу почвы растирают в ступке (почво-измельчителе), просеивают через сито с отверстиями в 3 мм и тщательно перемешивают. Подготовленный образец нужно хранить в сухом месте в пакете из бумаги крафт. Навеску почвы (массой не менее 5,0 г) помещают в коническую колбу, мерным цилиндром приливают пятикратный объем дистиллированной воды, взбалтывают в течении 5 минут и оставляют для экстракции на 24 часа. Через 24 часа экстракт фильтруется через бумажный фильтр - белая, красная ленты (только в случае мутной надосадочной жидкости). Полученный экстракт тестируют на токсичность.

В экспрессном варианте навеску почвы с добавленной дистиллированной водой взбалтывают на аппарате для встряхивания в течении 3 часов и фильтруют через бумажный фильтр. Если по истечении этого времени устанавливается факт сильной токсичности почвы стандартная процедура экстракции не проводится.

### 11.3. Подготовка тест-объекта “Эколюм” и прибора “Биотокс

113.1. Реконструкция биосенсора.

11.3.1.1. Вскрыть флакон с лиофилизированным биореагентом. Добавить 10 мл охлажденной до 4-8°С дистиллированной воды, pH 7.0-7.4 - получают суспензию бактерий. Желательно использовать стерилизованную дистиллированную воду. Рекомендуется несколько раз встряхнуть флакон с суспензией бактерий.

11.3.1.2. Выдержать суспензию в холодильнике при температуре +2 -+4°С в течение 30 минут.

11.3.1.3. Довести температуру суспензии бактерий до комнатной температуры (15-25°С). Рекомендуется перемешивание рабочей суспензии бактерий перед отбором определенных объемов для проведения анализа.

11.3.2. Подготовку прибора “Биотокс проводят в соответствии с методикой поверки прибора и инструкцией по эксплуатации.

11.3.3. Определение рабочей концентрации биосенсора “Эколюм”.

11.3.3.1. Измерить фоновое значение прибора “Биотоке” (по инструкции к прибору, при счете 10 сек без кюветы) и записать это значение.

11.3.3.2. Добавить 0.1 мл суспензии бактерий из флакона в кювету люминометра. Затем туда же добавить 0.9 мл дистиллированной воды (pH 7.0-7.4, комнатная температура).

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

11.3.3.4. Свечение рабочей суспензии бактерий должно находиться в интервале, превышающим фоновое значение прибора в 25-250 раз. Если обнаруженная величина меньше 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.

## 12. Процедура биотестирования

### 12.1. Определение индекса токсичности.

12.1.1. В контрольную кювету вносят дистиллированную воду, в опытные кюветы - подготовленную почвенную вытяжку. В кюветы добавляют рабочую суспензию бактерий. В том случае, если вытяжка фильтровалась, в контрольную кювету вносят дистиллированную воду, прошедшую через фильтр той же партии (объемы профильтрованных почвенных вытяжек и дистиллированной воды прошедшей через фильтр в дальнейшем использующийся в качестве контроля должны совпадать).

В случае, если исследуются образцы взятые с локально загрязненных территорий (п. 11.2.6.), в контрольную кювету вместо дистиллированной воды вносят экстракт из фоновых почв и добавляют рабочую суспензию бактерий.

12.1.2. При определении индекса токсичности необходимо проводить параллельное измерение контрольных 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 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 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 должен быть равным в контроле и исследуемой пробе.

12.1.3. В стандартном анализе отбирают из флакона по 0,1 мл рабочей суспензии бактерий и добавляют в три кюветы от люминометра контрольные и три (или более) кюветы для пробы. Добавляют в контрольные кюветы по 0,9 мл дистиллированной воды (pH 7,0-7,4) или вытяжку из фоновой почвы. Добавляют в остальные кюветы опытную пробу по 0,9 мл и замечают время экспозиции и через определенный интервал измеряют интенсивность биолюминесценции бактерий.

12.1.4. Измерение интенсивности биолюминесценции и индекса токсичности проводят с помощью прибора “Биотокс" ласно 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.

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 разведе-ниях сильно токсический образец станет безопасным (величины менее ЕС20).

ЕС50 есть эффективный объем образца вызывающий тушение свечение биосенсора на 50% по сравнению с контролем. В этом случае образец сильно 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 безвреден для человека.

Вычисление величин ЕС проводят с использованием достаточно известной в токсикологии гамма-функции. Гамма-функция (О) представляет собой зависимость отношения потери интенсивности свечения пробы к оставшейся интенсивности свечения пробы и описывается формулой 0=(1о-1)Л, где 1о и I соответственно интенсивность биолюминесценции в контроле и опыте. Функция О очень удобна для точного определения величин ЕС20 и ЕС50 путем экстраполяции графической зависимости в случаях, когда токсичность образца очень небольшая или, наоборот, когда образец сильно токсичен. График Gфункции в логарифмических координатах против объемов пробы есть теоретически прямая линия молекуляр-ности 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 ЕС20 и ЕС50 (см. описание к прибору “Биотокс”).

12.2.1. Рекомендуется перед измерением коэффициентов ЕС убедиться при измерении токсичности (п. 12.1) 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 для измерения параметров исследуются 4 пробы, получаемые путем разбавления исследуемой пробы или раствора химического соединения 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 ЕС20 и ЕС50 и представляет данные на дисплее.

12.3.3. Определение гамма-функции для каждого из предварительно разведенных образцов проводят в соответствии с процедурой определения показателя индекса токсичности (п. 12.1) за исключением введения дополнительной команды. При этом микроконтроллер по данным хранящимся в оперативной памяти об интенсивности биолюминесценции в контрольных и опытных пробах (соответственно 1о и I), производит вычисление G-функции с представлением результата на дисплее. При интенсивности биолюминесценции опыта больше или равным контроля вычисление не производится.

## 13. Обработка, оценка и оформление результатов

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

13.2. Индекс токсичности “Т” есть величина безразмерная, и определяется по формуле Т = 100 (1о-1)/1о, где 1о 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 Т=(Т1+Т2+ТЗ)/3. Величины Т1, Т2 и ТЗ получают из трех параллельных измерений контроль-опыт в короткий промежуток времени или при измерении в последовательности контроль, и затем серия опытного образца (до 10 повторностей).

13.3.В случае определения токсичности пробы (Т равно или больше 20) можно определить насколько это связано со значениями pH исследуемой пробы. Для этого измеряют pH пробы и, если величина pH находится за пределами 6.5-8.0, приводят pH до значений 7.0-7.4 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. По величине индекса токсичности анализируемой пробы классифицируются на три группы

| Группы | Значение “Т” | Вывод о степени токсичности пробы |
|---|---|---|
| 1 | меньше 20 | допустимая степень токсичности |
| 2 | от 20 до 50 | образец токсичен |
| 3 | равно или больше 50 | образец сильно токсичен |

13.6. 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).

13.7. Результат токсикологического анализа представляется в виде протокола (Приложение 1).

## 14. Контроль погрешности методики токсикологического анализа

14.1. Контроль качества оценки токсичности проводится по определению чувствительности используемых тест-организмов к модельному “эталонному” токсиканту цинку сернокислому 7-водного (ZnS04 7H2O). Диапазон концентраций модельного токсиканта, при действии которого в течении 30 минут интенсивность биолюминесценции ингибируется на 50%, составляет 0.6-1.5 мг/л. Расчет делается на ионы цинка.

Удовлетворительные результаты, полученные при проверке диапазона реагирования люминесцентных бактерий на модельный токсикант, не обеспечивают гарантии адекватного реагирования организмов на другие токсиканты и тем более их смеси, однако регулярно проводимая проверка позволяет выявить ошибки при приготовлении исследуемых смесей и растворов, нарушения, допускаемые в условиях проведения опытов.

14.2. Процедура определения диапазона реагирования тест-системы “Эколюм” на модельный токсикант проводится в соответствии с аттестацией 4/7-93 путем действия раствора, содержащего 4.4 мг/мл цинка сернокислого при времени инкубации 30 минут с биосенсором. Должно происходить не менее, чем 50%-ное ингибирование интенсивности биолюминесценции по сравнению с контролем. В случае, если эта величина меньше, то следует проверить точность приготовления исследуемых растворов, условий проведения опытов. Если все правильно, то биосенсор не используется.

**Приложение 1 (рекомендуемое) Форма регистрации условий и результатов биотестирования**

ПРОТОКОЛ № определения токсичности пробы с помощью биотеста “Эколюм”

| |
|---|
| Наименование организации |
| Наименование пробы и место отбора |
| Тип почвы, механический состав |
| Дата, время отбора пробы |
| Условия отбора и транспортировки пробы |
| Дата измерения проб |
| Число повторностей измерения проб |
| Условия проведения анализа |
| Результаты биотестирования Усредненный индекс токсичности |
| Погрешность измерения |
| Оценка токсичности пробы |
| Оператор, Ф.И.О. |

**Библиографические данные**

1.ГОСТ 27793-88 (СТ СЭВ 5298-85) “Почвы. Термины и определения”.

2. ГОСТ 17.2.2.01-81 (СТ СЭВ 4470-84) “Охрана природы. Почвы. Номенклатура показателей санитарного состояния”.

3.ГОСТ 17.4.3.01-83 (СТ СЭВ 3847-82) “Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб”.

4. ГОСТ 17.4.3.03-85 “Охрана природы. Почвы. Общие требования к методам определения загрязняющих веществ”.

5. ГОСТ 17.4.4.02-84 “Охрана природы. Почва. Методы отбора и подготовки проб почвы для химического, бактериологического и гельминтологического анализа”.

6. ГОСТ 17.4.3.06-86 (СТ СЭВ 5101-85) “Охрана природы. Почвы. Общие требования к классификации почв по влиянию на них химических загрязняющих веществ”.

7. Методические указания по оценке степени опасности загрязнения почвы химическими веществами № 4266-87. Утв. МЗ СССР 13.03.87.

8. Методические указания по геохимической оценке загрязнения территорий городов химическими элементами. - М.: ИМГРЭ, 1982.

9. Гигиеническая оценка качества почвы населенных мест. Методические указания 2.17.730-99. Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 1999.

10. Методические рекомендации по оценке степени загрязнения атмосферного воздуха населенных пунктов металлами по их содержанию в снежном покрове и почве № 5174-90. Утв. МЗ СССР 15.05.90.

11. Предельно допустимые концентрации химических веществ в почве (ПДК): МЗ СССР. - М., 1979, 1980, 1985, 1987.

12. Дмитриев М.Т., Казнина Н.И., Пинигина И.А.: Справочник: Сани-тарно-химический анализ загрязняющих веществ в окружающей среде. - М.: Химия, 1989.

13. ГОСТ 26204-84, 26213-84 “Почвы. Методы анализа”.

14. Порядок определения параметров ущерба от загрязнения земель химическими веществами. Утв. Председателем Комитета Федерации по земельным ресурсам и землеустройству. 10.11.93. Министерством охраны окружающей среды и природных ресурсов 18.11.93.

15. Инструкция по выявлению деградированных сельскохозяйственных угодий и загрязненных земель. Утв. Роскомземом 08.12.94 и Минприроды РФ 15.02.95.

16. Методические указания по определению тяжелых металлов в почвах сельхозугодий и продукции растеневодства.(2-е изд.). - М., 1992.