

Методика экспрессного определения токсичности воды с помощью люминесцентного бактериального теста «Эколюм»

Методические рекомендации

1. Назначение и область применения

Настоящий документ устанавливает методику определения острой химической токсичности питьевых, поверхностных пресных, грунтовых, сточных и очищенных сточных вод, атмосферных осадков в лабораторных и полевых условиях с использованием в качестве тест-объекта биолюминесцентных микроорганизмов «Эколюм» и измерительного прибора серии «Биотокс».

Документ предназначен для учреждений Государственной санитарно-эпидемиологической службы 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-экологических мероприятий и текущего санитарного контроля над 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 Правительства Российской Федерации от 30 июня 1998 г. № 680.
4. «Положение о государственной санитарно-эпидемиологическом нормировании», 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 распространения нормативных и методических документов системы санитарно-эпидемиологического нормирования. Р 1.1.001-1.1.005-96.

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

Методика основана на определении изменения интенсивности биолюминесценции генно-инженерных бактерий при воздействии токсических веществ, присутствующих в анализируемой пробе, 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 лю-циферазу, 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 таковой для пробы с раствором, не содержащим токсических веществ. Уменьшение интенсивности биолюминесценции пропорционально токсическому эффекту.

Острое токсическое действие исследуемой воды на бактерии определяется по ингибированию их биолюминесценции за 30-ти минутный (в экспрессном варианте - 5 минут) период экспозиции. Количественная оценка параметра тест-реакции выражается в виде безразмерной величины - индекса токсичности «Т», равной отношению $T = 100 (I_0 - I) / I_0$, где I_0 и I соответственно интенсивность свечения контроля и опыта при фиксированном времени экспозиции исследуемого раствора с тест-объектом, 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 культуры 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°C, имеет гарантированный срок хранения не менее 6 месяцев.

Специализированный люминометр «Биотокс-10» является измерительным прибором, предназначенным для проведения экологического мониторинга объектов окружающей среды, с использованием 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 биолюминесценции тест-объекта, индекса токсичности пробы, усредненной величины индекса токсичности, вычисление стандартного отклонения показателя токсичности, определения величин EC20 и EC50 - пороговых значений допустимой степени и острой степени токсичности образца, исследование 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; рН-метр ГОСТ 25.7416.0171 или аналоги; термометр лабораторный 0-55°C, цена деления шкалы - 0,5°C, ГОСТ215; сушильный электрический шкаф ГОСТ 13474; холодильник бытовой, обеспечивающий

замораживание ($-18 \pm 1^{\circ}\text{C}$) и хранение проб ($+2 - +4^{\circ}\text{C}$); 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; бумажные фильтры обеззоленные типа ФОБ (красная, белая ленты), ТУ 6-09-1678; пипетки автоматические дозаторы любого типа объемом $0.02 - 0.5 \text{ мл} \pm 1,0\%$; цилиндры вместимостью 25, 50 мл второго класса точности ГОСТ 1770; стаканы стеклянные лабораторные вместимостью 10, 50 мл ГОСТ 25336; пипетки вместимостью 0,5 и 1,0 мл ГОСТ 29227; пробоотборник любого типа, объемом не менее 5 мл; 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; стаканчики для взвешивания (бюксы) диаметром 30, 40 мм ГОСТ 7148; вода дистиллированная ГОСТ 6709; натрия гидроокись ГОСТ 4328; кислота соляная ГОСТ 3118; кислота серная ГОСТ4204; спирт этиловый, х.ч. ТУ 6-091710; цинк серноокислый 7-водный ГОСТ 4174; бумага индикаторная универсальная для измерения рН; лиофилизированная культура тест-организмов «Эколюм» ТУ 6-09-20-236-93.

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°C в течение 1 часа.

8.6. Хранить тест-культуру «Эколюм» в холодильнике при температуре от -18°C до $2-4^{\circ}\text{C}$, 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 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. Температура окружающего воздуха в лаборатории от 18 до 25°C . Относительная влажность воздуха $80 \pm 5\%$. 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» в полевых условиях питание от аккумулятора напряжением 12В. 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 исключить попадание токсичных, органических и каких-либо других 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°C 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.

11.2. Отбор, транспортировка, хранение и подготовка проб.

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

Отбор проб, транспортировка и хранение грунтовых вод осуществляется в соответствии с ГОСТ Р 51592 - 2000 «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 - 2000 «Вода питьевая. 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 требованиями НВН 33-5.301-85 «Инструкция по отбору проб для анализа сточных вод».

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.

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°C). Хранить пробы следует не более 24 часов после отбора. В исключительных случаях допускается замораживание проб (-18°C) 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 температуры приблизительно 20°C.

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 6,0-8,0, если рН пробы выходит за указанные пределы, подкисление осуществляют 10%-ным раствором HCl, подщелачивание - 10%-ным раствором NaOH.

При исследовании грунтовых или других вод с содержанием железа двухвалентного (валовая форма) необходимо предварительное оттаивание проб не менее 24 часов при температуре +2 - +4°C.

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»

11.3.1. Реконструкция биосенсора.

11.3.1.1. Вскрыть флакон с лиофилизированным биореагентом. Добавить 10 мл охлажденной до 4-8°C дистиллированной воды, рН 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°C в течение 30 минут.

11.3.1.3. Довести температуру суспензии бактерий до комнатной температуры (15-25°C). 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 «Биотокс» (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 лю-минометра. Затем туда же

добавить 0.9 мл дистиллированной воды (рН 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.

11.3.4. 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.

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 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 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 бактерий 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 (рН 7,0-7,4). 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» 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, EC20 и EC50.

Эта операция предназначена для быстрого выяснения вопроса, при каких объемах исходного слабо токсического образца достигается установленный предел токсичности (EC20 и/или EC50) или при каких разведениях сильно токсический образец станет безопасным (величины менее EC20).

EC50 есть эффективный объем образца вызывающий тушение свечения биосенсора на 50% по сравнению с контролем. В этом случае образец сильно токсичен. EC20 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 EC20 свидетельствуют о том, что образец безвреден для человека.

Вычисление величин ЕС проводят с использованием достаточно известной в токсикологии гамма-функции. Гамма-функция (O) представляет собой зависимость отношения потери интенсивности свечения пробы к оставшейся интенсивности свечения пробы и описывается формулой $O=(1o-1)J$, где $1o$ и 1 соответственно интенсивность биолюминесценции в контроле и опыте. Функция O очень удобна для точного определения величин EC20 и EC50 путем экстраполяции графической зависимости в случаях, когда токсичность образца очень небольшая или, наоборот, когда образец сильно токсичен. График G-функции в логарифмических координатах против объемов пробы 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 O для каждой пробы, а также вычисляет величины EC20 и EC50 (см. описание к прибору «Биотокс»).

12.2.1. Рекомендуется перед измерением коэффициентов ЕС убедиться при измерении токсичности (п. 12.1) неразбавленной пробы, что величина O 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 EC20 и EC50 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 I_0 и I), производит вычисление 0-функции с представлением результата на дисплее. При интенсивности биолюминесценции опыта больше или равным контролю 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 «Биотокс».

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 $T_1 - T_3$ - повторно-сти (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 определения токсичности пробы (T равно или больше 20) можно определить насколько это связано со значениями pH исследуемого раствора. 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 - EC20 и EC50).

13.7. 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-организмов к модельному «эталонному» токсиканту цинку сернокислому 7-водного ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$). Диапазон концентраций модельного токсиканта, при действии которого в течение 30 минут интенсивность биолюминесценции ингибируется на 50%, составляет 0.6-1.5 мг/л.

Удовлетворительные результаты, полученные при проверке диапазона реагирования люминесцентных бактерий на модельный токсикант, не обеспечивают гарантии адекватного реагирования организмов на другие токси-каны 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/л

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
Дата, время отбора пробы
Условия отбора и транспортировки пробы
Дата измерения проб
Число повторностей измерения проб
Результаты биотестирования Усредненный индекс токсичности
Погрешность измерения
Оценка токсичности пробы
Оператор, Ф.И.О.