

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ СПИРТОВ И ВОДОК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛЮМИНЕСЦЕН-ТЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Методические рекомендации

Метод предназначен для экспресс-оценки безопасности спиртов и водок, изготовленных без добавок биологически активных веществ, крепких алкогольных напитков, на основе ректифицированного этилового спирта с использованием в качестве тест-объекта препаратов лиофилизированных бактерий “Эколюм-7” и измерительного прибора серии “Биотокс”, в сочетании с другими методами, предусмотренными ГОСТом Р 51698—2000 “Водка и спирт этиловый. Газохроматографический экспресс-метод определения содержания токсичных микропримесей”.

Качество алкогольных напитков оценивается по степени интегральной токсичности образца.

Тест-система реагирует на токсические соединения разнообразной химической природы, а также на смеси веществ.

2. Термины и определения

Санитарно-гигиенический государственный контроль осуществляется с целью регулярного слежения за соблюдением нормативов качества окружающей среды и предупреждения попадания токсических веществ в различные объекты и в т. ч. - пищевые продукты.

Химическое загрязнение пищевых продуктов - изменение химического состава пищевых продуктов и напитков, вызывающее снижение их качества и, вследствие этого, возможную опасность для здоровья населения.

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

Критерий токсичности (индекс токсичности) - достоверное количественное значение тест-параметра, на основании которого делается вывод о токсичности продукта. Среди тест-параметров наиболее часто используют 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 исследуемом образце, 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.

3. Принцип метода

Метод определения токсичности основан на том, что тест-объект (люминесцентные бактерии) при действии токсических соединений изменяет свои физиолого-биохимические функции, в т. ч. активность фермента бактериальной люциферазы, ответственного за интенсивность биолюминесценции, и реагирует на действие различных химических и биологических факторов аналогично высшим животным. Оценка токсичности основана на определении величины изменения интенсивности биолюминесценции бактерий при действии токсических соединений, содержащихся в тестируемой пробе, по сравнению с контролем - бактерии, содержащие раствор эталонного спирта.

Метод определения интегральной токсичности на основе люминесцентных бактерий неоднократно сравнивался с действием различных токсических веществ на высшие организмы и получены высокие корреляционные зависимости.

Критерием токсического действия является изменение интенсивности биолюминесценции тест-объекта в исследуемой пробе по сравнению с таковой для пробы с раствором эталонного спирта. Уменьшение интенсивности биолюминесценции пропорционально токсическому эффекту.

Острое токсическое действие исследуемого образца на бактерии определяется по ингибированию их биолюминесценции за 15-ти минутный (в экспрессном варианте - 5 мин) период экспозиции. Количественная

оценка параметра тест-реакции выражается в виде безразмерной величины - индекса токсичности "Т", равной отношению $T = 100 \cdot (I_0 - I) / I_0$, где I_0 и I , соответственно, интенсивность свечения контроля и опыта при фиксированном времени экспозиции исследуемого раствора с тест-объектом.

Методика допускает два пороговых уровня индекса токсичности:

- 1) допустимая степень токсичности образца: индекс токсичности Т меньше 20;
- 2) образец токсичен: индекс Т равен или больше 20.

4. 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 %.

5. Характеристика тест-объекта "Эколюм" и прибора "Биотокс"

Биосенсор "Эколюм-7" 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 °С, имеет гарантированный срок хранения не менее 6 мес.

Специализированный люминометр "Биотокс-10" является измерительным прибором, предназначенным для проведения токсиколого-гигиенического мониторинга объектов окружающей среды, с использованием микробных биолюминесцентных сенсоров серии "Эколюм". Сочетание биохимического датчика с 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 ЕС20 и ЕС50 - пороговых значений допустимой степени и острой степени токсичности образца, исследование динамики процесса взаимодействия токсикантов с тест-объектом, компьютерная обработка данных, наличие сигнала для оператора при превышения пробой допустимого уровня токсичности.

6. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы

Прибор - люминометр серии "Биотокс",
с набором кювет для измерения биолюминесценции,
объемом 1,5 мл

Набор для анализа "Эколюм-7", включает в себя:

А - флакон с лиофилизированным тест-объектом

В - флакон с регидратирующим раствором

С - флакон с раствором эталонного спирта

Д - флакон с раствором эталонного токсиканта

весы лабораторные общего назначения

рН-метр или аналоги

термометр лабораторный (0—55 °С),

цена деления шкалы - 0,5 °С

сушильный электрический шкаф

холодильник бытовой, обеспечивающий

замораживание (- 18 ± 1 °С) и хранение

проб (+ 2 ± 4 °С)

часы сигнальные

пипетки автоматические - дозаторы любого типа,

объемом 0,02—0,5 мл ± 1,0 %

цилиндры вместимостью 25, 50 мл,

второго класса точности

стаканы стеклянные лабораторные,

вместимостью 10, 50 мл

пипетки вместимостью 0, 5, 1,0 мл

вода дистиллированная

натрия гидроокись

кислота соляная

кислота серная

спирт этиловый марки "Экстра"

цинк сернокислый 7-водный

бумага индикаторная универсальная,
для измерения pH
спиртометр
ГОСТ 24104 ГОСТ 25.7416.0171
ГОСТ 215 ГОСТ 13474
ТУ 25—07—57
ГОСТ 1770

ГОСТ 25336 ГОСТ 29227 ГОСТ 6709 ГОСТ 4328 ГОСТ 3118 ГОСТ4204 ГОСТ 5962—67 ГОСТ 4174

ГОСТ 184881—81

7. Требования безопасности

7.1. При работе с химическими веществами необходимо соблюдать требования техники безопасности по ГОСТу 12.4.021.

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

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

7.4. Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТу 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТу 12.4.009.

7.5. 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 ч.

7.6. Хранить тест-культуру “Эколюм” в холодильнике при температуре от - (18 до 2—4) °С, следует беречь культуру лиофилизированных бактерий от нагревания и резкой смены температуры.

8. Требования к квалификации оператора

Определение токсичности по методике выполняется оператором с квалификацией лаборанта со средним специальным образованием.

9. Условия выполнения измерений

Биотестирование проводится в нормальных лабораторных условиях в соответствии с ГОСТом 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—106 кПа (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 ограничивается особыми требованиями.

10. Подготовка к проведению биотестирования

Предварительная подготовка к отбору проб и выполнению биотестирования должна обеспечивать подготовку посуды, 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 пробу.

10.1. Подготовка посуды для отбора, хранения проб и биотестирования

Используется посуда из стекла. Посуда для отбора проб и биотестирования должна быть химически чистой. Она промывается смесью би-хромата калия и серной кислоты (хромовой смесью). Стенки посуды осторожно смачиваются хромовой смесью, после чего на 2—3 ч 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 ч.

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.

10.2. Отбор, хранение и подготовка проб

Отбор проб и их хранение осуществляется в соответствии с руководящими документами, действующими в системе Государственного санитарно-эпидемиологического надзора.

Биотестирование проб проводят не позднее 24 ч после их отбора. Не допускается консервирование проб с помощью химических веществ.

Необходимый для выполнения анализа (в трех и более повторностях) объем проб составляет не более 10 мл.

Температурный оптимум для биотеста составляет 15—25 °С.

10.3. Подготовка тест-объекта “Эколюм” и прибора “Биотокс”

10.3.1. Реконструкция биосенсора

10.3.1.1. Вскрыть флакон “А” с лиофилизированным биореагентом. Добавить из флакона “В” 10 мл охлажденного до 4—8 °С регидратирующего реагента - получают суспензию бактерий. Рекомендуется несколько раз встряхнуть флакон “А” с суспензией бактерий.

10.3.1.2. Выдержать суспензию в холодильнике при температуре + (2—4) °С в течение 30 мин.

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

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

10.3.3. Определение рабочей концентрации биосенсора “Эколюм”.

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

10.3.3.2. Добавить 0,1 мл суспензии бактерий из флакона в кювету люминометра. Затем туда же добавить 0,9 мл дистиллированной воды (рН 7,0—7,4) комнатной температуры.

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

10.3.3.4. 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.

10.3.4. 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.

11. Процедура биотестирования

11.1. Определение токсичности спиртов и водок особых

При определении индекса токсичности необходимо проводить параллельное измерение контрольных и опытных проб. Для большей достоверности данных число повторностей опытной пробы может быть увеличено до 10 измерений. Существует два варианта измерений. Первый вариант - 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.

11.1.1. В стандартном анализе отбирают 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 реагента из флакона “С”. Добавляют в остальные кюветы по 0,9 мл опытную пробу с концентрацией этанола 2,5 % и замечают время экспозиции и через определенный интервал измеряют интенсивность биолюминесценции бактерий.

11.1.2. Измерение интенсивности биолюминесценции проводят с помощью прибора “Биотокс” согласно инструкции по эксплуатации прибора в стандартном варианте через 15 мин экспозиции. В экспрессном варианте допустимо проведение анализа через 5 мин.

12. Работа с прибором “Биотокс”

Подробно принципы работы с “Биотоксом” изложены в техническом описании к прибору.

12.1. Вставить кювету с контролем в кюветный модуль прибора, на-жать кнопку “контроль”, через 10 сек на индикаторном табло появляется усредненная величина интенсивности биолюминесценции тест-объекта (в относительных единицах).

12.2. Вставить кювету с опытным образцом в кюветный модуль, на-жать кнопку “проба”, через 10 сек на индикаторном табло появится усредненная величина интенсивности биолюминесценции тест-объекта (в относительных единицах).

12.3. Нажать кнопку “токсичность” - на индикаторном табло появляется значение индекса токсичности (относительная величина).

12.4. Нажать кнопку “сброс” для обнуления прибора.

12.5. Повторить операции 12.1—12.3 определенное количество раз для пар контроль-опыт (для одного измеряемого образца), записать в протокол результаты определения токсичности.

12.6. При использовании одного контрольного образца для серии различных проб измерение контроля

проводится один раз, и прибор соотносит автоматически показания проб и контроля с индикацией индекса токсичности каждой пробы.

13. Оценка результатов измерений

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 значения в диапазоне допустимых значений прибора “Биотокс”.

13.2. Индекс токсичности “Т” есть величина безразмерная, и определяется по формуле $T = 100 \cdot (I_o - I)/I_o$, где I_o 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 опытной пробы (максимальное число - 10). 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 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 о допустимой степени токсичности образца, и индекс токсичности принимает нулевое значение.

13.4. По величине индекса токсичности анализируемой пробы классифицируются на две группы:

Группы	Значение “Т”	Вывод о степени токсичности пробы
1	меньше 20	допустимая степень токсичности
2	от 20 и больше	образец токсичен

13.5. Методика относительно слабо чувствительна к метанолу, пропанолу и другим примесным к этанолу спиртам. Измерение подобных химических соединений проводится другими методами.

13.6. Результат токсикологического анализа представляется в виде протокола.

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 ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), содержащемуся во флаконе “D”. 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 добавления 0,1 мл раствора из флакона “G” к 0,9 мл суспензии бактерий, при времени инкубации 30 мин 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.