ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

ЛАБОРАТОРНЫЙ СОВЕТ ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

ЭКСПРЕСС-МЕТОД ТОКСИКОЛОГО-ГИГИЕНИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ МОЮЩИХ СРЕДСТВ С ПОМОЩЬЮ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО ТЕСТА

Методические рекомендации

№ 01.037—08

Москва • 2008

gost.e-ecolog.ru

Экспресс-метод токсиколого-гигиенической оценки моющих средств с помощью люминесцентного бактериального теста

Методические рекомендации

№ 01.037—08

Экспресс-метод токсиколого-гигиенической оценки моющих средств с помощью люминесцентного бактериального теста· Методические рекомендации - М.: «Федеральное государственное учреждение здравоохранения «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека», 2008. - 17 с.

Методические рекомендации разработаны ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Москве» (Завьялов Н.В., Клочкова С.И , Скворцова Е Л.), МГУ им. М.В. Ломоносова (Данилов В.С., Юдина Т П.).

Содержание

1	Область применения	4
2	Нормативные ссылки	5
3	Термины и определения	5
4	Принцип методики	6
5	Количественная оценка параметров тест-реакции	6
6	Оборудование, химическая посуда и реактивы	7
7	Характеристика тест-объекта «Эколюм» и прибора «Биотокс-10».	8
8	Условия безопасного проведения работ	
9	Требования к квалификации лиц, проводящих биотестирование	8
10	Условия выполнения измерений	8
11	Подготовка к проведению измерений	9
12	Проведение испытаний	11
13	Обработка, оценка и оформление результатов	12
14	Контроль погрешности методики токсикологического анализа	14
15	Форма представления результатов анализа	14
	Приложение 1 (рекомендуемое)	15

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. Вереещагин
«20» ноября 2008 г.

Экспресс-метод токсиколого-гигиенической оценки моющих средств с помощью люминесцентного бактериального теста

МР № 01.037—08

---

1. Область применения.

Методические рекомендации содержат описание метода тестирования моющих средств с применением в качестве тест-объекта реактива люминесцентных бактерий «Эколюм» и определяют порядок проведения испытаний следующих видов моющих средств

Методические рекомендации предназначены для скрининговой оценки вновь разрабатываемой и серийно выпускаемой продукции с учетом общетоксического и раздражающего действия.

Методика может быть применена в качестве самостоятельного экспресс-метода или в сочетании с другими токсиколого-гигиеническими методами.

Методические рекомендации предназначены для учреждений Государственной санитарно-эпидемиологической службы РФ, учреждений научно-исследовательского и практического профиля, осуществляющих разработку новых видов моющих средств и контроль их качества.

Результаты исследования качества моющих средств учитывают при определении уровня их возможного прямого или косвенного влияния на здоровье человека

2. Нормативные ссылки.

1 Закон РСФСР «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 19 апреля 1991 г.
2. «Положение о государственном санитарно-эпидемиологическом нормировании», утвержденное постановлением Правительства Российской Федерации от 5 июня 1994 г. № 625
3. Руководство Р 1 1 001-96 «Общие требования к построению, изложению и оформлению нормативных и методических документов системы государственного санитарно-эпидемиологического нормирования»
4 Руководство Р 1 1.003-96 «Общие требования к организации разработки нормативных и методических документов системы государственного санитарно-эпидемиологического нормирования»
5 ГОСТ Р 1.5-92. «Государственная система стандартизации Российской Федерации. Общие требования построению, изложению, оформлению и содержанию стандартов»
6 МУ 2196 «Методические указания к постановке исследований по изучению раздражающих свойств и обоснованию предельно допустимых концентраций избирательно действующих раздражающих веществ в воздухе рабочей зоны».
7. МР 11-1/131-09 «Определение токсичности химических соединений, полимеров, материалов и изделий с помощью люминесцентного бактериального теста»
8. МУ 2102 «Оценка воздействия вредных химических соединений на кожные покровы и обоснование предельно допустимых уровней загрязнений кожи»
9. МУ 1109 «Временные методические указания по гигиенической оценке и санитарному контролю за применением, хранением и продажей населению предметов бытовой химии.»

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 «Эколюм» лиофилизированных люминесцентных бактерий или ферментные препараты бактериальной люциферазы Методика основана на определении изменения интенсивности биолюминесценции бактерий при воздействии химических 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 люциферазу, осуществляющую эффективную трансформацию энергии химических связей жизненно важных метаболитов в световой сигнал на уровне, доступном для экспрессных и количественных измерений

Критерием токсического действия является изменение с помощью прибора «Биотокс-10» интенсивности биолюминесценции тест-объекта под воздействием химических соединений, содержащихся в экстрактах ПК продукции по сравнению с раствором, не содержащей токсических веществ, или эталонной пробой. Уменьшение интенсивности биолюминесценции пропорционально токсическому эффекту.

При изучении токсикологических свойств бытовой химической продукции и ее химических ингредиентов люминесцентный бактериальный тест показывает хорошую корреляцию с их действием на высшие животные, культуры клеток человека и другими биотестами.

5. Количественная оценка параметров тест-реакции.

Токсическое действие исследуемой пробы на биосенсор определяется по ингибированию интенсивности ее биолюминесценции за 30-ти минутный (в экспрессном варианте - 5 минут) период экспозиции. Количественные оценки тест-реакции выражаются в виде безразмерной величины - индекса токсичности «Т» и функциональными токсикологическими параметрами EC20 и EC50.

Индекс токсичности «Т», равный отношению T=100(Io-I)/Io, где Io и I соответственно интенсивность биолюминесценции контроля и опыта при фиксированном времени экспозиции исследуемой пробы с бактериями.

Методика допускает три пороговых уровня индекса токсичности.

1) допустимая степень токсичности образца: индекс токсичности Т меньше 20;
2) 2) образец токсичен: индекс Т равен или больше 20 и меньше 50,
3) образец сильно токсичен. индекс токсичности Т равен или более 50.

Токсикологические параметры пробы EC20 и EC50, определяемые также посредством измерения Io и I, позволяют быстро и экономно выяснить вопрос при каких объемах исходного слабо токсического образца достигается установленный предел токсичности (EC20

и/или ЕС50) или при каких разведениях сильно токсический образец станет безопасным (величины менее ЕС20)

ЕС50 есть эффективный объем образца (в опытах с чистым химическим соединением - концентрация), вызывающий тушение свечение биосенсора на 50% по сравнению с контролем. В этом случае образец сильно 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 безвреден для человека.

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=(Io-I)/I, где Io 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.

Количественным параметром токсичности моющих средств является степень разбавления образца по отношению к исходному продукту, приводящая к величине параметров ЕС20 (токсичности) и ЕС50 (острой токсичности). Количественным параметром оценки качества моющих средств по сравнению с эталоном этой продукции и оценки ингредиентов моющих средств служит индекс токсичности

6. Оборудование, химическая посуда и реактивы.

Измерительный прибор – люминометр типа «Биотокс-10» с набором кювет на 1,5 мл.

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

Весы аналитические с погрешностью взвешивания не более 1 мг, ГОСТ 24104-88.

pH - метр, ГОСТ 25.7416 071 или аналоги.

Сушильный электрический шкаф, ГОСТ 13474. Холодильник бытовой, обеспечивающий температуру от –18 до 4°С.

Пробирки с притертыми пробками объемом 3-5 мл, ГОСТ 1770-74.

Дозаторы пипеточные на объемы 1,0-0,1 мл

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

Воронки делительные на 100 мл, тица ВД-1-100.

Фильтры АФА-ВП-10, ТУ 95-743-80 или обеззоленные типа ФОБ, ТУ 6-09-1678.

Стаканчики для взвешивания диаметром 30, 40 мм, ГОСТ 7148.

Вода дистиллированная, ГОСТ 6709.

Кислота соляная, ГОСТ 3118.

Натрия гидроокись, ГОСТ 4328.

Цинк сернокислый 7-водный, ГОСТ 4174.

Спирт этиловый, х.ч., ТУ 6-091710

Кислота серная, ГОСТ 4204

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, содержащийся при температуре от –4 до -18°С, имеет гарантированный срок хранения не менее 1 года.

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 в лабораторных 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 при превышении пробой допустимого уровня токсичности.

8. Условия безопасного проведения работ.

При работе с химическими веществами необходимо соблюдать требования техники безопасности по ГОСТ 12 4.021.

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

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

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12 1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12 4.009.

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.

Хранить тест-культуру «Эколюм» в холодильнике при температуре от -18°С до +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 84-106 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.

11. Подготовка к проведению измерений.

Предварительная подготовка к отбору проб и выполнению биотестирования должна обеспечивать подготовку посуды, мест хранения отобранных проб, а также подготовку рабочего места для обработки проб и исследования их на токсичность Все процедуры предварительной подготовки должны исключить попадание токсичных, органических и каких-либо других веществ в исследуемый образец

11.1. Подготовка посуды для отбора, хранения проб и биотестирования.

Обычно используется посуда из 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 завинчивающими крышками в защищенных от пыли ящиках лабораторного стола или на закрытых полках, стеллажах и т.п.

11.2. Подготовка проб.

Извлечение водорастворимых форм химических соединений из моющих средств. Экстракты из образцов готовят путем настаивания в дистиллированной воде В сосуд помещают 1 мл жидкого образца (или 1 г порошкового образца) и заливают 10 мл дистиллированной воды (комнатная температура, pH 7.0-7 4) и выдерживают 10 мин. Рекомендуется периодическое встряхивание раствора. Затем отбирают 0,1 мл раствора в сосуд и добавляют 10 мл дистиллированной воды. Выдерживают 10 мин. Таким образом, получают «первичное» (1000-кратное) разбавление исходного образца.

Далее проводят дополнительное разведение экстракта дистиллированной водой, получая по 4 пробы при следующих отношениях экстракт: вода 1:1 (первичное разведение), 1·2; 1.4 и 1:8. Эта операция необходима для вычисления параметров ЕС,

Например, отбирают в пробирку с пробкой 5 мл образца первичного разведения (разведение 1 1), добавляют 5 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивают. Получают пробу с разбавлением 1 2. Затем в другую пробирку отбирают 5 мл этого экстракта и добавляют 5 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивают. Получают пробу с разбавлением 1:4. Потом в другую пробирку отбирают 5 мл этого экстракта и добавляют 5 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивают. Получают пробу с разбавлением 1.8.

При исследовании отдельных ингредиентов моющих средств необходимо сделать 4 последовательных разведения дистиллированной водой, получая по 4 пробы при следующих отношениях экстракт.вода 1:1; 1:2, 1.4 и 1 8. Эта операция необходима для вычисления параметров ЕС.

Для улучшения достоверности данных и уменьшения экспериментальных ошибок, связанных, например, с взвешиванием, измерением объемов или разбавлением рекомендуется увеличить число серий независимых разбавлений до трех, а при плохой сходимости данных серий увеличить их число

Не допускается консервирование проб, предназначенных для исследования на токсичность.

11.3. Подготовка тест-объекта «Эколюм» и прибора «Биотокс-10».

Подготовка прибора «Биотокс-10».

Подготовку прибора «Биотокс-10» проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации.

Регидротация биосенсора «Эколюм».

Вскрыть флакон с лиофилизированным препаратом «Эколюм». Добавить 10 мл дистиллированной воды, pH 7.0-7 4 комнатной температуры для получения суспензии бактериального препарата Желательно использовать стерилизованную дистиллированную воду Рекомендуется несколько раз встряхнуть флакон с суспензией препарата.

Рекомендуется перемешивание рабочей суспензии препарата перед отбором определенных объемов для проведения анализа.

Выдержать суспензию в течение 30 минут.

Определение рабочей концентрации биосенсора «Эколюм».

Измерить фоновое значение прибора «Биотокс-10» (по инструкции к прибору, при счете 10 сек без кюветы) и записать это значение.

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)

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

Свечение рабочей суспензии бактерий должно находиться в интервале, превышающим фоновое значение прибора в 25-250 раз. Если величина больше интервала, то следует разбавить суспензию бактерий дистиллированной водой и повторить измерение.

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 Проведение испытаний.

В стандартном анализе приготовляют контрольный образец путем смешения в кювете от люминометра 0,1 мл рабочей суспензии бактерий и 0,9 мл дистиллированной воды (pH 7,0-7,4) При приготовлении опытных образцов к 0,1 мл рабочей суспензии бактерий добавляют 0.9 мл пробы моющих средств различного разведения

Измерение токсикологических параметров проводят с помощью прибора «Биотокс-10» в стандартном варианте через 30 минут экспозиции. В экспрессном варианте допустимо проведение анализа через 5 минут.

12.1. Определение токсичности образцов моющих средств.

При исследовании моющих средств после вывода прибора в режим измерения ЕС определяется интенсивность свечения контрольной кюветы и 4-х проб, полученных путем разбавления исследуемой пробы 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 измерений микроконтроллер при нажатии специальной кнопки клавиатуры управления производит автоматически вычисление коэффициентов ЕС20 и ЕС50 и представляет данные на дисплее

При исследовании коэффициентов ЕС ингредиентов моющих средств рекомендуется убедиться при измерении токсичности приготовленного раствора, что величина G для данной пробы не превышает значения 25. В случае если величина больше, может увеличиться погрешность измерения величин ЕС. В таком случае необходимо развести пробу дистиллированной водой.

Как при исследовании моющих средств, так и их ингредиентов, после определения, путем измерения величины ЕС20 - насколько надо разбавить раствор, чтобы он стал не токсичным, необходимо учесть вклад этапа предварительного разбавления

Следует обратить внимание, что при интенсивности биолюминесценции опыта больше или равным контроля вычисление G-функции не производится. В этом диапазоне образец не токсичен Следует уменьшить степень первичного разбавления.

Для большей достоверности проведения измерений рекомендуется делать несколько параллельных разбавлений исходного образца.

12.2. Определение соответствие качества моющих средств по сравнению с эталонным образцом.

В случае наличия эталонного образца моющего средства исследования качества продукции проводятся по сравнению опытного и эталонного образцов. Водная экстракция из эталонного образца проводится, как указано выше, и этот раствор используется как контроль. Условия экстракции должны быть строго одинаковыми в контроле и опыте.

Измеряется свечение эталонной пробы и прибор запоминает эту величину. Затем измеряются повторности опытной пробы, и прибор автоматически фиксирует значения индекса токсичности каждой пробы и усредненную величину индекса токсичности В этом анализе параметры ЕС не измеряются.

Оценку токсичности пробы проводят по относительному различию в интенсивности биолюминесценции контрольной и опытной проб и вычислению индекса токсичности «Т». Абсолютная величина интенсивности биолюминесценции контроля не имеет принципиального значения в диапазоне допустимых значений прибора «Биотокс-10»

Приготовляют три повторности водного экстракта ингредиента. Обработку результатов измерений токсичности выполняют путем расчета среднеарифметического значения величины индекса токсичности «Т» по формуле Т=(Т1+Т2+Т3)/3, где Т1-Т3 - повторности опытной пробы Величины Т1, Т2 и Т3 получают при измерении в последовательности контроль, и затем серия опытных образцов.

Прибор «Биотокс-10» автоматически определяет усредненный показатель индекса токсичности и погрешность измерения. Если погрешность измерения большая, необходимо увеличить число повторностей.

В случае определения токсичности пробы при малых разведениях 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

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. Обработка, оценка и оформление результатов.

Оценку токсичности пробы проводят по относительному различию в интенсивности биолюминесценции контрольной и опытной проб и вычислению индекса токсичности «Т» и параметров EC20 и EC50.

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.

По величине индекса токсичности анализируемой пробы классифицируются на три группы (Таблица 1):

Таблица 1

Группы	Величина индекса токсичности «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

Количественные оценки токсичности образцов моющих средств (параметр EC20) и их ингредиентов (индекс токсичности) представлены в таблице 2

Таблица 2.

Количественные параметры оценки токсичности ПК продукции.

Вид продукции	Т	EC20
Моющие средства		1 5000
Ингредиенты моющих средств	20	концентрация, вызывающая EC20
Сравнение моющих средств и их ингредиентов с эталонным образцом	20	

ПК продукция признается токсичной, если согласно параметру EC20 необходимо большее разбавление, нежели указано в таблице 2. При достижении параметра EC50 продукция признается сильно токсичной

При определении токсичности ингредиента продукции нужно сопоставить концентрацию, вызывающую EC20, с концентрацией этого ингредиента в изделии. Если она больше, то

необходимы дополнительные анализы с применением других методов для заключения о возможности использования ингредиента.

При обнаружении отличия моющих средств и ингредиентов от эталонных образцов на величину большую Т=20 следует провести дополнительные исследования качества продукции другими методами

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

14. Контроль погрешности методики токсикологического анализа.

Контроль качества оценки токсичности объектов окружающей среды проводится по определению чувствительности используемых тест-организмов к модельному «эталонному» токсиканту цинку сернокислому 7-водного ($ZnSO_4 7H_2O$). Расчет проводится по содержанию ионов цинка. 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 токсиканты и тем более их смеси, однако регулярно проводимая проверка позволяет выявить ошибки при приготовлении исследуемых смессй и растворов, нарушения, допускаемые в условиях проведения опытов.

Процедура определения диапазона реагирования тест-системы «Эколюм» на модельный токсикант проводится 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.

15. Форма представления результатов анализа.

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

$$\bar{X} \pm s, \quad \text{при } P = 0.95$$

$\bar{X}$ — 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 Т=100 (Iконтр - Iопыт)/Iконтр , где Iконтр. и Iопыт соответственно интенсивности биолюминесценции бактерий в контрольной и опытной пробах.

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

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

где X_i — i-й результат определений, 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

Приложение 1 (рекомендуемое)

Форма регистрации условий и результатов биотестирования моющих средств и их ингредиентов

ПРОТОКОЛ №
определения токсичности пробы с помощью биотеста «Эколюм»
и прибора «Биотокс-10»

Наименование организации _____
Наименование пробы _____
Дата, время приготовления пробы _____
Дата, время измерения
Объем (навеска) образца _____
Первичное разведение _____(А)
Величина ЕС20 (1-я серия разведений) _____
Величина ЕС20 (2-я серия разведений) _____
Величина ЕС20 (3-я серия разведений) _____
Средняя величина ЕС20 _____
Вычисленный объем пробы, приводящий к величине ЕС20

Вывод о токсичности образца _____

Анализ провел _____

Форма регистрации условий и результатов биотестирования моющих средств и их ингредиентов по сравнению с эталоном

ПРОТОКОЛ №
определения токсичности пробы с помощью биотеста «Эколюм»

Наименование организации	
Наименование пробы	
Дата, время приготовления пробы	
Дата измерения проб	
Число повторностей измерения проб	
Результаты биотестирования Усредненный индекс токсичности	
Погрешность измерения	
Оценка токсичности пробы	
Оператор, Ф.И.О.	

gost.e-ecolog.ru