МИНИСТЕРСТВО ОХРАНЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ
И ПРИРОДНЫХ РЕСУРСОВ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

"УТВЕРЖДАЮ"
Заместитель Министра
_____ В.Ф.Костин
_____ 1996.

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ВОД, ПОЧВ И ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ПО ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ (КОЛОРИМЕТРИЧЕСКАЯ РЕАКЦИЯ)

ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.1-96
16.2:2.2.1-96

Методика допущена для целей государственного экологического нтроля.

Москва, 1996г.

gost.e-ecolog.ru

Методика рассмотрена и одобрена Главным управлением аналитического контроля и метрологического обеспечения природоохранной деятельности (ГУАК) и Главным метрологом Минприроды РФ.

НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящий документ устанавливает методику оценки острой токсичности проб поверхностных пресных, грунтовых, питьевых, сточных и очищенных сточных вод, а также водных вытяжек из почвы и донных осадков.

1. ПРИНЦИП МЕТОДА

1.1. Измерения производятся с использованием в качестве тест-объекта препарата лиофилизированных мутантных бактерий *Escherichia coli* и стандартного промышленно изготавливаемого комплекта токси-хромотест.

1.2. Метод определения токсичности основан на способности токсикантов подавлять синтез энзима β-галактосидазы у мутантных бактерий *E. coli*, подавление синтеза сопровождается цветовой реакцией.

1.3. Критерием токсического действия является уменьшение интенсивности окрашивания тестируемой воды в исследуемой пробе по сравнению с таковой для пробы с раствором, не содержащим токсических веществ, пропорционально токсическому эффекту.

1.4. Оценка токсичности производится визуально, проба считается токсичной, если она дала светло-голубое окрашивание и оно менее интенсивное, чем в контроле.

2. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ИЗМЕРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

2.1. По настоящей методике выполняется качественное определение токсичности исследуемой среды.

2.2. Контроль качества ферментативной активности бактерий проводится на модельном токсиканте в каждом опыте. Диапазон реагирования на модельный токсикант, водный раствор хлорида ртути (I) — (HgCl), находится в пределах 0,06÷4 мкг/см^3.

3. СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ УСТРОЙСТВА, МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ

3.1. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы:

весы лабораторные общего назначения ГОСТ 24104;

термометр лабораторный , цена наименьшего деления шкалы С — 0,1 ГОСТ 215;

pH-метр ГОСТ 25.7416.0171 или аналоги;

набор токси-хромотест (набор изготавливается Канадской фирмой EBPI (Environmental Bio-detection Products Inc.), распространитель в России "ЭкоХелп Инструментс" 119899, Москва, Ленинские горы, МГУ, тел. 236-9885), который включает в себя:

3 пластиковых модуля с углублениями сосудами, используемые для процедуры биотестирования;

6 флаконов с необходимыми растворами:

A — флакон, включающий активатор для энзима β-галактосидазы и КО-факторы, необходимые для восстановления бактерий после стрессового состояния;

B — флакон с *лиофилизированными бактериями* токсихромотест, проницаемый мутант *E. coli*;

C — флакон с регидрирующим раствором для гидратирования бактерий;

Д — флакон со стандартным токсикантом, 4%-ным водным раствором хлорида ртути.

F — флакон с хромогенным субстратом.

G — флакон с разбавителем для стандартного токсиканта и исследуемой воды.

сушильный электрический шкаф общелабораторного назначения ГОСТ 13474;

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

часы сигнальные ТУ 25-07-57;

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

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

фильтры стеклянные класса ПОР-40 ГОСТ 25336;

буры почвенные;

ножи почвенные ГОСТ 23707;

лопаты ГОСТ 19596;

пробоотборник любого типа объемом 200-500 $см^3$;

холодильник бытовой, обеспечивающий замораживание при температуре –20 °С;

эксикаторы диаметром 140, 190, 250 мм ГОСТ 25336;

вставки для эксикаторов диаметром 128, 175, 230 мм ГОСТ 9147;

стаканчики для взвешивания (бюксы) диаметром 30,40 мм ГОСТ 7148;

лабораторные стаканы Н-2-100 ГОСТ 25336;

склянки и банки стеклянные с винтовым горлом, с прокладкой и крышкой или с притертой пробкой для отбора и хранения проб и реактивов вместимостью 100, 150 $см^3$ ТУ 6-19-6-70;

флаконы и банки цилиндрические полиэтиленовые с навинчивающимися крышками для отбора и хранения проб и реактивов вместимостью 100, 150 $см^3$ ТУ 6-19-45-74;

цилиндры мерные вместимостью 100, 1000 $см^3$ ГОСТ 1770;

пипетки стеклянные вместимостью 1, 2, 5, 10, 25 $см^3$ 2 класса точности ГОСТ 20292;

колбы мерные объемом 25,0; 50,0; 100,0 $см^3$ ГОСТ 1770

пипетки автоматические дозаторы объемом 0,1—0,2 $см^3 \pm 1{,}0\%$.

3.2 Реактивы:

дистиллированная вода ГОСТ 6709;

спирт этиловый (этанол) х.ч. ТУ 6-091710;

кислота соляная ГОСТ 3118;

натрий едкий ГОСТ 4328.

4. УСЛОВИЯ БЕЗОПАСНОГО ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТ

При проведении работ необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами ГОСТ 12.4.021.

Организация обучения работающих безопасности труда по ГОСТ 12.0.004.

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

Работать в спецодежде, пользоваться резиновыми перчатками, тщательно убирать рабочее место, дезинфицировать руки спиртом после работы.

Используемые в качестве биотестов лиофилизированные бактерии не патогенны, однако после каждого анализа необходимо стерилизовать всю используемую посуду, остатки растворов в сушильном шкафу при 105 °С в течение 1 часа, упаковав предварительно в пакеты, прикладываемые к набору токси-хромотест.

Хранить готовый комплект токси-хромотест (в промежутках между определениями) в холодильнике при температуре от +2 до +4 °С, следует беречь культуру лиофилизированных бактерий от нагревания и резкой смены температуры.

5. ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ОПЕРАТОРОВ

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

6. УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ

Измерения производятся в нормальных лабораторных условиях в соответствии с ГОСТ 15150.

Температура окружающего воздуха 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 в сети 220±10 В.

7.ОТБОР И ХРАНЕНИЕ ПРОБ

7.1. Подготовка посуды для отбора проб и биотестирования.

Используется посуда из пластика, а при наличии в воде нефти, углеводородов, 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), тщательно водопроводной водой, затем 3—4 раза дистиллированной водой, посуду для отбора проб сушат на воздухе, а используемую для биотестирования, за исключением мерной, сушат в сушильном шкафу при 160 °С в течение 1 часа. Не разрешается пользоваться синтетическими поверхностно-активными веществами и органическими растворителями.

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

7.2. Отбор проб.

Необходимый для выполнения анализа объем водной пробы составляет 50—100 $см^3$. Отбираемый объем должен быть в два раза больше требуемого для хранения дубликата пробы до конца биотестирования.

Отбор, хранение и транспортировка проб грунтовых вод осуществляется в соответствии с ГОСТ Р. Российский государственный стандарт (проект). Воды подземные. Отбор проб.

Отбор проб почвы , их транспортировка и хранение осуществляется в соответствии с ГОСТ 17.4.3.01-83 (СТ СЭВ 3847-82). Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб;

ГОСТ 17.4.4.02-84. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа.

Для отбора глубинных проб воды из озер, водохранилищ, прудов и рек следует использовать батометры системы Молчанова, Рутнера или Скадовского-Зернова.

Для отбора донных осадков следует использовать дночерпатели любой облегченной модели, например, системы Петерсена, Экмана Берджа.

Для отбора проб с глубины не более 0,5 м используется бутыль с привязанной пробкой, которую помещают в футляр или пробоотборник с грузом. Футляр снабжен петлей, к которой привязывают веревку с размеченными отрезками, указывающими глубину погружения. На требуемой глубине с помощью привязанной к пробке веревки выдергивают пробку из горла бутыли. После заполнения бутыли водой (на поверхности воды не появляются пузырьки воздуха) ее поднимают на поверхность.

Пробы в источнике водоснабжения питьевой и сточной воды с глубины менее 0,5 м отбираются пробоотборником любого типа.

Пробы питьевой воды отбираются из-под крана после 5-минутного слива, кран антисептической обработке не подвергается.

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

Отобранные пробы наливают, предварительно ополаскивая отбираемой водой, в банки или флаконы, заполняя их до краев и закрыв без пузырей воздуха, пришлифованными стеклянными пробками или полиэтиленовыми крышками. Под полиэтиленовые крышки подкладываются тефлоновые или из алюминиевой фольги прокладки. Пробы упаковываются в деревянные ящики и прокладываются бумагой или ветошью. При транспортировке не держать пробы на свету.

При взятии проб измеряют температуру воды. Для этого используют термометры с ценой деления 0,1 °С. Для определения температуры на месте взятия пробы 1 $дм^3$ воды наливают в склянку, нижнюю часть термометра погружают в воду и через 5 мин отсчитывают показания, держа его вместе со склянкой на уровне глаз. Точность определения ±0,5 °С.

При исследовании сточных вод на токсичность не допускается отбор разовой пробы. Выбор количества необходимых порций делают на основе опыта проведения анализа. Предпочтительно отбирать среднесуточную пробу каждый час. Допустимое минимальное количество отбираемых единичных проб для последующего смешения — три, с интервалом между отборами не менее часа.

На очистных сооружениях отбирать пробы для анализа на токсичность следует до системы хлорирования.

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, предполагаемые загрязняющие вещества, номер пробы, ФИО отбиравшего. На бутыль наклеивается этикетка с указанием номера пробы, места и даты отбора.

При отборе проб следует соблюдать технику безопасности. На крупных водотоках и водоемах следует соблюдать навигационные правила и правила эксплуатации используемого судна.

Постоянные места контроля следует выбирать в местах, которые были бы доступны в любое время, и где отсутствуют какие-либо природные опасности.

На очистных сооружениях отбор проб осуществляется в специально предназначенных местах, маркированных и освещаемых в темное время суток.

Отбор проб воды производится бригадой, состоящей минимум из двух человек.

Перед работой бригада должна быть проинструктирована о мерах предосторожности при выполнении программы работ в зависимости от места отбора, климатических условий и т.д.

Биотестирование проб воды проводят не позднее 6 часов после их отбора. При невозможности проведения анализа в указанный срок пробы воды охлаждают (+2÷+4 °С). Хранить пробы следует не более 24 часов после отбора. В исключительных случаях допускается замораживание проб (–20 °С) и их хранение до 2-х недель, однако следует помнить, что после размораживания токсичность воды может измениться. В случае предполагаемого замораживания пробы при ее отборе не следует заполнять сосуды полностью, чтобы избежать их разрыва. Если пробы требуется отстаивать или фильтровать, то фильтрация и отстаивание должны предшествовать замораживанию.

8. ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ

8.1.Подготовка водной вытяжки из почвы и донных отложений.

Почвы (донные осадки), отобранные с территорий, которые необходимо проконтролировать на токсичность, освобождают от корней, крупных посторонних частиц, гомогенизируют в почво-измельчителе и помещают в чистую стеклянную посуду. Выдерживают в сушильном шкафу при температуре 105 °С в течение 1 часа, после охлаждения взвешивают навеску. Для биотестирования берут 1 часть высушенной почвы (донных осадков) 4 части культивационной воды. Встряхивают полученную смесь в течение 2-х часов на аппарате для встряхивания жидкости, после 30-минутного отстаивания и сифонирования надосадочной жидкости, она фильтруется через бумажный фильтр (белая, красная ленты).

8.2. Подготовка вод.

Природные воды фильтруют через фильтр с диаметром пор 3,5 мкм при водорослевом цветении водоема.

При наличии в сточных водах крупнодисперсных включений необходима фильтрация пробы через фильтры обеззоленные наиболее порис-

тые — белая или красная ленты (недопустимо использовать синюю ленту, т.к. она задерживает коллоидные вещества, что занижает результаты биотестирования).

Грунтовые воды предварительной обработке перед изменением не подвергаются.

Активный хлор, используемый для обеззараживания питьевой и сточной воды является токсическим веществом, поэтому перед биотестированием питьевой воды, а также если необходимо проанализировать качество сточных вод после хлорирования, свободный хлор следует предварительно удалить из исследуемой воды отстаиванием пробы с открытой крышкой при температуре от +2 до +4 °С не менее, чем 12 часов.

Проба воды, подлежащая биотестированию, должна иметь pH 6,5-8,5; если pH пробы выходит за указанные пределы, подкисление осуществляется 10%-ным раствором HCl, подщелачивание — 10%-ным раствором NaOH.

К пробе сточных вод прибавляют рассчитанное количество щелочи или кислоты. Требуемое количество определяют титрованием аликвотной части пробы соответствующим раствором.

8.3. Приготовление растворов.

Соляная кислота, раствор в концентрации 0,5 моль/дм^3.

40 см^3 концентрированной соляной кислоты (d=1,19) добавляют к 500 см^3 дистиллированной воды и доводят до 1 дм^3.

Гидроксид натрия, раствор в концентрации 0,5 моль/дм^3. Навеску 20 г гидроксида натрия растворяют в дистиллированной воде и доводят до 1 дм^3.

9. ВЫПОЛНЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ

При проведении биотестирования температура исследуемой пробы должна соответствовать комнатной температуре

Вся процедура подготовки разбавлений и анализа исследуемой воды и водных вытяжек из почвы и донных осадков проводится в пластиковых модулях, 3 таких модуля прилагаются к комплекту.

Каждый модуль состоит из углублений — сосудов, размеченных на 12 колонок, по вертикали (обозначены от 1 до 12) и 8 рядов по горизонтали, обозначенные буквами: A, B, C, D, E, F, G, H (табл. 1).

Первая вертикальная колонка сосудов используется для опыта без внесения бактерий (отсутствие биотеста), чтобы исключить ошибки за счет возможной цветовой реакции химических веществ, входящих в состав исследуемой пробы.

Вторая вертикальная колонка сосудов используется для контроля чувствительности культуры бактерий к стандартному токсиканту — хло-

риду ртути. Контроль со стандартным токсикантом проводится при каждом исследовании.

Остальные десять вертикальных колонок могут быть использованы для пяти проб исследуемой воды различных разбавлений в 2-х повторностях.

8 рядов углублений - сосудов в пластиковом модуле, обозначенных буквами от А до Н используются для различных разбавлений исследуемой воды:

А — неразбавленная вода;
В — разбавленная исследуемая вода разбавление 1:2;
С — разбавление 1:4;
Д — разбавление 1:8;
Е — разбавление 1:16;
F — разбавление 1:32;
G — разбавление 1:64;
Н — разбавляющая вода без исследуемой, контроль.

9.1. Из бутыли G (входящей в комплект) разливать разбавитель микропипеткой по 0,1 $см^3$ кроме ряда А (где исследуемая вода анализируется без разбавления).

Если исследуют 5 проб одновременно, то заполнять все углубления - сосуды пластикового модуля. Если одна проба — то все сосуды до колонки 5.

9.2. Из бутыли Д (входящей в комплект) налить 0,2 $см^3$ стандартного токсиканта в первый сосуд колонки 2 ($А_2$). И далее используя восходящий ряд разбавлений 1:2, внести микропипеткой по 0,1 $см^3$ предыдущего разбавления, предварительно тщательно перемешивая приготавливаемые растворы.

Приготовление восходящего ряда разбавлений: из сосуда $А_2$ отобрать 0,1 $см^3$ раствора и перенести в сосуд $В_2$, тщательно перемешать и перенести 0,1 $см^3$ в сосуд $С_2$; повторить эту процедуру для всех сосудов, выбросив из последнего G 0,1 $см^3$ как избыточный объем.

9.3. Налить по 0,2 $см^3$ первой исследуемой пробы в первые сосуды ряда А 3 и 4 колонки (сосуды $А_3$ и $А_4$) и используя процедуру восходящего ряда разбавлений 1:2 разбавить пробу также как в п.9 2.

9.4. Если необходимо проконтролировать несколько проб, то готовятся их разбавления в колонках 5—12 по пункту 9.3.

9.5. Из бутыли А (входящей в комплект) разлить раствор в сосуды колонки 1 для опыта без внесения бактерий (отсутствие биотеста).

9.6. Процедура регидрирования лиофилизированных бактерий. С бутылей В и С (входящих в комплект) удалить пломбы и крышки и немедленно перенести раствор из бутыли С в бутыль В. Хорошо перемешать, осторожно встряхивая.

Оставить бутыль В с суспензией бактерий на 15 мин при комнатной температуре для регидрирования бактерий. Затем 1 $см^3$ полученной суспензии бактерий перенести в среду реагирования (бутыль А).

9.7. Полученную среду реагирования, включающую бактерий, разлить из бутыли А по 0,1 $см^3$ в каждый сосуд колонок 2 (со стандартным токсикантом) и колонок 3—4 для первой пробы, колонок 5—6 для второй и т.д.

9.8. Инкубировать полученные растворы в пластиковом модуле при 37 °С в термостате 90 минут.

9.9. Вынуть модуль из термостата и добавить 0,1 $см^3$ хромогенного субстрата из бутыли F (входящей в комплект) во все заполненные сосуды.

9.10. Инкубировать полученные растворы в пластиковом модуле при 37 °С 90 мин. Если за время инкубации цвет в контрольных сосудах ряда Н не достигнет интенсивно синего, инкубировать еще 20 мин.

9.11.Если безвредное разбавление исследуемых вод или водных вытяжек из почвы, данных осадков в стандартном ряде разбавлений не найдено, эксперимент повторяется исследованием дополнительного ряда разбавлений, где в качестве первого разбавления используется максимальное предыдущего исследования и далее используется восходящий ряд разбавлений по п. 9.2.

Вся грязная посуда после проведения анализов должна подвергаться стерилизации кипячением в течение 1 часа.

10. УЧЕТ, ОБРАБОТКА И ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты регистрируются визуально. Оценку токсичности пробы проводят по различию в окрашивании контрольной и опытной проб или ее разведений. Интенсивность цвета обозначается:

= нет окрашивания,

– очень слабое окрашивание,

± голубое окрашивание,

+ синее окрашивание,

++ темно-синее окрашивание,

+++ - интенсивно синее окрашивание.

Проба считается токсичной, если интенсивность окрашивания, обозначенная ±, ниже, чем в контроле. Пробы, обозначенные как +, ++, +++, считаются нетоксичными.

Если в 2-х повторностях при одной и той же концентрации исследуемых вод наблюдается различное окрашивание, позволяющее сделать противоречивые выводы о токсичности, — результаты опыта не учитываются.

Результаты контроля чувствительности к стандартному токсиканту регистрируются по интенсивности цвета в сосудах с разной концентра-

цией токсиканта. Интенсивность синего цвета возрастает при снижении концентрации хлорида ртути. В контрольном сосуде (H_2) без добавки токсиканта цвет должен быть интенсивно синий. Концентрации токсиканта 4 мкг/см^3 и 2 мкг/см^3 не должны давать окрашивания. Если в колонке 2 не появилось окрашивания, значит бактерии не функционируют и результаты опытов не учитываются. Культуру бактерий следует заменить, опыт переделать.

Результаты измерений оформляют протоколом, в котором указывают предприятие, место отбора пробы, дату отбора пробы, дату проведенного исследования, используемый биотест, выявленную токсичность в максимальном разбавлении пробы. Условия проведения анализа в соответствии с требованиями настоящей методики.

Таблица 1

План проведения биотестирования в пластиковом модуле набора токси-хромотест

Ряды	Колонки							
	без внесения бактерий	HgCl, мкг/см^3	проба 1	проба 2	проба 3	проба 4	проба 5	
	1	2	3 4	5 6	7 8	9 10	11 12	
A	–	4	без разведения					
B	–	2	1:2	1:2				
C	–	1	1:4	1:4				
D	–	0,5	1:8	1:8				
E	–	0,25	1:16	1:16				
F	–	0,125	1:32	1:32				
G	–	0,06	1:64	1:64				
H контроль	–	0	0	0				

gost.e-ecolog.ru