Министерство здравоохранения Республики Беларусь

«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель Министра
здравоохранения – Главный
государственный санитарный
врач Республики Беларусь

_____В.И.Качан
«28» 06 2010г.
Регистрационный №090-0610

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ, ПОЛИМЕРОВ, МАТЕРИАЛОВ, ИЗДЕЛИЙ И ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ С ПОМОЩЬЮ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО ТЕСТА

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр гигиены»

Авторы: И.А.Застенская, Н.В.Дудчик, Т.С.Трешкова, Д.С.Грек, В.В.Трейлиб, Т.О.Козлова

Минск-2010

ГЛАВА 1
ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая Инструкция по применению «Определение токсичности химических соединений, полимеров, материалов, изделий, парфюмерно-косметической продукции и объектов окружающей среды с помощью люминесцентного бактериального теста» (далее – Инструкция) устанавливает методику определения токсичности отдельных химических соединений, различных материалов, изделий и упаковок, включая полимеры и полимерсодержащие строительные материалы, применяемые в водоснабжении и в качестве материалов, контактирующих с пищевыми продуктами, а также подземных, поверхностных, сточных вод, седиментов и почвы с использованием в качестве тест-объекта люминесцентных микроорганизмов.

2. Настоящая Инструкция предназначена для органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор.

3. Результаты исследования качества материалов и изделий учитывают при определении уровня их возможного прямого или косвенного отрицательного влияния на здоровье человека и прогнозе степени их опасности для населения.

ГЛАВА 2
ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ

4. Оборудование.	Нормативная документация (СТБ, ГОСТ, ТУ и др.)
Анализатор потенциометрический (pH-метр)	ГОСТ 25.7416.0171
Весы лабораторные общего назначения	ГОСТ 24104
Прибор с набором кювет для измерения биолюминесценции объемом 1,5 мл	ТУ-446-У-028-00-ОТУ
Сушильный электрический шкаф	ГОСТ 13474
Термометр лабораторный 0-55^{o}C, цена деления шкалы – 0,5 ^{o}C	ГОСТ 215
Холодильник бытовой, обеспечивающий замораживание (-18 ± 1 ^{o}C)	
Часы сигнальные	ТУ 25-07-57
5. Материалы.	
Бумажные фильтры обеззоленные типа ФОБ (красная, белая ленты)	ТУ 6-09-1678

Воронки лабораторные	ГОСТ 25336
Пипетки автоматические дозаторы любого типа объемом 0,02-0,5 мл ± 1,0 %	
Пипетки вместимостью 0,5, 1,0 мл	ГОСТ 29227
Подставка с углублением для пенициллиновых пузырьков или измерительных кювет	
Стаканчики для взвешивания (бюксы) диаметром 30, 40 мм	ГОСТ 7148
Стаканы стеклянные лабораторные вместимостью 10,50 мл	ГОСТ 25336
Флаконы и банки стеклянные с навинчивающейся крышкой или с притертой пробкой для отбора и хранения проб вместимостью 10, 50, 100 мл	
Цилиндры вместимостью 25, 50 мл второго класса точности	ГОСТ 1770

6. Реактивы.

Бумага индикаторная универсальная для измерения pH	
Вода дистиллированная	ГОСТ 6709
Кислота серная	ГОСТ 4204
Кислота соляная	ГОСТ 3118
Лиофилизированная культура тест-организмов	ТУ 6-09-20-236-93
Натрия гидроокись	ГОСТ 4328
Спирт этиловый, х.ч.	ТУ 6-091710
Цинк сернокислый 7-водный	ГОСТ 4174

7. Допускается применение оборудования и материалов с аналогичными по назначению техническими и метрологическими характеристиками для проведения исследований в соответствии с настоящей Инструкцией. При их применении следует руководствоваться рекомендациями изготовителя.

ГЛАВА 3
ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

8. *Токсичность* – степень проявления вредного действия разнообразных химических соединений и их смесей. Токсичность – один из важных факторов, определяющих качество материалов и

изделий, достаточно информативный, существенно дополняющий представление о степени опасности или безопасности материалов и изделий при их использовании, являющийся необходимой составной частью комплексной системы контроля при стандартном анализе.

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

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

11. *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.

12. *Токсические эффекты*, регистрируемые методами биотестирования, включают комплексный, синергический, антагонистический эффект и дополнительные воздействия всех химических, физических и биологических компонентов, присутствующих в исследуемом объекте, неблагоприятно влияющие на физиологические, биохимические и генетические функции тест-организмов.

13. *Биолюминесценция* – интенсивное свечение в видимой области спектра, отражающее специфическую ферментативную функцию и общую метаболическую активность организмов.

ГЛАВА 4
ПРИНЦИП МЕТОДИКИ И ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОГРЕШНОСТИ

14. Методика основана на определении изменения интенсивности биолюминесценции штаммов 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 люциферазу, осуществляющую эффективную трансформацию энергии химических связей жизненно важных метаболитов в световой сигнал на уровне, доступном для экспрессных и количественных измерений.

15. Критерием токсического действия является изменение интенсивности биолюминесценции тест-объекта в исследуемой пробе по сравнению с таковой для пробы с раствором, не содержащим токсических веществ или эталонной пробой. Уменьшение интенсивности, биолюминесценции пропорционально токсическому эффекту.

16. Острое токсическое действие исследуемой пробы на бактерии определяют по ингибированию их биолюминесценции за 30-ти минутный (в экспрессном варианте – 5 минут) период экспозиции. Количественная оценка параметра тест-реакции выражают 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 исследуемой пробы с тест-объектом.

17. Методика допускает три пороговых уровня индекса токсичности:

допустимая степень токсичности образца: индекс токсичности Т меньше 20;

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

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

18. Метрологические характеристики биотеста должны составлять: сходимость результатов определения тест-параметра – 5 %, воспроизводимость результатов определения тест-параметра - 5 %.

ГЛАВА 5
ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ

19. 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 исследуемый образец.

20. Условия выполнения измерений.

20.1. Биотестирование проводят при температуре окружающего воздуха в лаборатории от + 18 °С до 25 °С. Относительная влажность воздуха 80 ± 5 %. Атмосферное давление 84-106 кПа (630-800 мм.рт.ст.). Помещение не должно содержать токсичных паров и газов.

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

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

21.1. Используют посуду из стекла. Посуда для отбора проб и биотестирования должна быть химически чистой. Ее промывают смесью бихромата калия и серной кислоты (хромовой смесью). Стенки посуды смачивают хромовой смесью, после чего на 2-3 часа посуду оставляют, затем тщательно промывают водопроводной водой, нейтрализуют раствором пищевой соды и промывают 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.

21.2. Химически чистую посуду для биотестирования хранят с закрытыми стеклянными притертыми пробками или завинчивающими крышками в защищенных от пыли ящиках лабораторного стола или на закрытых полках, стеллажах и т.п.

22. Отбор, транспортировка, хранение и подготовка проб.

22.1. При приготовлении пробы составляют протокол по утвержденной форме, в котором указывают цель пробоотбора, число, время, номер пробы, Ф.И.О. отбиравшего. На стакан или флакон наклеивают этикетку с указанием характера пробы, места и даты приготовления пробы.

22.2. Извлечение водорастворимых форм химических соединений из материалов и изделий:

в сосуд помещают изделие или его часть и заливают 5-ти кратным объемом (5 мл на 1 г образца) дистиллированной воды (pH 7,0-7,4) и выдерживают в течение 24 часов, полученный экстракт тестируют на токсичность.

Для определения качества изделия по сравнению с эталонным образцом завода-производителя последний заливают 5-ти кратным

объемом (5 мл на 1 г образца) дистиллированной воды (pH 7,0-7,4) и водную вытяжку используют как контрольный раствор.

22.3. Не допускается консервирование проб, предназначенных для исследования на токсичность.

23. Подготовка тест-объекта и прибора.

23.1. Реконструкция биосенсора. Вскрывают флакон с лиофилизированным биореагентом, добавляют 10 мл охлажденной до 4-8 ^{o}C дистиллированной воды, pH 7,0 – 7,4, несколько раз встряхивают флакон с суспензией бактерий. Желательно использовать стерилизованную дистиллированную воду. Выдерживают суспензию в холодильнике при температуре +2 ÷ +4 ^{o}C в течение 30 минут. Доводят температуру суспензии бактерий до комнатной температуры (15-25 ^{o}C). Рекомендуется перемешивание рабочей суспензии бактерий перед отбором определенных объемов для проведения анализа.

23.2. Подготовку прибора проводят в соответствии с методикой поверки прибора и инструкцией по эксплуатации.

23.3. Определение рабочей концентрации биосенсора. Измеряют фоновое значение прибора (по инструкции к прибору, при счете 10 сек без кюветы) и записывают это значение. Добавляют 0,1 мл суспензии бактерий из флакона в кювету люминометра. Затем туда же добавляют 0,9 мл дистиллированной воды (pH 7,0-7,4, комнатная температура). Вставляют кювету с биореагентом в люминометр и измеряют величину интенсивности биолюминесценции за 10 сек. Записывают эту величину.

Свечение рабочей суспензии бактерий должно находиться в интервале, превышающим фоновое значение прибора в 25-250 раз. Если обнаруженная величина меньше интервала, то необходимо увеличить добавку биосенсора (например, добавлять 0,2 мл и т.д.) и повторить измерение.

23.4. 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.

ГЛАВА 6
ПРОЦЕДУРА БИОТЕСТИРОВАНИЯ

24. Оценка общей токсичности материалов и изделий.

При определении индекса токсичности необходимо проводить параллельное измерение контрольных и опытных проб. Рекомендуется иметь не менее трех повторностей опытной пробы. Для большей достоверности данных число повторностей опытной пробы может быть

увеличено до 10 измерений. Существует два варианта измерений. Первый вариант – измеряется контрольная проба и запоминается значение интенсивности свечения. Затем измеряются повторности опытной пробы и прибор автоматически фиксирует значения индекса токсичности каждой пробы, усредненное значение индекса токсичности и погрешности измерения. Второй вариант – измеряются последовательности 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.

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

Измерение интенсивности биолюминесценции проводят с помощью прибора согласно инструкции по эксплуатации прибора в стандартном варианте через 30 минут экспозиции. В экспрессном варианте допустимо проведение анализа через 5 минут.

В случае наличия эталонного образца материалов и изделий исследования токсичности проводят в сравнении опытного и эталонного образцов. Проводят водную экстракция из эталонного образца и этот раствор используют как контроль. Условия экстракции должны быть строго одинаковыми в контроле и опыте.

25. Определение токсикологических параметров пробы, EC20 и EC50.

25.1. Эта операция предназначена для быстрого выяснения вопроса, при каких объемах (в опытах с чистым химическим соединением – концентрациях) 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 (в опытах с чистым химическим соединением – концентрация), вызывающий тушение свечения биосенсора на 50 % по сравнению с контролем. В этом случае образец сильно токсичен. Все значения величин менее EC20 свидетельствуют о том, что образец безвреден для человека.

Вычисление величин EC проводят с использованием достаточно известной в токсикологии гамма-функции. Гамма-функция (G)

представляет собой зависимость отношения потери интенсивности свечения пробы к оставшейся интенсивности свечения пробы и описывается формулой

$$G = (I_0 - I)/ I,$$

где I_0 и I соответственно интенсивность биолюминесценции в контроле и опыте.

Функция G 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 (или концентрации отдельного вещества) есть теоретически прямая линия молекулярности реакции токсического вещества с одной или несколькими мишенями, связывающими эти токсиканты в тест-объекте.

25.2. Рекомендуется перед измерением коэффициентов EC убедиться при измерении токсичности неразбавленной пробы, что величина G для данной пробы не превышает значения 25. В случае, если величина G больше, может увеличиться погрешность измерения величин EC. В таком случае пробу разводят дистиллированной водой до указанного предела и учитывают предварительное разбавление.

25.3. После вывода прибора в режим измерения EC для измерения параметров исследуют 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 заносят 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.

25.4. Определение гамма-функции для каждого из предварительно разведенных образцов проводят в соответствии с процедурой определения индекса токсичности 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 G-функции с представлением результата на дисплее. При интенсивности биолюминесценции опыта больше или равным контроля вычисление не производится.

ГЛАВА 7
ОБРАБОТКА, ОЦЕНКА И ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

26. 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 диапозоне допустимых значений.

27. 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

$$T=(T1+T2+T3)/3,$$

где Т1 – Т3 – повторности опытной пробы. Величины Т1, Т2 и Т3 получают из трех параллельных измерений контроль-опыт в короткий промежуток времени или при измерении в последовательности контроль, и затем серия опытных образцов.

28. В случае определения токсичности пробы (Т 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, доводят pH до значений 7,0-7,4 и повторяют измерение токсичности.

29. В ряде случаев возможен вариант, когда интенсивность биолюминесценции в анализируемой пробе больше, чем в контроле. В таком случае независимо от величины отрицательного значения «Т» делают вывод об отсутствии токсичности образца, и индекс токсичности принимает нулевое значение.

30. По величине индекса токсичности анализируемой пробы классифицируются на три группы:

значение «Т» меньше 20 (допустимая степень токсичности)

значение «Т» от 20 до 50 (образец токсичен)

значение «Т» равно или больше50 (образец сильно токсичен)

31. Результат токсикологического анализа представляют в виде протокола (Приложение 1).

ГЛАВА 8
КОНТРОЛЬ ПОГРЕШНОСТИ МЕТОДИКИ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

33. Контроль качества оценки токсичности объектов окружающей среды проводят по определению чувствительности используемых тест-организмов к модельному «эталонному» токсиканту – раствору цинка сернокислого 7-водного. Расчет проводят по содержанию ионов цинка. Диапазон концентраций модельного токсиканта, при действии которого в течение 30 минут интенсивность биолюминесценции ингибируется на 50%, составаляет 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 смесей и растворов, нарушения, допускаемые в условиях проведения опытов.

Процедуру определения диапазона реагирования тест-системы на модельный токсикант проводят 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
к Инструкции по применению
«Определение токсичности
химических соединений, полимеров,
материалов, изделий и объектов
окружающей среды с помощью
люминесцентного бактериального
теста»

Форма регистрации условий и результатов биотестирования

ПРОТОКОЛ №
Определение токсичности пробы с помощью биотеста

Наименование организации	
Наименование пробы	
Дата, время приготовления пробы	
Условия отбора и транспортировки пробы	
Дата измерения проб	
Число повторностей измерения проб	
Результаты биотестирования (усредненный индекс токсичности)	
Оценка токсичности пробы: допустимая степень токсичности, образец токсичен, образец сильно токсичен	
Исполнитель, Ф.И.О.	

ОГЛАВЛЕНИЕ

Инструкция по применению
«Определение токсичности химических соединений, полимеров, материалов, изделий, объектов окружающей среды с помощью люминесцентного бактериального теста»

стр.

Глава 1 Область применения…… 2

Глава 2 Оборудование, материалы и реактивы…….. 2

Глава 3 Термины и определения……. 3

Глава 4 Принцип методики и характеристики погрешности……... 4

Глава 5 Подготовка к проведению измерений…….. 5

Глава 6 Процедура биотестирования…….

Глава 7 Обработка, оценка и оформление результатов…… 10

Глава 8 Контроль погрешности методики токсикологического анализа……. 11

Приложение 1 (рекомендуемое) к Инструкции по применению…. 12

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

1. Настоящая инструкция разработана специалистами государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр гигиены» Министерства здравоохранения Республики Беларусь (И.А.Застенская, Н.В.Дудчик, Т.С.Трешкова, Д.С.Грек, В.В.Трейлиб, Т.О.Козлова).

2. Утверждена Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь 2010 г., регистрационный №

3. Введена впервые.