
**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ГИДРОМЕТЕОРОЛОГИИ
И МОНИТОРИНГУ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ (РОСГИДРОМЕТ)**

	РД
РУКОВОДЯЩИЙ ДОКУМЕНТ	52.18.682–
	2006

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Определение токсичности вод и донных отложений

**Методика выполнения измерений индекса токсичности
методом биотестирования по реакции
перекисного окисления липидов липосом**

2007

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Определение токсичности вод и донных отложений

**Методика выполнения измерений индекса токсичности
методом биотестирования по реакции
перекисного окисления липидов липосом**

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Государственным учреждением «Научно-производственное объединение «Тайфун», Институтом биохимической физики им. Н.М. Эмануэля

2 РАЗРАБОТЧИКИ И.В. Семенова, канд. биол. наук, Л.С. Эрнестова, доктор хим. наук, Е.В. Штамм, доктор хим. наук, С.Н. Харитонова

3 СОГЛАСОВАН с начальниками УМЗА Росгидромета 19.06.2006 и ЦКБ ГМП Росгидромета 06.02.2006

4 ОДОБРЕН Центральной методической комиссией Росгидромета 16.04.2003, Протокол №1

5 УТВЕРЖДЕН Заместителем Руководителя Федеральной службы по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды 20.06.2006

6 СВИДЕТЕЛЬСТВО ОБ АТТЕСТАЦИИ МВИ выдано ГУ «НПО «Тайфун» от 03.07.2005 № 5.18-2005

7 ЗАРЕГИСТРИРОВАН ЦКБ ГМП за номером РД 52.18.682 - 2006

8 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Содержание

Введение	V
1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки	1
3 Термины и определения	2
4 Характеристики погрешности измерений	
35 Средства измерений, вспомогательное оборудование, устройства, материалы и реактивы	4
6 Принцип метода	6
7 Требования безопасности и охраны окружающей среды	7
8 Требования к квалификации аналитика	7
9 Условия проведения биотестирования	7
10 Подготовка к проведению биотестирования	8
10.1 Подготовка посуды для отбора, хранения проб и проведения биотестирования	8
10.2 Отбор, транспортировка и хранение проб	8
10.3 Подготовка проб донных отложений для биотестирования	9
10.4 Приготовление и хранение растворов	10
10.5 Подготовка спектрофотометра	12
11 Проведение биотестирования	12
12 Вычисление результатов биотестирования	14
12.1 Вычисление индекса токсичности пробы	14
12.2 Проверка приемлемости результатов параллельных определений	14
12.3 Представление результатов	16
12.4 Определение токсичности пробы	16

13 Контроль качества результатов измерений	16
13.1 Перечень процедур контроля качества результатов измерений и периодичность их проведения.....	15
13.2 Определение диапазона реагирования тест-системы на эталонный токсикант	17
13.3 Оперативный контроль внутрилабораторной прецизионности	17
Приложение А (рекомендуемое). Форма рабочего журнала регистрации результатов при проведении биотестирования проб	19
Библиография	20

Введение

В настоящее время наблюдение за откликом биоценоза на действие возмущающих факторов (физических, гидрологических, химических и др.) рассматривается как обязательная составляющая экологического гидромониторинга. Для оценки степени проявления токсических эффектов, своевременного выявления источников опасного загрязнения объектов окружающей среды, способных оказать неблагоприятное действие на живые организмы, определения интенсивности их воздействия и оценки возможных экологических последствий, используют методы биотестирования с применением различного рода тест-объектов. Требования к режимным наблюдениям за загрязнением поверхностных вод суши сети Государственной службы наблюдений (ГСН) Росгидромета предусматривают оценку токсикологического состояния водных объектов с использованием биотестирования [1].

В Рекомендации [2] включено порядка 6–8 различных методов биотестирования, а в мировой практике их разработано более 100. Однако из-за сложного состава водной среды и большого разнообразия возможных откликов со стороны гидробиоценоза на антропогенное воздействие проблема разработки чувствительных и информативных методов биотестирования по-прежнему остается одной из актуальных задач водной токсикологии. При этом с одной стороны, целесообразно вести поиск таких тест-систем, которые могут использоваться в качестве экспресс-методов для оценки состояния свежесобраных проб воды, с другой стороны, используемые тесты должны быть чувствительными и интегральными, что позволяло бы судить об общей степени загрязнения водной среды.

Известно, что молекулярно-клеточный уровень наиболее чувствителен к изменениям химического состава окружающей среды. Поражение клеточных мембран лежит в основе токсического действия многих химических и физических факторов. Стабильность мембранных структур во многом определяется процессами перекисного окисления ненасыщенных остатков жирных кислот фосфолипидов, являющихся основным компонентом биомембран. Простейшей моделью клеточных мембран являются липосомы, состоящие из природных фосфолипидов. Перекисное окисление липидов липосом – это неферментативный свободно-радикальный процесс, скорость которого зависит от температуры, состава жирных кислот, а также от веществ, присутствующих в среде инкубации. В поверхностной воде, очищенной сточной воде и в донных отложениях

могут присутствовать вещества, способные как ускорять, так и тормозить реакцию окисления липидов. В зависимости от активности и соотношения этих веществ вода может обладать либо прооксидантными, либо антиоксидантными свойствами. В связи с этим изменение скорости перекисного окисления липидов липосом под влиянием компонентов поверхностных вод, очищенных сточных вод и водных вытяжек донных отложений можно рассматривать как чувствительную тест-реакцию для оценки их токсичности.

РУКОВОДЯЩИЙ ДОКУМЕНТ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Определение токсичности вод и донных отложений

Методика выполнения измерений индекса токсичности методом биотестирования по реакции перекисного окисления липидов липосом

Дата введения – 2008–01–01

1 Область применения

1.1 Настоящие методические указания устанавливают методику определения токсичности проб поверхностных вод, очищенных сточных вод и донных отложений (далее – проба) методом биологического тестирования с использованием реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ) липосом.

1.2 Методика определения токсичности проб основана на выполнении измерений индекса токсичности. Диапазон измерения индекса токсичности составляет от 10 % до 300 %.

П р и м е ч а н и е - При биологическом тестировании проб с индексом токсичности менее 10 % и более 300 % необходимо проводить соответствующее разбавление пробы контрольной водой (КВ).

1.3 Настоящие методические указания предназначены для использования в лабораториях, выполняющих измерения в области мониторинга загрязнения окружающей среды, контроля качества поверхностных и очищенных сточных вод и для проведения специальных токсикологических исследований.

2 Нормативные ссылки

В настоящих методических указаниях использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004-91 ССБТ. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019-79 ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009-83 ССБТ. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021-75 ССБТ. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 17.1.3.07-82 Охрана природы. Гидросфера. Правила контроля качества воды водоемов и водотоков

ГОСТ 17.1.5.01-80 Охрана природы. Гидросфера. Общие требования к отбору проб донных отложений водных объектов для анализа на загрязненность

ГОСТ 19179-73 Гидрология суши. Термины и определения

ГОСТ 27065-86 Качество вод. Термины и определения

ГОСТ Р 51592-2000 Вода. Общие требования к отбору проб

Примечание – Ссылки на остальные стандарты приведены в разделе 5.

3 Определения

В настоящих методических указаниях применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 биологическое тестирование воды (далее – биотестирование): Оценка качества воды по ответным реакциям водных организмов, являющихся тест-объектами (ГОСТ 27065).

3.2 биотест: Совокупность приемов получения информации о токсичности воды (донных отложений) для гидробионтов на основании регистрации реакций тест-объекта [2].

3.3 донные отложения: Донные наносы и твердые частицы, образовавшиеся и осевшие на дно в результате внутриводоемных физико-химических процессов, в которых участвуют вещества, как естественного происхождения, так и антропогенного.

3.4 индекс токсичности: Показатель, на основании которого оценивают степень загрязненности пробы и дают оценку ее токсичности.

3.5 инкубация: Время воздействия тестируемой воды на тест-объект.

3.6 критерий токсичности: Признак (показатель), на основании которого оценивают токсичность [2].

3.7 липиды: Жирные кислоты и их производные.

3.8 липосома: Простейшая модель клеточной мембраны (полая частица, содержимое которой ограничено липидной мембраной).

3.9 поверхностные воды: Воды, находящиеся на поверхности суши в виде различных водных объектов (ГОСТ 19179).

3.10 очищенная сточная вода: Вода, отводимая после использования в бытовой и производственной деятельности человека, прошедшая очистку и предназначенная для сброса в естественный или искусственный водоемы (реки, моря, озера, водохранилища).

3.11 тест-объект: Биологическая система, которую используют при биотестировании.

3.12 тест-реакция: Реакция тест-объекта, используемая для определения токсичности водной среды [2].

3.13 тестируемая вода; ТВ: Проба воды или водной вытяжки донных отложений, используемая для биотестирования.

3.14 токсикологический эксперимент: Эксперимент, в ходе которого оценивают влияние на тест-объект ТВ. Токсикологический эксперимент состоит из двух серий: опыт (с воздействием тестируемой воды) и контроль (без воздействия, но в тех же условиях) [2].

3.15 токсичность: Свойство воды, обусловленное наличием в ней токсичных веществ и степень проявления ядовитого действия различных соединений и их смесей, которые повреждают, ингибируют, стимулируют, вызывают генетические изменения или убивают организмы в воде, донных отложениях, почве, воздухе.

3.16 эталонный токсикант: Вещество с известными токсическими свойствами, используемое для определения чувствительности тест-объекта и для проверки пригодности тест-объекта к биотестированию.

4 Характеристики погрешности измерений

Значения показателей повторяемости и воспроизводимости методики измерения индекса токсичности при доверительной вероятности $P=0,95$ соответствуют характеристикам, приведенным в таблице 1.

Таблица 1

Наименование объекта	Диапазон измерения индекса токсичности $I_{\text{ток}}, \%$	Показатель повторяемости (относительное среднее квадратическое отклонение повторяемости) $\sigma_r, \%$	Показатель воспроизводимости (относительное среднее квадратическое отклонение воспроизводимости) $\sigma_R, \%$
Поверхностная вода Очищенная сточная вода Донные отложения (водная вытяжка)	От 10 до 300	9	13

5 Средства измерений, вспомогательное оборудование, устройства, материалы и реактивы

5.1 При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, вспомогательное оборудование, устройства, материалы:

- весы лабораторные высокого класса точности с наибольшим пределом взвешивания 100 г и пределом допускаемой погрешности ± 3 мг – по ГОСТ 24104-2001;
- спектрофотометр любого типа, имеющий спектрофотометрический диапазон от 400 до 800 нм (далее – спектрофотометр);
- холодильник бытовой, обеспечивающий температурные режимы от минус $(18 \pm 1)^\circ\text{C}$ до плюс 4°C ;
- сушильный электрический шкаф общелабораторного назначения с температурой нагревания от 40°C до 180°C ;
- приборы и устройства для отбора проб воды объемом от 500 до 1000 см³ – по ГОСТ 17.1.5.04-81;
- пробоотборник донных отложений любого типа;
- баня водяная любого типа;
- микроцентрифуга лабораторная – по ТУ 5.375-4261-76;
- шейкер пробирочный регулируемый на 30 мест;
- колбы исполнения 2, 2-го класса точности, вместимостью 25; 100; 1000 см³ - по ГОСТ 1770-74;

- пипетки типа 1, исполнения 1, 1-го класса, вместимостью 0,5; 1; 2; 5; 10 см³ – по ГОСТ 29227-91;
- пипет-дозатор П1 объемом 0,02 см³, 0,05 см³, 0,1 см³, 0,5 см³ – по ТУ 64-1-3329-81;
- пробирки исполнения 1, вместимостью 10 см³ с ценой деления 0,2 см³ – по ГОСТ 1770-74;
- пробирки типа П1 диаметром 16 мм, высотой 150 мм – по ГОСТ 25336-82;
- склянки и банки стеклянные с винтовым горлом, с прокладкой и крышкой или с притертой пробкой для отбора и хранения проб и реактивов вместимостью 500; 1000 см³ – по ТУ 6-19-6-70;
- флаконы и банки цилиндрические полиэтиленовые с навинчивающимися крышками для отбора и хранения проб и реактивов вместимостью 100; 250; 500; 1000 см³ – по ТУ 6-19-45-74;
- ступка № 4 с наибольшим наружным диаметром 110 мм – по ГОСТ 9147-80;
- сита капроновые (хозяйственные) с диаметром отверстий (1 ± 0,1) мм;
- воронки лабораторные типа В, диаметром 75 мм, высотой 110 мм – по ГОСТ 25336-82;
- фильтры обеззоленные «синяя лента» – по ТУ 6-09-1678-83;
- карандаш – по ТУ 480-11-59;

Примечание – Допускается использование других типов средств измерений, вспомогательного оборудования, устройств и материалов, в том числе импортного, с характеристиками, указанными в 5.1.

5.2 При выполнении измерений применяют следующие реактивы:

- спирт этиловый ректифицированный технический – по ГОСТ 18300-87;
- аскорбиновая кислота – по Р.73.941.9;
- вода дистиллированная – по ГОСТ 6709-72;
- железо (II) сернокислое 7-водное хч – по ГОСТ 4148-78;
- ионол (4-метил-2,6-дитретбутилфенол) хч (импортный препарат);
- калий двуххромовокислый хч – по ГОСТ 4220-75;
- кислота серная хч – по ГОСТ 4204-77;
- лецитин яичный ч – по ТУ 6-09-10-289-77;
- малеиновая кислота чда – по ГОСТ 9803-75;
- натрия гидроокись хч – по ГОСТ 4328-77;
- тиобарбитуровая кислота чда – по ТУ 6-09-2538-77;

- трис(оксиметил)аминометан гидрохлорид ч – по ТУ 6-09-2477-78;
- трихлоруксусная кислота чда – по ТУ 6-09-1926-77;
- хлороформ чда – по ГОСТ 20015-88.

Примечание – Допускается использование других реактивов, в том числе импортных, с квалификацией не ниже указанной в 5.2.

6 Принцип метода

6.1 Методика определения токсичности методом биотестирования основана на проведении реакции ПОЛ, инициированной железо-аскорбатной системой, в растворах липосом, приготовленных на КВ и ТВ. В результате реакции образуется конечный продукт перекисного окисления – малоновый диальдегид (далее – МДА), который при добавлении тиобарбитуровой кислоты (далее – ТБК) и осуществлении ТБК-реакции превращается в окрашенный триметиновый комплекс. Схема реакции представлена на рисунке 1.

Примечание – В качестве КВ используют дистиллированную воду.

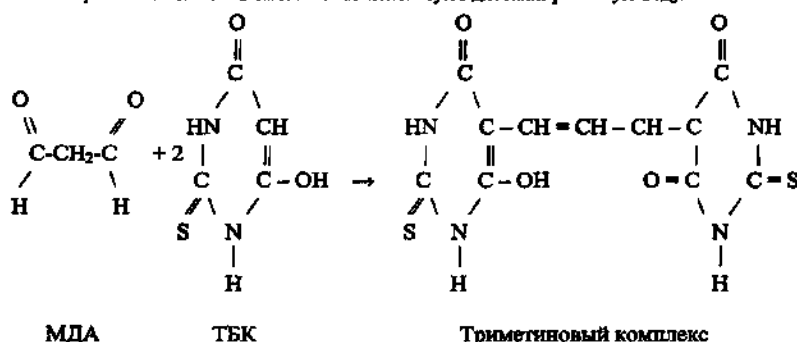


Рисунок 1 – Схема реакции образования триметинового комплекса

6.2 ТБК-реакцию осуществляют при температуре от 90 °С до 100 °С.

6.3 Триметиновый комплекс поглощает при длине волны $\lambda = 532$ нм с молярным коэффициентом экстинкции $\varepsilon = 1,56 \cdot 10^5$ моль⁻¹·дм³·см⁻¹.

6.4 Критерием токсичности ТВ является величина индекса токсичности, которая рассчитывается как соотношение разности оптических плотностей получившихся растворов ТВ и КВ до и после проведения реакции ПОЛ (раздел 12).

Если величина индекса токсичности менее 80 % или более 120 %, то ТВ оказывает токсическое воздействие (является токсичной).

Если величина индекса токсичности находится в интервале значений от 80 % до 120 %, то ТВ не оказывает токсического воздействия.

7 Требования безопасности и охраны окружающей среды

7.1 При проведении биотестирования следует соблюдать требования безопасности в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.007 и правилами [3].

7.2 Помещение, в котором проводится биотестирование, должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией согласно ГОСТ 12.4.021, должно соответствовать требованиям пожарной безопасности согласно ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения согласно ГОСТ 12.4.009.

7.3 Безопасность при работе с электроустановками должна обеспечиваться согласно ГОСТ 12.1.019.

7.4 Методика определения токсичности экологически безопасна.

8 Требования к квалификации аналитика

К проведению биотестирования допускаются лица (инженер, техник или лаборант со средним специальным образованием), прошедшие соответствующую подготовку, освоившие методические приемы водной токсикологии, имеющие навыки работы в химической лаборатории и изучившие руководство по эксплуатации спектрофотометра.

9 Условия проведения биотестирования

При проведении биотестирования должны соблюдаться следующие условия:

- температура окружающего воздуха (20 ± 5) °С;
- атмосферное давление .. от 84 до 106 кПа (от 630 до 795 мм рт.ст);
- относительная влажность окружающего воздуха от 30 % до 80 %;
- напряжение питающей сети переменного тока 220 ± 22 В;
- частота переменного тока (50 ± 2) Гц.

10 Подготовка к проведению биотестирования

10.1 Подготовка посуды для отбора, хранения проб и проведения биотестирования

10.1.1 Для отбора и хранения проб должна использоваться посуда из пластмассы, а при наличии в воде нефти, углеводородов, моющих средств и пестицидов - посуда из темного стекла.

10.1.2 Посуду для отбора, хранения проб и проведения биотестирования подготавливают следующим образом:

- промывают хромовой смесью;
- тщательно моют водопроводной водой;
- 3-4 раза ополаскивают дистиллированной водой;
- посуду для отбора проб сушат на воздухе;
- посуду для биотестирования, за исключением мерной, сушат в сушильном шкафу при температуре $(160 \pm 10)^\circ\text{C}$ не менее 1 ч.

10.1.3 Подготовленную согласно 10.1.2 посуду закрывают стеклянными притертыми пробками или завинчивающимися крышками и хранят в защищенных от проникновения пыли местах.

10.2 Отбор, транспортирование и хранение проб

10.2.1 Отбор, транспортирование и хранение проб воды

10.2.1.1 Пункты наблюдения и места отбора проб воды устанавливают в соответствии с ГОСТ 17.1.3.07 и методическими указаниями [1].

Примечания

1 Отбор проб поверхностных и очищенных сточных вод следует производить в местах наибольшего перемешивания.

2 Пробы воды на очистных сооружениях следует отбирать до системы хлорирования.

10.2.1.2 Отбор проб воды следует производить в соответствии с ГОСТ Р 51592, методическими указаниями [1] и рекомендациями [4].

10.2.1.3 Пробы воды отбирают с помощью пробоотборников, изготовленных согласно ГОСТ 17.1.5.04, в посуду из стекла или пластмассы вместимостью от 500 до 1000 см³.

10.2.1.4 Перед отбором проб воды посуду не менее трех раз ополаскивают водой из водоема (водотока), из которого предстоит отбирать пробу воды.

10.2.1.5 На посуду, содержащую пробу воды, наклеивают этикетку с указанием номера пробы воды, места и даты отбора.

10.2.1.6 Не допускается консервирование проб воды, предназначенных для исследования на токсичность.

10.2.1.7 Биотестирование проб воды проводят не позднее 24 ч после их отбора.

10.2.1.8 При невозможности проведения анализа в срок, указанный в 10.2.1.7 пробы воды охлаждают до температуры плюс $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ и хранят поверхностные воды не более 5 сут, очищенные сточные воды – не более 2 сут.

10.2.1.9 Допускается замораживание проб воды при температуре минус $(18 \pm 2)^\circ\text{C}$ и их хранение не более 14 сут.

П р и м е ч а н и е - Следует помнить, что после размораживания токсичность воды может измениться.

10.2.1.10 Перед биотестированием предварительно охлажденные или замороженные пробы воды доводят до температуры $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$.

10.2.2 Отбор, транспортирование и хранение проб донных отложений

10.2.2.1 Отбор проб донных отложений проводят согласно ГОСТ 17.1.5.01.

10.2.2.2 Пробы донных отложений, отобранные для биотестирования, помещают в пластиковые мешки или в специальную посуду из стекла или полиэтилена, в которых их хранят и транспортируют.

10.2.2.3 Биотестирование проб донных отложений проводят не позднее 24 ч после отбора.

10.2.2.4 При невозможности проведения биотестирования в срок менее 24 ч, пробы донных отложений охлаждают при температуре плюс $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ и хранят в холодильнике.

10.3 Подготовка проб донных отложений для биотестирования

10.3.1 Приготовление воздушно-сухой пробы производят следующим образом:

- пробу донных отложений выдерживают в сушильном шкафу при температуре $(105 \pm 5)^\circ\text{C}$ не менее 1 сут;
- высушенную пробу донных отложений растирают в ступке и просеивают через сито с диаметром отверстий $(1 \pm 0,1)$ мм.

10.3.2 Для приготовления водной вытяжки к 50 г воздушно-сухой

пробы донных отложений добавляют 200 см³ дистиллированной воды, взбалтывают в течение 1 ч и дают отстояться не менее 2 ч.

П р и м е ч а н и е – Допускается пропорциональное изменение массы пробы донных отложений и объема дистиллированной воды при сохранении соотношения между ними 1 : 4.

10.3.3 Для определения токсичности, обусловленной водорастворимыми загрязняющими веществами, используют 1/2 часть водной вытяжки после фильтрования через бумажный фильтр до получения прозрачного фильтрата.

10.3.4 Оставшуюся часть водной вытяжки хранят в холодильнике при температуре $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ и используют для повторного биотестирования, если потребуется разбавление вытяжки (индекс токсичности менее 10 %).

10.4 Приготовление и хранение растворов

10.4.1 Приготовление рабочего раствора лецитина с массовой концентрацией 30 мг/см³ производят следующим образом:

- к 1 см³ раствора лецитина в спирте или хлороформе 10 %-го добавляют 2,3 см³ соответствующего растворителя (этиловый спирт или хлороформ). Рабочий раствор готовят непосредственно перед анализом. Срок хранения - не более 24 ч.

10.4.2 Приготовление трис-малеатного буфера 0,05 моль/дм³ с величиной pH от 6,3 до 6,4 производят следующим образом:

- трис-малеатный раствор 0,2 моль/дм³ готовят растворением 2,42 г трис-(оксиметил)-аминометана гидрохлорида и 2,32 г малеиновой кислоты в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 100 см³;

- раствор гидроокиси натрия 0,2 N готовят растворением 800 мг гидроокиси натрия в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 100 см³;

- к 50 см³ трис-малеатного раствора 0,2 моль/дм³ добавляют 31,5 см³ раствора гидроокиси натрия 0,2 N и доводят объем до 200 см³ в мерной колбе дистиллированной водой. При необходимости доводят pH до значения от 6,3 до 6,4 добавлением растворов гидроокиси натрия 0,2 N или соляной кислоты 0,2 N.

Растворы трис-малеатного буфера 0,05 моль/дм³ и трис-малеатного раствора 0,2 моль/дм³ хранят при температуре $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ не более 6 мес.

Раствор гидроокиси натрия 0,2 N хранят в полиэтиленовой посуде. Срок хранения неограничен.

10.4.3 Приготовление раствора прооксидантов (аскорбиновая кислота, $1,0 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ - железо (II), $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³) производят следующим образом:

- раствор железа (II) $1,0 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³ готовят растворением навески 27,8 мг железа (II) сернокислого 7-водного в 10 см³ дистиллированной воды;
- раствор аскорбиновой кислоты $1,0 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³ готовят растворением 8,8 мг аскорбиновой кислоты в 5 см³ дистиллированной воды;
- $1,0$ см³ раствора аскорбиновой кислоты $1,0 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³ смешивают с $0,1$ см³ раствора железа (II) $1,0 \cdot 10^{-2}$ моль/дм³ и прибавляют 8,9 см³ дистиллированной воды.

Раствор прооксидантов готовят непосредственно перед проведением анализа.

10.4.4 Приготовление раствора ионола 0,01 %-го производят следующим образом:

- 10 мг ионола (4-метил-2,6-дитретбутилфенол) растворяют в 100 см³ этилового спирта.

Раствор хранят при температуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ не более 6 мес.

10.4.5 Приготовление раствора трихлоруксусной кислоты (далее - ТХУ) 20 %-го производят следующим образом:

- 25 см³ трихлоруксусной кислоты 80 %-ой разбавляют дистиллированной водой в мерной колбе вместимостью 100 см³ или 20 г трихлоруксусной кислоты растворяют в 80 см³ дистиллированной воды.

Раствор хранят в посуде из темного стекла. Срок хранения неограничен.

10.4.6 Приготовление раствора ТБК 0,33 %-го производят следующим образом:

- 330 мг ТБК растворяют в 100 см³ дистиллированной воды при нагревании на водяной бане с температурой не более 60°C .

Раствор хранят при температуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ не более 1 мес.

10.4.7 Приготовление основного раствора калия двуххромовокислого с массовой концентрацией $1,0$ г/дм³ производят следующим образом:

- 100 мг, предварительно высушенного при температуре $(105 \pm 5)^\circ\text{C}$ калия двуххромовокислого, растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 100 см³.

Раствор хранят не более 6 мес.

10.4.8 Рабочий раствор I калия двуххромовокислого с массовой концентрацией 10 мг/дм³ готовят разбавлением основного раствора в 100 раз. Раствор готовят в день применения.

10.4.9 Рабочие растворы калия двуххромовокислого готовят следующим образом:

- в мерные колбы вместимостью 50 см³ пипеткой последовательно вносят 0,5; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0 см³ рабочего раствора I калия двуххромовокислого с массовой концентрацией 10 мг/дм³, приготовленного по 10.4.8, и доводят объем дистиллированной водой до меток на колбах. Массовая концентрация калия двуххромовокислого в полученных растворах составит соответственно 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0 мг/дм³. Растворы готовят в день применения.

10.4.10 Приготовление хромовой смеси производят следующим образом:

- 15 г калия двуххромовокислого растворяют в 100 см³ горячей дистиллированной воды. Раствор охлаждают. При помешивании к раствору добавляют 100 см³ концентрированной серной кислоты.

10.5 Подготовка спектрофотометра

10.5.1 Подготовка спектрофотометра к работе проводится в соответствии с руководством по эксплуатации.

10.5.2 Спектрофотометрический анализ проводят при следующих условиях:

- длина волны 532 нм;
- воспроизводимость установки длин волн ± 0,2 нм.

11 Проведение биотестирования

11.1 В пронумерованные стеклянные пробирки вместимостью 10 см³ помещают по 0,1 см³ рабочего раствора лецитина, приготовленного по 10.4.1.

11.2 Для высушивания лецитина пробирки располагают в наклонном положении до полного испарения растворителя.

11.3 Готовят по два раствора КВ и ТВ следующим образом:

- в подготовленные пробирки, содержащие высушенный лецитин, вносят по 3,0 см³ КВ или ТВ и по 0,3 см³ трис-малеатного буфера;
- полученные растворы КВ и ТВ, тщательно перемешивая, ресуспендируют встряхиванием пробирок вручную или на шейкере не менее 5 мин до получения однородной эмульсии.

11.4 Параллельно готовят холостую пробу (ХП), не содержащую липидный материал. Для этого в стеклянную пробирку добавляют 3,0 см³ КВ и 0,3 см³ трис-малеатного буфера.

11.5 Для определения исходного содержания прооксидантов в пробах ТВ в чистые пронумерованные пробирки отбирают по 0,5 см³ растворов КВ и ТВ, приготовленных по 11.3, добавляют по 1,0 см³ раствора ТХУ 20 %-го, по 1,5 см³ раствора ТБК 0,33 %-го и по 0,01 см³ раствора ионола 0,01 %-го.

11.5.1 Пробирки с полученной по 11.5 смесью выдерживают на водяной бане при температуре от 90 до 100 °С в течение 15 мин.

11.5.2 После охлаждения смесь переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют не менее 10 мин при 3000 об/мин.

11.5.3 Далее проводят измерение оптической плотности A_0 надосадочной жидкости по 11.10.

Примечание -- Процедуры анализа по 11.5.1-11.5.3 проводят параллельно с проведением реакции по 11.6-11.8.

11.6 Для инициирования реакции перекисного окисления, после отбора аликвоты раствора по 11.5, в пробирки, содержащие фосфолипидную эмульсию (липосомы), быстро вносят по 0,15 см³ раствора прооксидантов.

11.7 Для перемешивания растворов пробирки встряхивают и регистрируют время начала реакции.

11.8 Растворы, полученные по 11.7, инкубируют при комнатной температуре в течение 30 мин, периодически встряхивая пробирки.

11.9 По окончании времени инкубации в чистые пронумерованные пробирки отбирают по 0,5 см³ растворов КВ, ТВ и ХП, добавляют по 1,0 см³ раствора ТХУ 20 %-го, по 1,5 см³ раствора ТБК 0,33 %-го и по 0,01 см³ раствора ионола 0,01 %-го.

11.9.1 Пробирки с полученной по 11.9 смесью выдерживают на водяной бане при температуре от 90 до 100 °С в течение 15 мин.

11.9.2 После охлаждения смесь переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют не менее 10 мин при 3000 об/мин.

11.9.3 Далее проводят измерение оптической плотности A_x надосадочной жидкости по 11.10.

11.10 Оптические плотности растворов полученных по 11.5.3 и 11.9.3 (надосадочная жидкость) измеряют на спектрофотометре при длине волны $\lambda = 532$ нм в кювете с толщиной слоя 1 см по отношению к ХП.

11.11 Последовательность проведения биотестирования и результа-

ты вычислений заносят в журнал, форма которого представлена в приложении А.

12 Вычисление результатов биотестирования

12.1 Вычисление индекса токсичности пробы

Индекс токсичности пробы $I_{пол}$, %, вычисляют по формуле

$$I_{пол} = \frac{\Delta A^{ms}}{\Delta A^{ks}} \times 100, \quad (1)$$

где ΔA^{ms} и ΔA^{ks} - соответственно среднее арифметическое значение разностей оптических плотностей растворов до (11.5.3) и после (11.9.3) проведения реакции ПОЛ для КВ и ТВ, причем

$$\Delta A^{ks} = \frac{1}{n} \sum_1^n (A_k^{ks} - A_0^{ks}), \quad (2)$$

$$\Delta A^{ms} = \frac{1}{n} \sum_1^n (A_k^{ms} - A_0^{ms}), \quad (3)$$

где A_0^{ks} и A_k^{ks} - соответственно оптическая плотность растворов КВ до и после проведения реакции ПОЛ;

A_0^{ms} и A_k^{ms} - соответственно оптическая плотность растворов ТВ до и после проведения реакции ПОЛ;

n – число параллельных определений в КВ или ТВ.

Для вычисления ΔA^{ks} и ΔA^{ms} предварительно проводят проверку приемлемости результатов параллельных определений в соответствии с подразделом 12.2.

12.2 Проверка приемлемости результатов параллельных определений

12.2.1 Проверку приемлемости результатов параллельных определений проводят при получении каждого результата оптической плотности растворов по 11.10 путем сравнения расхождения результатов параллельных определений r_r , %, полученных при биотестировании КВ и ТВ, с пределом повторяемости r_r .

12.2.2 Приемлемость результатов параллельных определений признают удовлетворительной, если выполняется условие (4):

$$r_k = \frac{2|\Delta A_1 - \Delta A_2|}{\Delta A_1 + \Delta A_2} \times 100 \leq r_p, \quad (4)$$

где ΔA_1 и ΔA_2 – соответственно результаты разности оптической плотности растворов КВ или ТВ параллельных определений;

$r_p = 2,77 \cdot \sigma_r = 25\%$ – предел повторяемости для уровня вероятности $P=0,95$ и $n=2$;

σ_r – показатель повторяемости методики выполнения измерений (МВИ), %, значение которого приведено в таблице 1.

12.2.3 Если выполняется условия (4), то по результатам параллельных определений вычисляют результат разности оптической плотности растворов КВ и ТВ по формулам (2) и (3) при $n=2$.

12.2.4 Если условие (4) не выполняется, то эксперимент с данной КВ или ТВ повторяют, получают еще два результата оптической плотности растворов КВ или ТВ в соответствии с разделом 11. Приемлемость результатов четырех параллельных определений признают удовлетворительной, если выполняется условие (5):

$$r_k = \frac{\Delta A_{\max} - \Delta A_{\min}}{\Delta A_4} \times 100 \leq r_p, \quad (5)$$

где $\Delta A_{\max}$ и $\Delta A_{\min}$ – максимальный и минимальный результат разности оптической плотности растворов КВ или ТВ четырех параллельных определений;

- средний арифметический результат четырех параллельных определений разности оптической плотности КВ или ТВ;

$r_p = 3,63 \cdot \sigma_r = 33\%$ – предел повторяемости для уровня вероятности $P=0,95$ и $n=4$.

12.2.5 Если выполняется условия (5), то по результатам параллельных определений вычисляют результат разности оптической плотности растворов КВ и ТВ по формулам (2) и (3) при $n=4$.

12.2.6 Если условие (5) не выполняется, то выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам контроля, устраняют их и повторяют измерения в соответствии с требованиями настоящей МВИ.

12.3 Представление результатов

Результаты вычислений представляют в виде:

$$I_{\text{та}} \pm \sigma_R \quad (6)$$

где $I_{\text{та}}$ - результат измерения индекса токсичности ТВ, %;

σ_R - показатель воспроизводимости МВИ, %.

12.4 Определение токсичности пробы

По рассчитанному индексу токсичности пробы (12.1) устанавливают группу токсичности и степень загрязненности пробы, дают оценку токсичности пробы в соответствии с классификацией, приведенной в таблице 2.

Таблица 2

Наименование объекта	Индекс токсичности $I_{\text{та}}$, %	Группа токсичности	Степень загрязненности пробы	Токсичность пробы
Поверхностная вода	Св. 80 до 120 включ.	I	Чистая	Допустимая
Очищенная сточная вода	Св. 40 до 80 включ. или св. 120	II	Загрязненная	Умеренная
Донные отложения (водная вытяжка)	Менее 40	III	Грязная	Высокая

13 Контроль качества результатов измерений

13.1 Перечень процедур контроля качества результатов измерений и периодичность их проведения

13.1.1 Контроль качества результатов измерений при определении токсичности проб предусматривает:

- проверку приемлемости результатов параллельных определений согласно подразделу 12.2;
- определение диапазона реагирования тест-системы на эталонный токсикант;

- оперативный контроль качества результатов измерений на основе оценки внутрилабораторной прецизионности.

13.1.2 Первичный контроль качества результатов измерений проводится при получении новой партии липидного материала (лецитина) и реактивов.

13.1.3 Периодический (статистический) контроль качества результатов измерений проводится в процессе работы с данной партией липидного материала и реактивов не реже 1 раза в квартал.

13.2 Определение диапазона реагирования тест-системы на эталонный токсикант

13.2.1 Контроль качества результатов измерений проводится по определению чувствительности тест-системы к эталонному токсиканту - калию двуххромовокислороду.

13.2.2 Массовая концентрация калия двуххромовокислородного, вызвавшая снижение индекса токсичности до $(70 \pm 5) \%$, должна находиться в интервале от 0,5 до 2,0 мг/дм³.

13.2.3 Далее проводят измерение с использованием рабочих растворов калия двуххромовокислородного, приготовленных по 10.4.9, и вычисляют их индекс токсичности, как описано в разделах 11 и 12.

13.2.4 Если массовая концентрация калия двуххромовокислородного, вызвавшая снижение индекса токсичности до $(70 \pm 5) \%$, находится в диапазоне от 0,5 до 2,0 мг/дм³, то чувствительность тест-системы соответствует необходимым требованиям и она может быть использована в проведении измерений.

13.2.5 Если массовая концентрация калия двуххромовокислородного не находится в диапазоне от 0,5 до 2,0 мг/дм³, то следует проверить правильность приготовления рабочих растворов калия двуххромовокислородного и реактивов и условия проведения измерений.

13.3 Оперативный контроль внутрилабораторной прецизионности

13.3.1 Оперативный контроль внутрилабораторной прецизионности результатов измерений проводят с использованием рабочих проб.

13.3.2 При проведении внутрилабораторных испытаний оперативный контроль внутрилабораторной прецизионности проводят с каждой

партий проб путем повторного анализа одной из проб в условиях внутрилабораторной прецизионности.

13.3.3 Оперативный контроль внутрилабораторной прецизионности проводят путем сравнения результата контрольной процедуры R_k с пределом внутрилабораторной прецизионности R_d .

13.3.4 Результат контрольной процедуры R_k равен расхождению двух результатов измерения индекса токсичности (первичного $I_{\text{пол},1}$ и повторного $I_{\text{пол},2}$) в одной и той же пробе и рассчитывается по формуле

$$R_k = |I_{\text{пол},1} - I_{\text{пол},2}|. \quad (7)$$

13.3.5 Качество контрольной процедуры признают удовлетворительным, если выполняется условие

$$R_k \leq R_d. \quad (8)$$

13.3.6 Значение предела внутрилабораторной прецизионности R_d устанавливают на основе выражения

$$R_d = 0,84 R, \quad (9)$$

где R – предел воспроизводимости методики, значение которого равно 36 %.

13.3.7 Если условие (8) не выполняется, то процедуру контроля повторяют с использованием второй контрольной пробы. При повторном невыполнении условия (8) проведение измерений приостанавливают, выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам контроля, и устраняют их.

Приложение А

(рекомендуемое)

Форма рабочего журнала регистрации результатов при проведении биотестирования проб

Место отбора проб:

Дата отбора проб:

Дата проведения биотестирования:

Шифр пробы	Номер параллельного определения	Номер пробирки	Результаты определения оптической плотности растворов, отн.ед.				η	ΔA_n	Индекс токсичности $I_{\text{токс}}$ %
			A_0	A_n	$A - A_0$	σA_0			
Холостая проба	—	0	—	—	—	—	—	—	
$K_2Cr_2O_7$, 1,0 мг/дм ³	—	1							
Контрольная вода	1	2						—	
	2	3							
Тестируемая вода №1	1	4							
	2	5							
Тестируемая вода №2	1	6							
	2	7							
...	...	...							
Тестируемая вода № ...	1								
	2								
...	...	...							

Примечание — Знак «—» означает, что графу не заполняют

 Аналитик _____
 подпись

 расшифровка подписи

Библиография

- [1] Руководящий документ РД 52.24.309-92 Методические указания. Охрана природы. Гидросфера. Организация и проведение режимных наблюдений за загрязнением поверхностных вод суши на сети Роскомгидромета.
- [2] Рекомендации Р 52.24.566-94 Методы токсикологической оценки загрязнения пресноводных экосистем.
- [3] Правила по технике безопасности при производстве наблюдений и работ на сети Госкомгидромета. - Л.: Гидрометеониздат, 1983.
- [4] Рекомендации Р 52.24.353-94 Отбор проб поверхностных вод суши и очищенных сточных вод.

УДК 504.4.054

Т58

Ключевые слова: токсичность, биологическое тестирование воды, перекисное окисление липидов липосом, индекс токсичности, поверхностные воды, очищенные сточные воды, донные отложения

ЛИСТ РЕГИСТРАЦИИ ИЗМЕНЕНИЙ

[illegible]

ДЛЯ ЗАМЕТОК

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ГИДРОМЕТЕОРОЛОГИИ
И МОНИТОРИНГУ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ (РОСГИДРОМЕТ)**

**РУКОВОДЯЩИЙ ДОКУМЕНТ
Р 52.18.682–2006**

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

**Определение токсичности вод и донных отложений
Методика выполнения измерений индекса токсичности
методом биотестирования по реакции
перекисного окисления липидов липосом**

Подписано в печать 10.10.2007г. Формат 60х84 1/16
Бумага писчая. Печать офсетная.
Тираж 150 экз.
Отпечатано в типографии ООО «Вектор-ТиС»
603105, г. Нижний Новгород, ул. Б. Панина, д. 3а, оф. 306, 322
Тел.: (8831) 218-51-36, 218-51-37
Факс: 218-77-40
E-mail: vectortis@mail.ru