

**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**

**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**

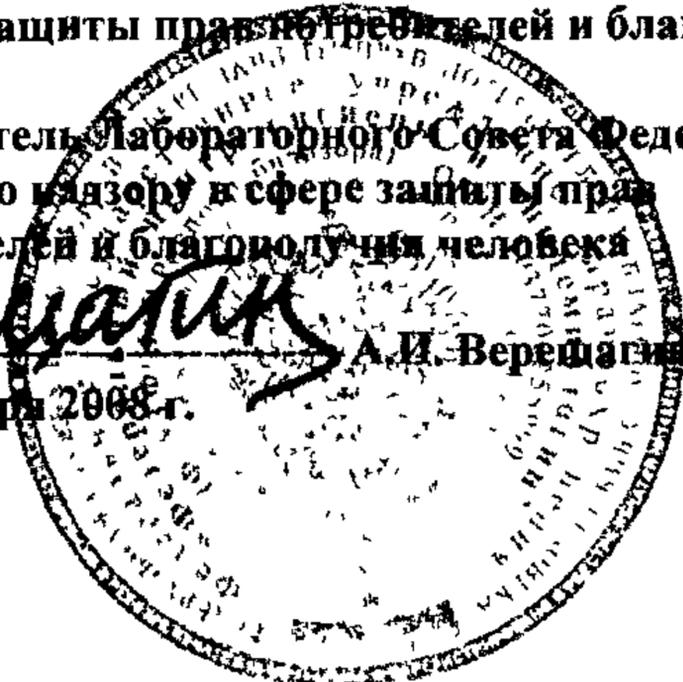
**Главный врач ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека**

**Председатель Лабораторного Совета Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека**

*А.И. Верещатин*

**А.И. Верещатин**

**«20» ноября 2008 г.**



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

**MP № 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 ЕС20 и ЕС50.

Индекс токсичности «Т», равный отношению  $T=100(I_0-I)/I_0$ , где  $I_0$  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  $T$  меньше 20;
- 2) образец токсичен: индекс  $T$  равен или больше 20 и меньше 50,
- 3) образец сильно токсичен. индекс токсичности  $T$  равен или более 50.

Токсикологические параметры пробы ЕС20 и ЕС50, определяемые также посредством измерения  $I_0$  и  $I$ , позволяют быстро и экономно выяснить вопрос при каких объемах исходного слабо токсического образца достигается установленный предел токсичности (ЕС20

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 свечения 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  $G=(I_0-I)/I$ , где  $I_0$  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°C.

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, типа 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 гидроксид, 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  $-18^{\circ}\text{C}$ , 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  $105^{\circ}\text{C}$  в течение 1 часа.

Хранить тест-культуру «Эколюм» в холодильнике при температуре от  $-18^{\circ}\text{C}$  до  $+4^{\circ}\text{C}$ , 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°C. Относительная влажность воздуха  $80 \pm 5\%$  Атмосферное давление 84-106 кПа (630-800 мм рт.ст.). При использовании электроприборов частота переменного тока  $50 \pm 1$  Гц. Напряжение сети  $220 \pm 10$  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°C в течение 1 часа.

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

### **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, рН 7.0-7.4) и выдерживают 10 мин. Рекомендуются 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.

#### **Регидратация биосенсора «Эколюм».**

Вскрыть флакон с лиофилизированным препаратом «Эколюм». Добавить 10 мл дистиллированной воды, рН 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 (рН 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 готовят контрольный образец путем смешения в кювете от люминометра 0,1 мл рабочей суспензии бактерий и 0,9 мл дистиллированной воды (рН 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 контролю 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 «Г». Абсолютная величина интенсивности биолюминесценции контроля не имеет принципиального значения в диапазоне допустимых значений прибора «Биотокс-10».

Приготавливают три повторности водного экстракта ингредиента. Обработку результатов измерений токсичности выполняют путем расчета среднеарифметического значения величины индекса токсичности «Г» по формуле  $T = (T_1 + T_2 + T_3) / 3$ , где T1-T3 - повторности опытной пробы. Величины T1, T2 и T3 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 ЕС20 и ЕС50.

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 ЕС20) и их ингредиентов (индекс токсичности) представлены в таблице 2

Таблица 2.

Количественные параметры оценки токсичности ПК продукции.

Вид продукции	Т	ЕС20
Моющие средства		1 5000
Ингредиенты моющих средств	20	концентрация, вызывающая ЕС20
Сравнение моющих средств и их ингредиентов с эталонным образцом	20	

ПК продукция признается токсичной, если согласно параметру ЕС20 необходимо большее разбавление, нежели указано в таблице 2. При достижении параметра ЕС50 продукция признается сильно токсичной

При определении токсичности ингредиента продукции нужно сопоставить концентрацию, вызывающую ЕС20, 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  $T=20$  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 ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ). 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 смесей 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:

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

$\bar{X}$  — среднее арифметическое определений,

За результат анализа ( $\bar{X}$ ) принимают среднее арифметическое результатов трех (или более - до 10) параллельных измерений индекса токсичности. Индекс токсичности  $T$  вычисляется по формуле  $T=100 (I_{\text{контр}} - I_{\text{опыт}})/I_{\text{контр}}$ , где  $I_{\text{контр}}$  и  $I_{\text{опыт}}$  соответственно интенсивности биолюминесценции бактерий в контрольной и опытной пробах.

Среднее квадратичное отклонение ( $\sigma$ ) 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.	