

Министерство здравоохранения Российской Федерации  
(Минздрав России)

**Федеральное медико-биологическое агентство  
(ФМБА России)**

СИСТЕМА СТАНДАРТИЗАЦИИ В ЗДРАВООХРАНЕНИИ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ГРУППА 12. ТРЕБОВАНИЯ К ПРОФИЛАКТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ЗАЩИТЕ ЗДОРОВЬЯ НАСЕЛЕНИЯ ОТ ПОВРЕЖДАЮЩИХ ФАКТОРОВ, ОХРАНЕ РЕПРОДУКТИВНОГО ЗДОРОВЬЯ И ОКАЗАНИЮ МЕДИКО-СОЦИАЛЬНОЙ ПОМОЩИ

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ПЕРИОДА ЕСТЕСТВЕННОЙ ОЧИСТКИ  
ПРИРОДНЫХ ВОДОЕМОВ ОТ ТОКСИНОВ СИНЕ-ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ**

Методические рекомендации  
МР ФМБА России 12.07-18

Москва  
2018

## ПРЕДИСЛОВИЕ

1 Разработаны Федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН ИТ ФМБА России).

Директор – д.м.н. М.Б. Иванов,  
заместитель директора – д.м.н. В.Л. Рейнюк.

2 Исполнители: к.х.н. И.К.Журкович, д.х.н. Б.Л.Мильман, к.х.н. А.В. Соловьева, В.А. Утсаль, Н.В. Луговкина.

3 В настоящем документе реализованы требования Законов Российской Федерации:

– От 30 марта 1999 г. №52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения»;

– От 21 декабря 1994 г. №68-ФЗ «О защите населения и территорий от чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера»;

– От 10 января 2002 г. №7-ФЗ «Об охране окружающей среды»;

– От 21 ноября 2011 г. №7-ФЗ Федеральный закон «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».

4. Утверждены и введены в действие Федеральным медико-биологическим агентством «28» февраля 2018 г.

5. Введены впервые.

**СОДЕРЖАНИЕ**

ПРЕДИСЛОВИЕ 2

ВВЕДЕНИЕ 4

1 Область применения 5

2 Нормативные ссылки 6

3 Обозначения и сокращения 6

4 Описание метода 6

4.1 Материально-техническое обеспечение 6

4.2 Основные этапы оценки безопасности акваторий в период «цветения»  
цианобактерий 7

5 Эффективность применения методических рекомендаций 16

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 17

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время запасы воды стали одним из наиболее дефицитных природных ресурсов планеты. В этих условиях особое значение приобретает экологическая чистота естественных и искусственных водоемов, которая сильно страдает от хозяйственной деятельности человека. Промышленные и сельскохозяйственные отходы, содержащие азот и фосфор, нарушают их природный баланс в гидросфере, что способствует интенсивному росту биомассы цианобактерий (сине-зеленых водорослей). Вторичные метаболиты этих микроорганизмов весьма разнообразны, однако наибольшую опасность для здоровья людей и животных представляют микроцистины, продуцируемые видами *Microcystis*, *Planktothrix*, *Nostok* и *Anabaena*, которые обладают гепато-, нейро- и дерматотоксическим действием [1,2].

С химической точки зрения эти соединения относятся к ряду циклических гептапептидов с вариацией двух аминокислот в фиксированных положениях и структурой боковых цепей. На сегодняшний день идентифицировано более 80 производных этого класса, но максимально допустимый уровень содержания в воде (1мкг/л) пока установлен ВОЗ только для самого распространенного и токсичного его представителя – микроцистина LR.

Внутриклеточное содержание микроцистинов в молодых клетках цианобактерий составляет от 0,1 до 10 мкг/мл. Угроза интоксикации возникает при достижении уровня токсинов в водоеме 2-4 мкг/л и численности цианобактерий  $2 \times 10^6$  клеток/л. Как правило, концентрация вторичных метаболитов резко возрастает в период «цветения» за счет гибели популяций фитопланктона и лизиса клеток. По данным международной гидрологической программы UNESCO “CYANONET”; в 2005 году появление микроцистинов выявлено в природных водоемах 65 стран мира. При этом их максимальные концентрации достигали 50 мкг/л или 7 мг/г сухой биомассы [3].

Проблема загрязнения окружающей среды вторичными метаболитами цианобактерий стимулирует поиск эффективных технологий очистки воды в природных водоемах, в том числе с применением озонирования или ультрафиолетового облучения, а также дорогостоящих сорбентов и микроорганизмов.

В настоящих методических рекомендациях описан способ оценки безопасности природных водоемов и прогнозирования периода их естественной очистки от токсичных метаболитов цианобактерий, основанный на использовании физико-химических и кинетических факторов, влияющих на стабильность микроцистинов в окружающей среде.

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель руководителя  
Федерального медико-биологического  
агентства



М.В. Забелин

« 28 » сентября 2018 г.

СИСТЕМА СТАНДАРТИЗАЦИИ В ЗДРАВООХРАНЕНИИ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ГРУППА 12. ТРЕБОВАНИЯ К ПРОФИЛАКТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ЗАЩИТЕ  
ЗДОРОВЬЯ НАСЕЛЕНИЯ ОТ ПОВРЕЖДАЮЩИХ ФАКТОРОВ, ОХРАНЕ  
РЕПРОДУКТИВНОГО ЗДОРОВЬЯ И ОКАЗАНИЮ МЕДИКО-  
СОЦИАЛЬНОЙ ПОМОЩИ

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ПЕРИОДА ЕСТЕСТВЕННОЙ ОЧИСТКИ  
ПРИРОДНЫХ ВОДОЕМОВ ОТ ТОКСИНОВ СИНЕ-ЗЕЛЕННЫХ  
ВОДОРОСЛЕЙ**

Методические рекомендации

МР ФМБА России 12.07-18

---

## **1 Область применения**

Настоящие методические рекомендации распространяются на химико-токсикологические исследования безопасности природных источников питьевой воды и гидрообъектов окружающей среды.

Документ устанавливает общий порядок оценки безопасности природных водоемов и прогнозирования их естественной очистки от токсичных вторичных метаболитов цианобактерий.

Методические рекомендации предназначены для контрольных лабораторий системы экологического и санитарно-эпидемиологического надзора, а также для организаций, производящих заготовки аквабиоресурсов для пищевой и фармацевтической отраслей.

## **■ Нормативные ссылки**

Настоящий документ разработан на основании рекомендаций и требований следующих нормативных правовых актов и нормативных документов:

– Федерального закона от 30 марта 1999 № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения»;

– Постановления Правительства Российской Федерации от 28 апреля 2015 г. № 418 «О федеральной целевой программе «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2015–2020 годы)».

П р и м е ч а н и е – При пользовании настоящими рекомендациями целесообразно проверить действия ссылочных нормативных документов в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году.

## ■ **Обозначения и сокращения**

УЭЖХ – ультраэффективная жидкостная хроматография

МС – масс-спектрометрия

ТФЭ – твердофазная экстракция

## ■ **Описание метода**

### **4.1 Материально-техническое обеспечение**

#### 4.1.1 Химические реактивы

Ацетонитрил, сорт 0 (Криохром).

Метанол (Burdlich & Jackson).

Вода деионизованная.

Муравьиная кислота (Fluka).

#### 4.1.2 Растворы

Растворы стандартных образцов микроцистинов LR, RR, LA и YR с концентрацией 10 мкг/мл (Braxis).

#### 4.1.3 Материалы

Автоматические пипетки 1000 и 5000 мкл (Biohit).

Пробирки Эппендорфа 1,5 мл.

Штативы для пробирок Эппендорфа.

Патроны концентрирующие Evolute ABN, 200 мг (Biotage).

Хроматографические виалы 1 мл с завинчивающимися крышками (Supelco).

Колбы мерные 250 и 1000 мл.

Колонка хроматографическая ВЕН CSH (100 × 2,1)мм, 1,7 мкм (Waters).

Наконечники для дозаторов 50-1000 мкл (Scientific Specialties Inc.).

Цилиндр мерный 100 мл.

Термометр лабораторный ГОСТ 2823-59.

#### 4.1.4 Приборы

Ультраэффективный жидкостный хроматограф с тандемным масс-спектрометром (Waters).

Весы аналитические (Ohaus).  
рН-метр (Hanna).  
Центрифуга лабораторная (Eppendorf).  
Холодильник бытовой с морозильной камерой (Samsung).  
Комбинированная мембранная установка для получения  
деионизованной воды (Россия).  
Насос водоструйный.

## **4.2 Основные этапы оценки безопасности акваторий в период «цветения» цианобактерий**

Экотоксикологический анализ включает следующие основные этапы:

- Изучение проб воды на присутствие микроцистинов с целью установления факта токсикологической угрозы и их количественное определение.
- Измерение и оценка показателей окружающей среды, влияющих на стабильность микроцистинов в водных растворах.
- Определение периода химических трансформаций микроцистинов, достаточного для снижения их концентрации до безопасного уровня (1мкг/л), с учетом внешних и внутренних условий.

### **4.2.1 Определение микроцистинов в воде**

Для химического мониторинга микроцистинов разработана методика измерений массовых концентраций микроцистинов LR, RR, LA и YR в пробах воды методом ультраэффективной жидкостной хроматографии – масс-спектрометрии. Аналитическая процедура предполагает построение градуировочного графика для каждого из четырех микроцистинов и прямое измерение их концентраций в испытуемых образцах методом УЭЖХ-МС. В диапазоне концентраций микроцистинов от 2 до 100 нг/мл специальная подготовка проб воды и их концентрирование не требуются. Для определения более низкого содержания токсинов рекомендуется применение метода твердофазной экстракции (ТФЭ).

#### **4.2.1.1 Концентрирование проб методом ТФЭ**

- Концентрирующий патрон подключают к вакууму водоструйного насоса и последовательно пропускают через него по 3 мл метанола и воды.
- Через подготовленный патрон пропускают 100 мл воды (испытуемый образец) со скоростью 1 капля / сек. Фильтрат отбрасывают.
- Микроцистины элюируют 5 мл метанола.

Описанная пробоподготовка обеспечивает концентрирование аналитов в 20 раз.

#### **4.2.1.2 Построение градуировочных графиков**

– В мерные колбы вместимостью 250 мл помещают соответственно по 0,05; 0,25; 0,50; 1,25 и 2,50 мл стандартных растворов микроцистинов LR, RR, LA и YR. Объемы растворов доводят до метки деионизованной водой и перемешивают. Полученные градуировочные растворы имеют по каждому компоненту следующие концентрации: 2, 10, 20, 50 и 100 нг/мл.

– Градуировочные растворы хроматографируют в условиях, описанных в пункте 4.2.1.3, и строят для каждого анализта график зависимости площади аналитического сигнала от концентрации (рисунки 1-4).

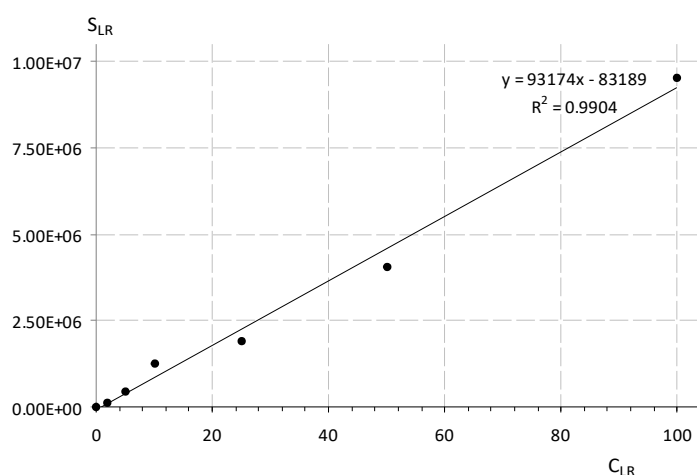


Рисунок 1 – Градуировочный график для количественного определения микроцистина LR в воде

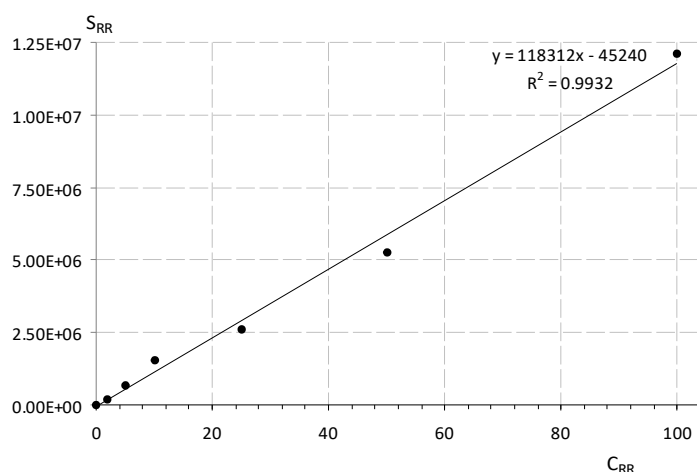


Рисунок 2 – Градуировочный график для количественного определения микроцистина RR в воде



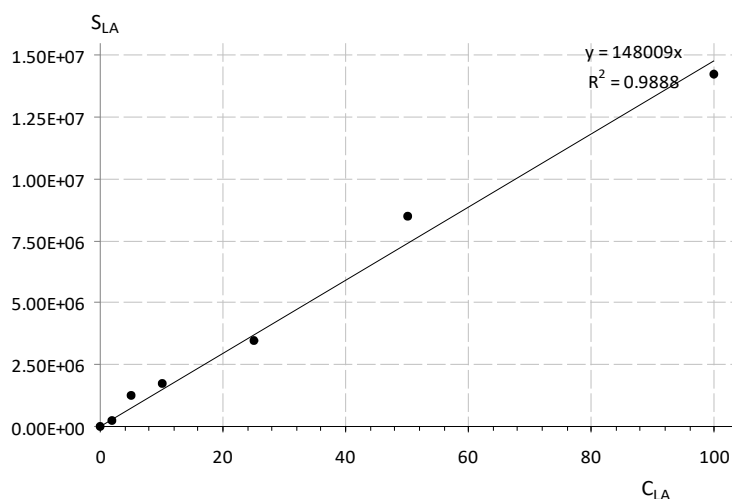


Рисунок 3 – Градуировочный график для количественного определения микроцистина LA в воде

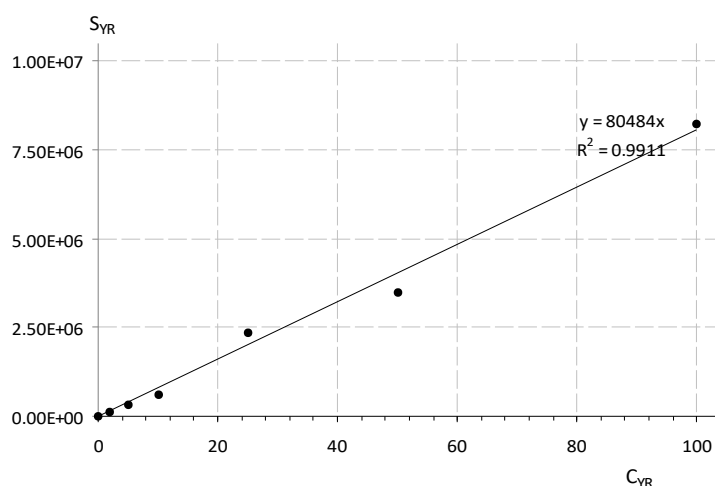


Рисунок 4 – Градуировочный график для количественного определения микроцистина YR в воде

#### 4.2.1.3 Условия хроматомасс-спектрометрического анализа микроцистинов LR, RR, LA и YR

Параметры хроматографического разделения компонентов проб и МС-детектирования приведены в таблицах 1 и 2. Типичная хроматограмма, полученная в ион-селективном режиме, представлена на рисунке 5.

Таблица 1 – Хроматографический анализ микроцистинов LR, RR, LA и YR

Хроматограф	Acquity
Колонка	BEH CSH, 100×2,1 мм, 1,7 мкм
Подвижная фаза	Компонент А — 0.1% раствор муравьиной кислоты в воде Компонент В — ацетонитрил

Продолжение таблицы 1

Режим хроматографического элюирования	Градиентный:		
	Время (мин)	% А	% В
	0	90	10
	1	90	10
	6	75	25
	9,5	75	25
Скорость потока элюента	0,2 мл/мин		
Температура термостата колонки	25 °С		
Температура термостата отделения для проб	5 °С		
Объем ввода пробы	5 мкл		

Таблица 2 – Условия МС-детектирования микроцистинов LR, RR, LA и YR

Тип ионизации	Электрораспыление
Режим детектирования	Детектирование в режиме полного ионного тока от 100 до 1100 Da
Полярность детектируемых ионов	Положительные ионы
Масс-спектральное разрешение	Низкое
Температура газа осушителя	350 °С
Напряжение на капилляре	3,5 кВ
Скорость потока газа-осушителя	650 л/час
Температура источника	150 °С
<i>m/z</i> : микроцистин LR	995,5556 и 498,2815
микроцистин RR	1038,5731 и 519,7919
микроцистин LA	910,492
микроцистин YR	1045,5353 и 523,2713

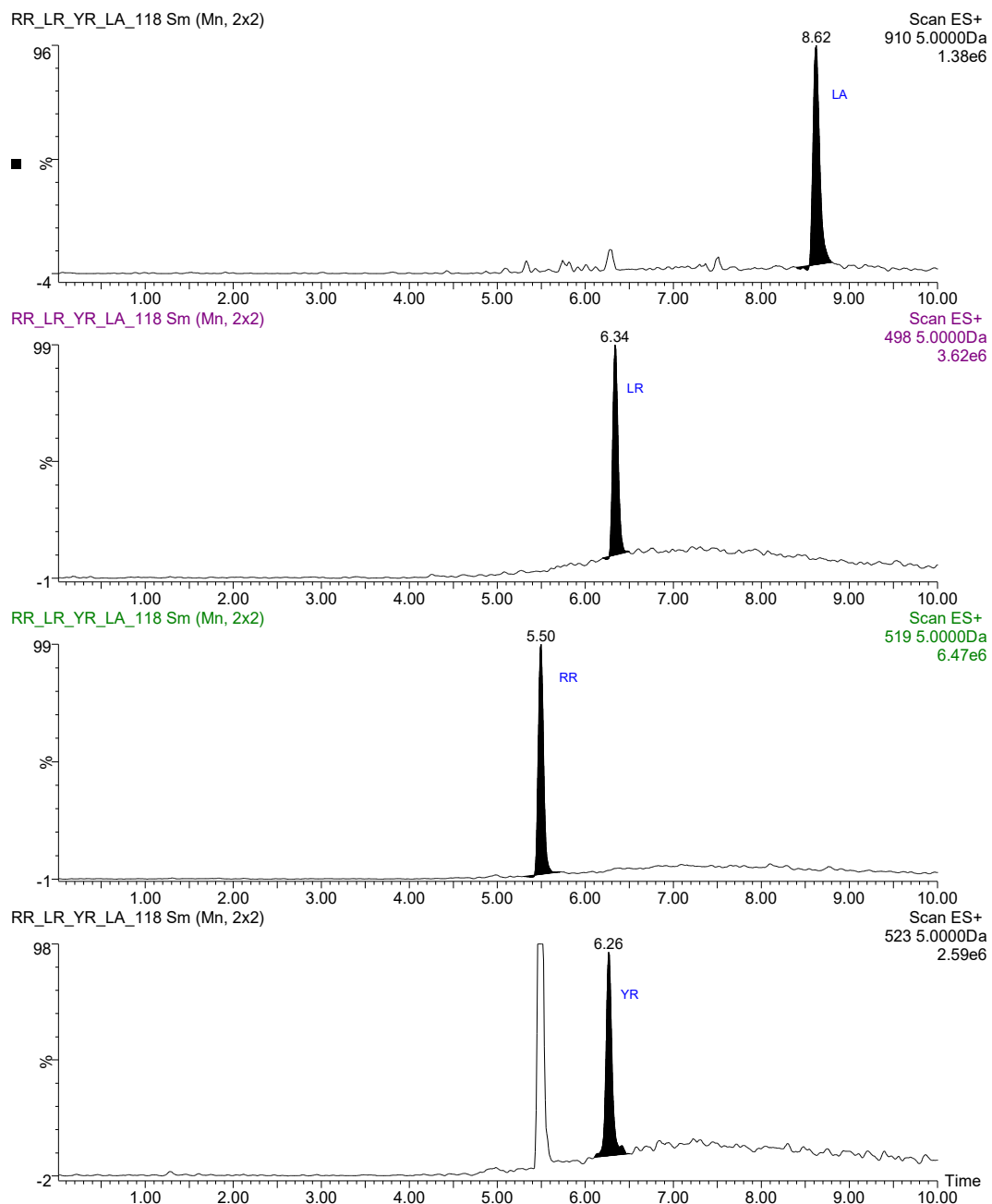


Рисунок 5 – Одновременное определение микроцистинов LR, RR, LA и YR в воде методом ультраэффективной жидкостной хроматографии с МС-детектированием

#### 4.2.1.4 Обработка результатов

В случае прямого анализа концентрацию микроцистинов в пробах воды в нг/мл определяют автоматически с помощью градуировочных кривых 1-4. Если испытуемый образец был предварительно сконцентрирован на патроне, то содержание микроцистинов ( $C$ ) в нг/мл вычисляют по формуле (1):

$$C = C_{cp} / 20,$$

(1)

где  $C_{гр}$  – концентрация микроцистина, найденная по градуировочному графику в нг/мл;

20 – числовой коэффициент, учитывающий степень концентрирования.

#### 4.2.2 Показатели окружающей среды

На кинетику химических превращений микроцистинов в природных условиях способны влиять следующие факторы:

- температура;
- pH;
- ионная сила;
- УФ-облучение;
- окислители;
- соединения железа.

Степень влияния каждого из них на скорость деградации четырех микроцистинов в воде установлена экспериментально. В таблице 3 обобщены количественные оценки.

Таблица 3 – Влияние природных кинетических факторов на стабильность микроцистинов LR, RR, LA и YR

№ п/п	Показатель	Коэффициент ускорения скорости гидролиза (F)			
		LR	RR	LA	YR
1	Температура:				
	10 °С	0,5	0,5	0,5	0,5
	20 °С	1,0	1,0	1,0	1,0
	30 °С	2,0	2,0	2,0	2,0
2	pH:				
	< 8 (5,5)	6,0	1,25	1,5	24
	> 8 (9,0)	1,8	2,2	1,2	1,7
3	Ионная сила ≤ 0,2	1,7	3,2	0,3	0,2
4	Дневной свет	2,9	2,5	1,1	1,0
5	УФ-свет	4,7	7,5	8,7	1,2
6	Присутствие кислорода:				
	в воде	555	160	80	20
	в воздухе	4	2,5	2,5	2
7	Присутствие в воде соединений железа:				
	в концентрации 1%	320	120	140	60
	в концентрации 2 x 10 <sup>-5</sup> %	5	2	2	1

##### 4.2.2.1 Измерения показателей окружающей среды

– Температуру воды в исследуемом водоеме и показатель рН определяют непосредственно с помощью лабораторного термометра и рН-метра.

– Оценку ионной силы производят на основании гравиметрического определения сухого остатка. Этот показатель играет существенную роль в прибрежных морских акваториях, когда концентрация растворенных солей составляет не менее 1 %.

– Световая и УФ-экспозиция устанавливаются в результате экспериментальных наблюдений или метеорологических сводок.

– Содержание кислорода в воде оценивают по справочным данным: при 20 °С и атмосферном давлении его растворимость в воде составляет 0,031 см<sup>3</sup>/мл [4], т.е. примерно 0,004 %.

– Присутствие соединений трехвалентного железа в пробах воды устанавливают с помощью одной из нижеописанных качественных реакций:

– Осаждением гидроксида железа при подщелачивании раствором гидроксида натрия [5];

– Получением красителя – берлинской лазури – при действии цианоферрата калия (желтой кровяной соли)  $K_4[Fe(CN)_6]$  в кислой среде [6].

Количественную оценку содержания ионов трехвалентного железа можно произвести методом атомно-адсорбционной спектроскопии или титрованием.

#### 4.2.3 Определение периода естественной очистки водоемов от токсинов цианобактерий – микроцистинов

Предлагаемый алгоритм расчета опирается на следующие исходные данные:

– Процесс деградации микроцистинов в воде описывается кинетикой псевдо-первого порядка.

– При расчетах в качестве базового параметра использовали период полупревращения, значения которого для исследуемых микроцистинов получены в модельных кинетических экспериментах.

– В соответствии с кинетическим уравнением 1 порядка максимальный теоретический срок полной очистки водоема при 20 °С не превышает шести периодов полупревращения микроцистина LR. Оценка произведена на том основании, что максимальная реальная концентрация токсина, которая наблюдалась в природе, составляет 50 мкг/л, а безопасный уровень – не более 1 мкг/л.

На рисунках 6 и 7 представлены графики, которые подтверждают обоснованность описанного подхода на примере микроцистина LR как модельного соединения, а в таблице 4 – кинетические параметры, полученные для идеальных условий (т.е. в деионизованной воде в темноте и под аргоном) с применением уравнения химической кинетики первого порядка и уравнения Аррениуса.

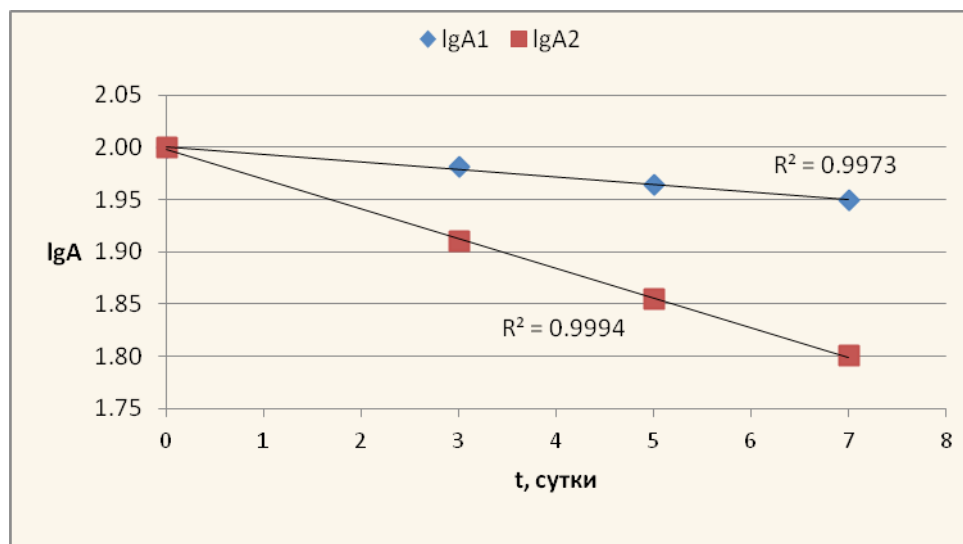


Рисунок 6 – Зависимость степени деградации (А) микроцистина LR от времени выдержки при температуре 40 °С (верхний график) и 60 °С (нижний график)

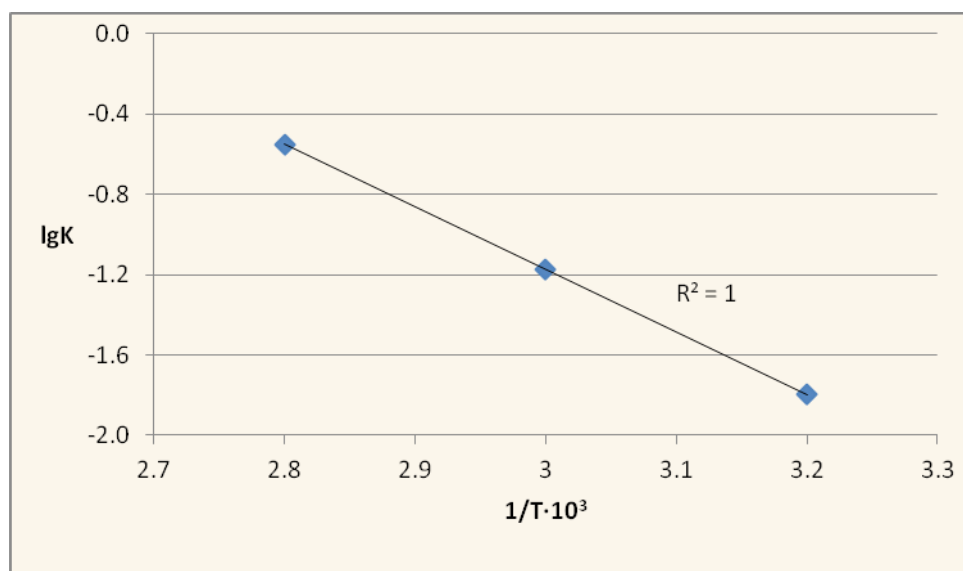


Рисунок 7 – Температурная зависимость константы скорости деградации микроцистина LR: график Аррениуса  $\log k = f(10^3 / T)$

Таблица 4 – Термодинамические и кинетические параметры гидролиза микроцистинов

№ п/п	Параметр	Формула расчета	Микроцистин			
			LR	RR	YR	LA
1	Константа скорости реакции ( $k$ , сут. <sup>-1</sup> ) при 20 °С	$k = 2,303 \cdot (2 - \lg C) / t$	0,001	0,002	0,010	0,007
2	Температурный коэффициент ( $Q_{10}$ )	$Q_{10} = k_{(T+10)} / k_T$	2	2	2	2
3	Период полудегradации при 20 °С ( $t_{1/2}$ , сутки)	$t_{1/2} = 0,693 / k$	693	346,5	69	99

где  $C$  – концентрация субстрата в процентах от исходной;

$t$  – время экспозиции;

$T$  – абсолютная температура.

На основании представленных данных и результатов количественного определения содержания микроцистинов в исследуемом водоеме можно рассчитать время ( $P$ ), необходимое для достижения безопасного уровня токсинов естественным путем, по формуле (2):

$$P = t_{1/2} \cdot N / F_1 \cdot F_2 \cdot F_3 \cdot F_4 \cdot F_5 \cdot F_6 \cdot F_7, \quad (2)$$

где  $t_{1/2}$  – период полудеградации микроцистина в модельных условиях (таблица 4);

$N$  – число периодов полудеградации микроцистина, необходимое для снижения его концентрации до величины 1 мкг/л и ниже;

$F_1 - F_7$  – коэффициенты ускорения скорости гидролиза микроцистина за счет природных кинетических факторов (таблица 3).

Число периодов полудеградации  $N$  устанавливается после измерения содержания токсинов в водоеме. В таблице 5 приведены результаты расчетов этого показателя для концентраций от 2 до 50 мкг/л.

Таблица 5 – Зависимость показателя  $N$  от концентрации микроцистинов

№ п/п	Концентрация микроцистина (мкг/л)	Число периодов полудеградации ( $N$ )
1	40-50	6
2	20-30	5
3	10	4
4	5	3
5	4	2
6	2	1

Если в пробе воды обнаружены несколько микроцистинов, то целесообразно производить оценки величины  $P$  для наиболее стабильного компонента.

В качестве примера приводится расчет времени  $P$  для микроцистина RR как наиболее распространенного производного в акваториях северного полушария при концентрации 10 мкг/л ( $N=4$ ) и следующих типичных условиях окружающей среды:

- температуре 20 °C ( $F_1 = 1$ );
- показателе pH < 8 ( $F_2 = 1,25$ );
- ионной силе  $\leq 0,2$  ( $F_3 = 3,2$ );
- равном числе пасмурных и солнечных дней ( $F_4 = 1/2 (2,5 + 7,5)=5$ );
- в присутствии кислорода воздуха ( $F_5=2,5$ ) и концентрации железа на уровне  $2 \times 10^{-5} \%$  ( $F_6=2$ ), соответствующей его содержанию в водопроводной воде.

Влияние других окислителей не учитывается.

$$P = 346,5 \cdot 4 / 1,25 \cdot 3,2 \cdot 5 \cdot 2,5 \cdot 2 = 13,86 \text{ суток}$$

## **5 Эффективность применения методических рекомендаций**

Эффективность практического использования настоящих методических рекомендаций зависит от оснащенности испытательных лабораторий современным оборудованием и квалификации персонала.

В тех случаях, когда концентрация токсинов неизвестна, можно ограничиться расчетом периода  $P$ , пользуясь коэффициентами  $F$  таблицы 3 и выбирая максимальный показатель  $N$ .

При малых значениях показателя  $P$  (1-2 недели) исключается необходимость дорогостоящих процедур детоксикации водоемов.

Ускорению очистки может способствовать внесение безопасных окислителей и соединений железа (например, перекиси водорода или минералов железа).



## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Schopf J. Walter M. The Biology of the Cyanobacteria. – Oxford: Blackwell, 1982. – P.543-564.
- 2 Castenholz R., Waterbury J. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. – Vol. 3. – Baltimore: Williams & Wilkins. – 1989. – P.1710-1728.
- 3 Codd G., Azevedo S., Bagechi S., Burch M., Carmichael W., Kaya K., Utkilen H. Cyanonet. A Global Network for Cyanobacterial Bloom and Toxin Risk Management – Initial Situation Assessment and Recommendations // Int. Hydrol. Program. VI. – 2005. – N.76. – P.138.
- 4 Химическая энциклопедия – 1990. – Т.2. – С.387.
- 5 Петерс Д., Хайес Дж., Хифтье Г. Химическое разделение и измерение. – Т.1. Москва: Мир, 1978.– С.243.
- 6 Файгель Ф., Ангер В. Капельный анализ неорганических веществ. – Т.1 – Москва: Мир, 1976.– С.246.

Министерство здравоохранения Российской Федерации  
Федеральное медико-биологическое агентство  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»

Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации

Группа 12. Требования к профилактике заболеваний, защите здоровья населения  
от повреждающих факторов, охране репродуктивного здоровья  
и оказанию медико-социальной помощи

**Прогнозирование периода естественной очистки природных водоемов  
от токсинов сине-зеленых водорослей**

Методические рекомендации

МР ФМБА России

Директор, д.м.н

Ученый секретарь, к.б.н.

Главный метролог



 М.Б.Иванов

 И.А. Шабунова


 И.В. Александрова

---

Исполнители:

Научный руководитель –  
заведующий лабораторией №10, к.х.н.

Ответственный исполнитель –  
научный сотрудник



И.К. Журкович



Н.В. Луговкина