

Министерство образования и науки Российской Федерации
Государственное образовательное учреждение высшего
профессионального образования

ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Р. Т. Тухватулин, Л. И. Инишева, М. В. Гостищева

**ФИЗИКОХИМИЯ И БИОЛОГИЯ ТОРФА.
ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ (ПО ИЗМЕНЕНИЮ
ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОБРАТИМОЙ АГРЕГАЦИИ
ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ)**

Методическое пособие

Томск 2011

УДК 615.31+616.15
ББК 24.73я73
Т 91

Печатается по решению
учебно-методического совета
Томского государственного
педагогического университета

Т 91 Тухватулин Р. Т. Физикохимия и биология торфа. Оценка биологической активности гуминовых кислот (по изменению показателей обратимой агрегации эритроцитов крови): методическое пособие / Р. Т. Тухватулин, Л. И. Инишева, М. В. Гостищева. – Томск: Томский ЦНТИ, 2011. – 20 с.

В настоящем методическом пособии приводится описание методики определения биологической активности торфов и сапропелей по изменению показателей обратимой агрегации эритроцитов (ОАЭ) при внесении исследуемого препарата *in vitro* в пробу цельной крови лабораторных животных. Регистрацию показателей ОАЭ осуществляется фотометрическим вибрационным методом. Расчетным путем определяется индекс агрегации – $Ja = Ud / t$, характеризующий соотношение агрегационных и дезагрегационных процессов. Объектами исследования являются экстракты торфов, сапропелей и других сырьевых источников.

Методическое пособие разработано для обеспечения дисциплины «Физикохимия и биология торфа» и предназначено для студентов биолого-химического факультета, но также может быть полезным для специалистов, работающих в области торфоведения, научных сотрудников, аспирантов, студентов других направлений.

Научный редактор: член-корр. РАСХН, д.с.-х.н., профессор Томского государственного педагогического университета Л. И. Инишева

Рецензент: д.б.н., профессор Красноярского государственного аграрного университета В. В. Чупрова

ISBN 978-5-89702-294-6

© Томский государственный педагогический университет
© Т. В. Дементьева, О. Ю. Богданова, Н. А. Шинкеева

Содержание

Введение.....	4
1. Назначение и область применения.....	4
2. Нормативные ссылки.....	4
3. Термины и определения.....	4
4. Принцип методики.....	5
5. Характеристика тест-системы и прибора.....	5
6. Количественная оценка параметров тест- реакции.....	6
7. Оборудование.....	8
8. Вспомогательные устройства и лабораторная посуда.....	9
9. Реактивы и материалы.....	10
10. Условия безопасного проведения работ.....	10
11. Требования к квалификации лиц, проводящих биотестирование.....	11
12. Условия выполнения измерений.....	11
13. Подготовка к проведению измерений.....	12
Подготовка посуды для отбора, хранения проб и биотестирования.....	12
Отбор, транспортировка, хранение и подготовка проб.....	12
Подготовка тест-системы и прибора.....	13
14. Процедура биотестирования.....	14
Определение степени биологической активности экстрактов торфов и сапропелей.....	14
Определение степени активности исследуемого образца.....	14
15. Обработка, оценка и оформление результатов.....	15
Обработка результатов измерений.....	15
Оценка достоверности различий результатов измерений.....	15
Оформление результатов измерений.....	15
16. Контроль погрешности методики оценки биологического активности.....	15
Приложение. Формы представления результатов анализа.....	17
Список литературы.....	18

Введение

1. Назначение и область применения

Настоящий документ устанавливает методику количественного определения степени биологической активности торфов и сапропелей с использованием в качестве тест-системы агрегатов эритроцитов крови лабораторных животных.

Объектами исследования являются экстракты торфов и сапропелей.

Результаты работ могут быть использованы в практике мониторинга биологической активности торфов и сапропелей государственными, коммерческими, общественными и другими организациями.

2. Нормативные ссылки

Закон Российской Федерации «Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан».

Закон Российской Федерации «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».

3. Термины и определения

Биотестирование	– проведение анализов по определению биологической активности с помощью живых организмов.
Обратимая агрегация эритроцитов (ОАЭ)	– способность эритроцитов (красных кровяных телец) спонтанно образовывать агрегаты типа монетных столбиков после их механического разрушения (деагрегации)
Степень биологической активности торфов и сапропелей	– изменение любого показателя жизнедеятельности или функций организма под воздействием экстрактов торфов и сапропелей
Тест-реакция	– изменение какого-либо биохимического, морфологического, поведенческого или другого функционального показателя на воздействие
Тест-система	– биологическая, химическая, физическая и информационная системы или их комбинации, используемые при проведении исследований

Тест-функция – жизненная функция, используемая в биотестировании для характеристики отклика тест-системы на воздействие

4. Принцип методики

Методика основана на определении изменений показателей обратимой агрегации эритроцитов по изменениям оптической плотности крови в присутствии экстрактов торфов и сапропелей в анализируемой пробе по сравнению с контрольными значениями в пробах, не содержащих экстрактов торфов и сапропелей.

Принцип действия прибора основан на свойстве крови изменять свою оптическую плотность в зависимости от степени агрегированности эритроцитов. При измерении интенсивности света, проходящего через исследуемую пробу крови, с одновременной регистрацией величины механической активности, разрушающего агрегаты эритроцитов, определяются показатели, характеризующие минимальную и максимальную механическую прочность агрегатов эритроцитов. При измерении прозрачности крови во время спонтанной агрегации определяются показатели, характеризующие скорость спонтанной агрегации эритроцитов и количество клеток, принимающих участие в процессе агрегации.

Критерием биологической активности экстрактов торфов и сапропелей являются изменения параметров ОАЭ в исследуемой пробе по сравнению с таковой для пробы, не содержащей экстрактов торфов и сапропелей (контролем). По степени отклонения параметров ОАЭ в исследуемой пробе от контрольных значений судят о степени активности экстрактов торфов и сапропелей.

5. Характеристика тест-системы и прибора

Биотестирование – проведение анализов по определению степени активности экстрактов торфов и сапропелей на изменение параметров тест-системы под воздействием экстрактов торфов и сапропелей или их смесей

Критерий активности – достоверное количественное изменение параметров тест-системы

Тест-система – агрегаты эритроцитов крови лабораторных животных - *in vitro* [1]

**Тест-реакция
(параметр)**

– изменение параметров тест-системы под воздействием экстрактов торфов и сапропелей или их смесей

Тест-функция

– процесс обратимой агрегации эритроцитов, используемый в биотестировании для характеристики отклика крови на воздействие экстрактов торфов и сапропелей

Забор крови для исследования производят стандартным способом [2, 3, 4]. Кровь смешивают с гепарином в пробирке в объемном соотношении 9:1 (концентрация гепарина 50 ЕД на 1 мл крови) в количестве достаточном для измерения не менее 20 проб. Для измерения 1 пробы необходимо 50 мкл крови. Содержание тест-системы при температуре + 1–2 °С (в холодильной камере и (или) на тающем льду), позволяет сохранить параметры ОАЭ в течение 6 часов.

«Стационарный световой анализатор параметров обратимой агрегации эритроцитов» ТКМА 94.1112.001 является измерительным прибором, предназначенным для оценки степени биологической активности экстрактов торфов и сапропелей с использованием агрегатов эритроцитов крови лабораторных животных в лабораторных условиях. Прибор в автоматическом режиме регистрирует с высокой достоверностью чрезвычайно малые количественные изменения значений четырех параметров ОАЭ, на основании анализа которых возможно оценить степень активности экстрактов торфов и сапропелей.

6. Количественная оценка параметров тест-реакции

Количественная оценка тест-реакции выражается в изменении параметров ОАЭ тест-системы под воздействием экстрактов торфов и сапропелей или их смесей.

На исследуемую пробу крови подаются нарастающие сдвиговые усилия. Величина локальных сдвиговых усилий, непосредственно разрушающих агрегаты, пропорциональна амплитуде колебаний стенки кюветы, которая, в свою очередь, пропорциональна величине напряжения питания вибратора, являющегося источником колебаний.

На рисунке 1 приведена схема, поясняющая принцип определения показателей ОАЭ по фотометрической кривой и зависимости напряжения питания вибратора от времени. В случае, когда эритроциты полностью агрегированы, оптическая плотность исследуемой

пробы крови минимальна и постоянна во времени (участок 0–1). При включении напряжения и начале вибрации увеличение оптической плотности крови происходит не сразу (участок 1–2), а начиная с некоторой величины – U_0 (точка –2).

Микроскопированием установлено, что увеличение оптической плотности обусловлено началом разрушения агрегатов и, следовательно, по величине U_0 можно судить об их минимальной механической прочности. Дальнейшее увеличение напряжения питания вибратора приводит к еще большему разрушению агрегатов и связанному с этим уменьшению прозрачности исследуемой пробы крови (участок 2–3). Величина напряжения U_d , начиная с которой дальнейшее возрастание разрушающих усилий не приводит к увеличению оптической плотности исследуемой пробы крови (точка 3), характеризует максимальную механическую прочность эритроцитарных агрегатов. Это обусловлено тем, что при U_d все агрегаты разрушены до отдельных эритроцитов, фотометрическая кривая при этом выходит на плато, соответствующее полной дезагрегации эритроцитов (участок 3–4). После прекращения разрушающих воздействий (точка 4) начинается процесс спонтанной агрегации эритроцитов (участок 4–5), который заканчивается полной их агрегацией. Фотометрическая кривая при этом выходит на плато (участок 5– 6).

Скорость спонтанной агрегации эритроцитов характеризуется величиной, обратной полупериоду агрегации эритроцитов – t . Величина полупериода агрегации определяется временем, в течение которого амплитуда фотометрического сигнала изменяется на 50 % [5]. За 100 % изменение амплитуды фотометрического сигнала принимается расхождение – A (мм) от плато на фотометрической кривой, соответствующее полной дезагрегации (участок 3–4), до плато, соответствующего полной агрегации эритроцитов (участок 5– 6).

На основании измеренных значений показателей ОАЭ расчетным путем определяют индекс агрегации – $I_a = U_d / t$, характеризующий соотношение агрегационных и дезагрегационных процессов и интегральный коэффициент агрегации – $K = U_0 U_d A / t$.

Количественную оценку биологической активности экстрактов торфов и сапропелей выражают в виде безразмерной величины – степени биологической активности (СБА) экстрактов торфов и сапропелей. $СБА = 100 (P_k - P_0)/P_k$, где соответственно P_k и P_0 – значения тест-параметра контроля и опыта при фиксированном времени экспозиции исследуемой пробы.

СБА определяют по изменению параметров ОАЭ за 10-ти минутный (в экспрессном варианте) период экспозиции.

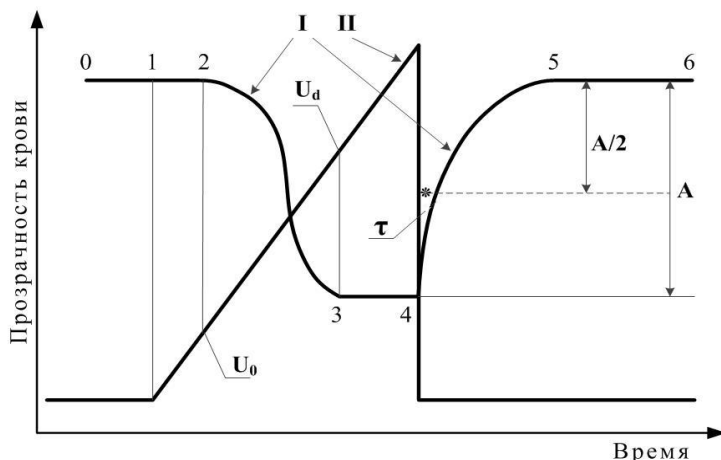


Рис. 1. Схема, поясняющая принцип определения показателей обратной агрегации эритроцитов. I – зависимость оптической прозрачности крови от времени в процессе дезагрегации и спонтанной агрегации эритроцитов; II – зависимость напряжения питания вибратора от времени.

7. Оборудование

Перечень необходимого оборудования для количественного определения биологической активности экстрактов торфов и сапропелей в лабораторных условиях представлен в таблице 1

Таблица 1.

Перечень необходимого оборудования для количественного определения биологической активности НЧ в лабораторных условиях

№	Оборудование	ТУ, ГОСТ
1	«Стационарный световой анализатор параметров обратной агрегации эритроцитов»	ТКМА 94.1112.001
2	Холодильник бытовой, обеспечивающий замораживание воды ($-18 \pm 1^\circ\text{C}$) и хранение проб ($+1 \pm 2^\circ\text{C}$).	

3	Часы сигнальные	ТУ 25-07-57 или аналоги
4	Весы лабораторные общего назначения	ГОСТ 24104 или аналоги
5	Шкаф сушильный	

8. Вспомогательные устройства и лабораторная посуда

Перечень необходимых вспомогательных устройств и лабораторной посуды для количественного определения биологической активности экстрактов торфов и сапропелей представлен в таблице 2.

Таблица 2.

Перечень необходимых вспомогательных устройств и лабораторной посуды для количественного определения биологической активности экстрактов торфов и сапропелей

№ п.п.	Оборудование	ТУ, ГОСТ	Количество
1	Пробирка типа Эппендорф коническая микроцентрифужная с крышкой на 1.5 мл. используется для всех видов лабораторных исследований как транспортно сохраняющая тара при отсроченных отборах проб		200
2	Штатив-бокс для пробирок типа Эппендорф 1.5 мл (72 гнезда)		1
3	Пипетка вместимостью 1.0 мл \pm 1.0% (1000 мкл)	ГОСТ 29227	1
4	Пипетка автоматическая дозатор любого типа объемом 0.02 мл \pm 1.0% (200 мкл)		1
5	Пипетка автоматическая дозатор любого типа объемом 0.002 мл \pm 1.0%; (20 мкл)		1
6	Бюксы с притертой пробкой для отбора и хранения проб и реактивов вместимостью 10, 50, 100мл		10
7	Стаканы стеклянные лабораторные вместимостью 10, 50 мл	ГОСТ 25336	
8	Шприц 5 мл		1

9	Ножницы		1
10	Катетер для инъекций 1 мм		1

9. Реактивы и материалы

Перечень необходимых реактивов и материалов для количественного определения биологической активности экстрактов торфов и саропеллей в лабораторных условиях представлен в таблице 3.

Таблица 3.

Перечень необходимых реактивов и материалов для количественного определения биологического активности

№ п.п.	Реактивы и материалы	ТУ, ГОСТ
1	Вода дистиллированная	ГОСТ 6709
2	Щелочь (натрия гидроокись)	ГОСТ 4328
3	Спирт этиловый	ТУ 6-091710
4	Кислота серная	ГОСТ4204
5	Калий двухромовоокислый ($K_2Cr_2O_7$) [6, 7]	ГОСТ 4220-75
6	Сода пищевая	
7	Гепарина раствор для инъекций (амп. 5т ЕД/мл 5мл № 1)	
8	Физиологический раствор для теплокровных животных	
9	Бумажные фильтры обеззоленные типа ФОБ	ТУ 6-09-1678
10	Бумага индикаторная универсальная для измерения рН	
11	Водная дисперсная система исследуемого объекта	
12	Лабораторные животные (мыши, крысы)	

10. Условия безопасного проведения работ

1. При работе с химическими веществами необходимо соблюдать требования техники безопасности по ГОСТ 12.4.021.
2. Рабочие столы и поверхности должны содержаться в чистоте. В конце дня проводится влажная уборка рабочих поверхностей.
3. Безопасность при работе с электроустановками обеспечивается по ГОСТ 12.1.019 и в соответствии с требованиями инструк-

- ций к оборудованию.
4. Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.
 5. Используемая в качестве тест - системы кровь лабораторных животных не патогенна, однако после каждого анализа необходимо промыть всю использованную посуду, ополоснув дистиллированной водой.
 6. Хранить тест-систему в холодильнике при температуре от +2 до +4° С (следует беречь тест-систему от замораживания, нагревания и резкой смены температуры).

11. Требования к квалификации лиц, проводящих биотестирование

Определение степени биологической активности экстрактов торфов и сапропелей по настоящей методике выполняется оператором с квалификацией лаборант, имеющим опыт работы с лабораторными животными.

Настоящий документ устанавливает методику количественного определения биологической активности экстрактов торфов и сапропелей с использованием в качестве тест-системы агрегатов эритроцитов крови лабораторных животных.

Содержание лабораторных животных осуществляется в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных. Животные содержатся на стандартном лабораторном рационе в условиях свободного доступа к пище и воде. Все манипуляции с животными осуществляются в осенне-зимний период, в первой половине дня. Экспериментальные исследования проведены в соответствии с правилами лабораторной практики (GLP), Приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г «Об утверждении правил лабораторной практики», Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (2005 г).

12. Условия выполнения измерений

В лабораторных условиях биотестирование проводят в соответствии с требованиями по эксплуатации прибора «Стационарный световой анализатор параметров обратимой агрегации эритроцитов» ТКМА 94.1112.001 и с ГОСТ 15150. Помещение не должно со-

держат токсичных паров и газов. Температура окружающего воздуха в лаборатории от 18 до 25°C. Относительная влажность воздуха 80±5%. Атмосферное давление 84–106 кПа (630–800 мм рт. ст.). При использовании электроприборов частота переменного тока 50±1 Гц. Напряжение сети 220±10 В. Освещение помещения естественное или искусственное, не ограничивается особыми требованиями.

13. 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 доставленных в лабораторию проб и определения степени их биологической активности. Все процедуры предварительной подготовки должны исключить попадание токсичных, органических и каких-либо других веществ в исследуемую пробу.

Подготовка посуды для отбора, хранения проб и биотестирования

Обычно используют посуду из стекла, либо одноразовые пробирки типа Эппендорф. Посуда для отбора проб и биотестирования должна быть химически чистой. Стенки посуды осторожно смачивают хромовой смесью (смесью бихромата калия и серной кислоты), через 2–3 часа тщательно промывают водой, нейтрализуют раствором пищевой соды и промывают 3–4 раза дистиллированной водой. Для мытья посуды не допустимо использование синтетических поверхностно-активных веществ и органических растворителей. Посуду 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.

Отбор, транспортировка, хранение и подготовка проб

а) Для исследования берутся репрезентативные торф и сапрпель.

Гуминовые кислоты (ГК) выделяются 0.1 н раствором NaOH и нейтральным 0.1 М раствором $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (далее соответственно ще-

лочные и пирофосфатные вытяжки ГК). Для щелочных и пирофосфатных вытяжек ГК контролем служит соответственно 0.1 н раствор NaOH и 0.1 М раствор $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$

Все последующие этапы оценки биологической активности экстрактов торфов и сапропелей желательнее проводить в максимально сжатые сроки.

б) До проведения тестирования экстракт нагревают до температуры $20 \pm 2^\circ \text{C}$. После чего отбирают определенный объем жидкости и проводят анализ.

с) Аналогичную процедуру проводят с жидкостью, которую используют в качестве контрольного раствора.

Подготовка тест-системы и прибора

а) Подготовка тест-системы. Забор крови для исследования производят стандартным способом [2, 3, 4]. Кровь смешивают с гепарином в пробирке в соотношении 9:1 (концентрация гепарина 50 ед. на 1 мл крови) в количестве достаточном для измерения не менее 20 проб. Для измерения 1 пробы необходимо 50 мкл крови. Содержание крови при температуре $+1 - 2^\circ \text{C}$ (в холодильной камере и (или) на тающем льду), позволяет сохранить параметры ОАЭ в течение 6 часов. Перед использованием кровь в пробирке оксигенируют путем перемешивания её стеклянной палочкой.

б) Способы и пути введения исследуемого и контрольного образца.

Исследуемый образец. Экстракт с исследуемым объектом смешивают в чистой пластиковой пробирке стеклянной палочкой с пробой крови. Время с момента смешивания крови с экстрактом до начала измерений параметров ОАЭ составляет 10 минут. Выбор времени определялся минимальным временем, позволяющим проводить измерения без технических задержек.

Контрольный образец. В качестве контроля используют кровь того же животного, к которой добавляют контрольную жидкость. Время с момента смешивания до начала измерений параметров ОАЭ составляет 10 минут.

с) Подготовка прибора. Подготовку приборов «Световой анализатор параметров обратимой агрегации эритроцитов» проводят в соответствии с руководством по эксплуатации.

14. Процедура биотестирования

Определение степени биологической активности экстрактов торфов и сапропелей

При определении степени биологической активности экстрактов торфов и сапропелей необходимо проводить параллельное измерение контрольных и опытных проб. Рекомендуется иметь не менее 10 (десяти) повторностей измерений каждой серии. Для получения большей достоверности результатов измерений число повторностей может быть увеличено. Последовательно измеряют не менее 10 (десяти) пар контроль – опыт.

В стандартном анализе отбирают в пробирку типа Эппендорф 45.0 микролитров стабилизированной гепарином крови лабораторных животных, добавляют исследуемый объект – экстракт торфов и сапропелей в количестве 5.0 микролитров. Смесь перемешивают стеклянной палочкой и через 10 минут измеряют значения параметров ОАЭ в **опытной** пробе.

Измерение значений параметров ОАЭ проводят согласно руководству по эксплуатации прибора. В стандартном варианте через 10 минут экспозиции при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$. При необходимости допустимо проведение анализа через другой интервал времени.

В стандартном анализе измерение значений параметров ОАЭ в **контрольной** пробе проводят аналогично с тем отличием, что вместо экстракта торфов и сапропелей добавляют **контрольную жидкость**.

Определение степени активности исследуемого образца

Степень биологической активности (СБА) экстрактов торфов и сапропелей оценивают по изменению показателей ОАЭ под воздействием экстрактов торфов и сапропелей в контрольной и опытной пробах. Показатель СБА исследуемого объекта вычисляют в виде безразмерной величины:

$$\text{СБА} = 100 (P_k - P_o) / P_k,$$

где соответственно P_k и P_o – усредненные значения тест-параметров контроля и опыта при фиксированном времени экспозиции исследуемых проб.

При отсутствии достоверных различий регистрируемых параметров ОАЭ в опыте и контроле вычисление СБА не производится.

15. Обработка, оценка и оформление результатов

Обработка результатов измерений. Обработку результатов измерений параметров ОАЭ производят путем расчета среднеарифметического значения величины соответствующего показателя по формуле:

$$P_n = (P_1 + P_2 + \dots + P_n) / n,$$

где $P_1 + P_2 + \dots + P_n$ – повторности проб,

P_n – значение соответствующего тест-параметра

n – количество повторностей.

Величины $P_1 + P_2 + \dots + P_n$ получают не менее чем из 10 параллельных измерений ($n \geq 10$) контроль-опыта в короткий промежуток времени.

Оценка достоверности различий результатов измерений.

Оценка достоверных различий результатов измерений регистрируемых показателей ОАЭ в контроле и опыте осуществляют по непараметрическому критерию Манна-Уитни [11]. С целью нивелирования индивидуальных различий исследуемых показателей, показатели, измеренные в контроле, принимают за 1.

Оформление результатов измерений. Результат определения степени биологического активности исследуемого образца представляют в виде протокола (Приложение).

16. Контроль погрешности методики оценки биологического активности

Контроль качества оценки биологического активности

проводят по определению чувствительности тест-реакции (параметров обратимой агрегации эритроцитов) к модельному «эталонному» токсиканту. Установление метрологических характеристик погрешности методики биотестирования в лабораторных условиях производится в соответствии с [6].

Регулярно проводимая проверка позволяет выявить ошибки при приготовлении исследуемых смесей и растворов, нарушения, допускаемые в условиях проведения опытов.

Процедура оценки погрешности методики. Исследования проводят с использованием двухромовокислого калия $K_2Cr_2O_7$ в качестве стандартного токсиканта. С этой целью на дистиллированной воде готовят маточный раствор $K_2Cr_2O_7$ в концентрации 1 ± 0.01 мг/см³. Навеску 0.1 г $K_2Cr_2O_7$ помещают в мерную колбу на 100 см³ и

растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, тщательно перемешивают и доводят до метки. Затем готовят рабочий раствор модельного токсиканта 0.1 ± 0.002 мг/см³ разведением дистиллированной водой основного раствора в 10 раз.

Измерения в стандартных и контрольных пробах. В стандартном анализе отбирают в пробирку типа Эппендорф 45.0 микролитров стабилизированной гепарином крови лабораторных животных, добавляют исследуемый объект – рабочий раствор модельного токсиканта в количестве 5.0 микролитров. Смесь перемешивают стеклянной палочкой и через 10 минут измеряют значения показателей ОАЭ в опытной пробе. Измерение значений параметров ОАЭ в **контрольной** пробе проводят аналогично п. 14.

Критерии достоверности. Должно происходить **достоверное** изменение хотя бы одного из регистрируемых показателей ОАЭ по сравнению с контролем. В случае если **достоверных** изменений регистрируемых параметров ОАЭ по сравнению с контролем не наблюдается, то следует проверить точность приготовления исследуемых растворов или условий проведения опытов.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Формы представления результатов анализа

Определение степени биологической активности экстрактов торфов и сапропелей с использованием агрегатов эритроцитов крови лабораторных животных оформляется в виде таблиц 3 и 4.

Таблица 3.

Протокол № определения степени биологической активности экстрактов торфов и сапропелей с использованием агрегатов эритроцитов крови лабораторных животных

№ п.п.	Параметр	Значение
1	Наименование организации	
2	Наименование пробы и место отбора	
3	Метеорологические условия (температура и влажность воздуха, направление и сила ветра, атмосферное давление)	
4	Дата, время отбора пробы	
5	Условия отбора и транспортировки пробы	
6	Дата измерения проб	
7	Число повторностей измерения проб	
8	Условия проведения анализа	
9	Результаты биотестирования: (см. таблица 4)	
10	Усредненный индекс биологической активности	
11	Погрешность измерения:	
12	Оператор, Ф.И.О.	

Таблица 4.

Результаты измерений показателей ОАЭ

№ п.п.	Наблюдение	U ₀ (B)	U _d (B)	A (мм)	τ(сек)	I _a	K
1							
2							
3							
...							
n							

U_0 (В) – минимальная прочность агрегатов эритроцитов,
 U_d (В) – максимальная прочность агрегатов эритроцитов,
 A (мм) - амплитуда фотометрического сигнала,
 t (сек) – полупериод фотометрического сигнала,
 $I_a = U_d / t$ – индекс агрегации,
 $K = U_0 U_d A / t$ – интегральный коэффициент агрегации.

Список литературы

1. <http://vodovedy.ru/Test.doc>
2. Кост Е. А. Справочник по лабораторным методам исследования. – М.: Медицина, 1975. – 384 с.
3. Меньшиков В. В. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / Меньшиков В. В., Делекторская Л. Н., Золотницкая [и др.]; под ред. В. В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
4. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии: справочное издание / И.П. Кондрахин, Н.В. Курилов, А.Г Малахов [и др.]. – М.: Агропромиздат, 1985. – 287 с.
5. Левтов В. А., Регирер С.А., Шадрина Н.Х. Реология крови. – М.:1982. – С. 105–112.
6. Сидоренко Е. Методы математической обработки в психологии. – СПб.: Речь, 2004. – 350 с.

Р. Т. Тухватулин, Л. И. Инишева, М. В. Гостищева

**ФИЗИКОХИМИЯ И БИОЛОГИЯ ТОРФА.
ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ (ПО ИЗМЕНЕНИЮ
ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОБРАТИМОЙ АГРЕГАЦИИ
ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ)**

Методическое пособие

Издательство Томского ЦНТИ. Лиц. ИД № 05060 от 14.06.2001 г.
Отпечатано в Томском ЦНТИ. Лиц. ПД № 12-0084 от 16.04.2001 г.
Подписано в печать 30.05.2011 г. Заказ № 552. Тираж 100 экз.
Россия, 634021, г. Томск, пр. Фрунзе, 115/3.