Методика выполнения измерений

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ВЫСОКОМИНЕРАЛИЗОВАННЫХ ПОВЕРХНОСТНЫХ И СТОЧНЫХ ВОД, ПОЧВ И ОТХОДОВ ПО ВЫЖИВАЕМОСТИ СОЛОНОВАТОВОДНЫХ РАЧКОВ *ARTEMIA SALINA* L.

ФР 1.39.2006.02505

Методика допущена для целей государственного экологического контроля

ПНД Ф Т 14.1:2.14-06
16.1:3.11-06

Москва 2009 г.

Методика разработана в лаборатории экотоксикологического анализа почв (ЛЭТАП, ф-т почвоведения МГУ), лаборатории водной токсикологии (биологический ф-т МГУ), МГУ им. М.В. Ломоносова и АНО ЭКОТЕРРА (г. Москва).

В.А. Терехова, Е.Ф.Исакова, Т.А. Самойлова, И.З. Ибатуллина Методика определения токсичности высокоминерализованных поверхностных и сточных вод, почв и отходов по выживаемости солоноватоводных рачков *Artemia salina* L. (2 редакция). М.: МГУ. 2009. 28 с.

Право тиражирования и реализации принадлежит разработчикам.

Адреса для контакта: 119992, г. Москва, Ленинские горы,
МГУ им. Ломоносова,
Биолого-почвенный корпус,
ф-т почвоведения, комн.598-Г, тел/факс (495) 939 2863
или биологический ф-т, комн. 207, тел. (495) 939 4369

e-mail: *letap-msu@mail.ru*
biotest-msu@mail.ru
aquatox-msu@mail.ru

Методика рассмотрена и одобрена «Федеральным Центром анализа и оценки техногенного воздействия» Ростехнадзора (ФГУ «ФЦАО»)

СОДЕРЖАНИЕ

		стр.
1	НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДИКИ	4
2	ПРИНЦИП МЕТОДИКИ	4
3	МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	4
4	СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ	5
5	УСЛОВИЯ БЕЗОПАСНОГО ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТ	6
6	ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ЛИЦ, ПРОВОДЯЩИХ БИОТЕСТИРОВАНИЕ	6
7	УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ	6
8	ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА	6
	8.1 Подготовка посуды для отбора, хранения проб и биотестирования	6
	8.2 Подготовка культивационной воды	7
	8.3 Получение исходного материала, содержание, питание артемий, выращивание культуры	7
	8.4 Отбор, транспортировка, хранение и подготовка проб	8
	8.4.1 Отбор, транспортировка, хранение и подготовка проб воды	8
	8.4.2 Отбор, транспортировка, хранение и подготовка проб почвы	11
	8.4.3 Отбор, транспортировка, хранение и подготовка проб осадков сточных вод, отходов	13
9	ПРОЦЕДУРА БИОТЕСТИРОВАНИЯ	19
10	ОБРАБОТКА, ОЦЕНКА И ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	19
11	КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДИКИ В ЛАБОРАТОРИИ	20
	ПРИЛОЖЕНИЯ	21
	Приложение А *(рекомендуемое)* Форма протокола регистрации результатов	22
	Приложение Б *(рекомендуемое)* Форма акта отбора проб	22
	Приложение В *(справочное)* Свидетельство о метрологической аттестации МВИ	23
	Приложение Г (*справочное*) Характеристика рачков *Artemia salina* L	25
	Приложение Д (*справочное*) Перечень методик биотестирования с кодами регистрации в Федеральном реестре МВИ	26

1. НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДИКИ

Настоящий документ устанавливает методику определения острой токсичности высокоминерализованных водных вытяжек из почв и отходов, поверхностных и сточных вод, по реакции солоноватоводных рачков *Artemia salina* L. с уровнем солености от 6 ‰ и выше.

2. ПРИНЦИП МЕТОДИКИ

Методика основана на определении смертности жаброногих рачков артемий (*Artemia salina* L.) при воздействии токсических веществ, присутствующих в исследуемой водной среде с повышенным содержанием солей, по сравнению с контрольной культурой в пробах, не содержащих токсических веществ.

Острое токсическое действие исследуемой пробы на артемий определяют по их смертности (летальности) за определенный период экспозиции. Критерием острой токсичности служит гибель 50% и более особей артемий за 48 часов экспозиции в исследуемой пробе, при условии, что в контроле гибель не превышает 10 %.

При определении острой токсичности устанавливают:

- среднюю летальную концентрацию отдельных веществ (кратность разбавления пробы), вызывающую гибель 50% тест-организмов за 48 часовую экспозицию;
- безвредную (не вызывающую эффекта острой токсичности) концентрацию отдельных веществ (кратность разбавления пробы), вызывающую гибель не более 10% за 48 часовую экспозицию.

3. МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

При соблюдении всех регламентированных условий и проведении анализа в точном соответствии с данной методикой значение погрешности (и ее составляющих) результатов измерений не превышает значений, приведенных в таблице 1.

Таблица 1

Наименование объекта	Диапазон измерений относительного количества погибших рачков *Artemia salina* L., %	Показатель точности (границы относительной погрешности) ±δ, % при P=0,95	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R, %
Высокоминерализованные отходы, осадки сточных вод	От 0 до 100 вкл.	80	35	40
Высокоминерализованные почвы		45	15	22
Высокоминерализованные сточные воды		40	16	20
Высокоминерализованные воды природные		30	13	15

4. СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ВСПОМОГАТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАКТИВЫ И МАТЕРИАЛЫ

4.1 Средства измерений и вспомогательное оборудование

4.1.1 Весы лабораторные с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104-2001;

4.1.2 pH-метр по ГОСТ 29270-95

4.1.3 Термометр лабораторный для точных измерений температуры по ГОСТ 29224-91, цена наименьшего деления шкалы – (0,1) °С;

4.1.4 Оксиметр с погрешностью измерения не более 0,5 мг/дм^3;

4.1.5 Прибор для измерения солености воды любого типа;

4.1.6 Посуда мерная лабораторная стеклянная вместимостью (1; 10; 100) см^3 по ГОСТ 1770-74;

4.1.7 Пипетки градуированные вместимостью (0,1; 1.0, 2,0 и 5,0) см^3, 2-го класса точности по ГОСТ 29227-91;

4.1.8 Цилиндры мерные вместимостью (0,1; 0,5; 1,0; 10; 50; 100; 500; 1000) см^3 по ГОСТ 1770-74;

4.1.9 Пробирки стеклянные вместимостью (10 – 50) см^3 по ГОСТ 25336-82;

4.1.10 Пипетки автоматические дозаторы объемом (0,1 - 0,2) см^3, (±1,0)%, например, Univolume pipeettes FH-10 № 9.051.0100;

4.1.11 Микроскоп стереоскопический биологический универсальный типа МБС-1, МБС-2, увеличение (3,3 - 88)× по ТУ 3-3-1210-75;

4.1.12 Цисты (яйца) жаброногих рачков артемий с высоким процентом выклева (60-100%) (Временные методические рекомендации по установлению эколого-рыбохозяйственных нормативов загрязняющих веществ для морских вод. М., изд-во ВНИРО,1999, с. 32-35)

4.1.13 Лампы дневного света;

4.1.14 Аквариумный микрокомпрессор АЭН по ТУ 16-064-011;

4.1.15 Холодильник, поддерживающий температуру (4 ± 2)°С;

4.1.16 Сушильный электрический шкаф общелабораторного назначения по ТУ 34-021-113117779-98

4.1.17 Термостат суховоздушный электрический ТС 80 МУ 4.2 по ТУ 64-1-1382-76Е;

4.1.18 Стаканы химические вместимостью 50, 100, 500 см^3 по ГОСТ 25336-82;

4.1.19 Люминостат, метод измерения освещенности по ГОСТ 24940-96

4.1.20 Воронка Бюхнера диаметром (15 - 20) см по ГОСТ 9147-80;

4.1.21 Насос вакуумный водяной или электрический по ГОСТ 26099-84;

4.1.22 Механическая или магнитная мешалка по ТУ РБ 4000.2024.008-2002;

4.1.23 Чашки Петри по ГОСТ 25336-82.

4.1.24 Бакпечатки однократного применения по ТУ 64-2-279-79

4.2 Реактивы и материалы

4.2.1 Натрий хлористый, квалификации «х.ч» по ГОСТ 4233-77;

4.2.2 Гидроксид натрия, квалификации «х.ч» по ГОСТ 4328-77 (Диаэм);

4.2.3 Кислота соляная, квалификации «х.ч» по ГОСТ 3118-74 (Диаэм);

4.2.4 Калий двухромовокислый, квалификации «х.ч» по ТУ 2642-001-49415344-99 или ГОСТ 4220-75 (Диаэм);

4.2.5 Кислота азотная, квалификации «х.ч» по ГОСТ 4461-77;

4.2.6 Дистиллированная вода по ГОСТ 6709-72;

4.2.7 Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026-76;

Примечание – Допускается применение других средств измерений, вспомогательного оборудования, реактивов и материалов с метрологическими и техническими характеристиками не хуже приведенных выше.

5. УСЛОВИЯ БЕЗОПАСНОГО ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТ

5.1 При проведении работ с химическими реактивами, сточными водами, их осадками и почвами соблюдают требования техники безопасности по ГОСТ 12.4.021-75.

5.2 Организация обучения работающих безопасности труда по ГОСТ 12.0.004-90.

5.3 Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности труда по ГОСТ 12.1.004-91 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009-83.

5.4 Работу проводят в спецодежде, используют резиновые перчатки, тщательно убирают рабочее место, дезинфицируют руки спиртом после работы.

5.5 После каждого анализа стерилизуют всю используемую посуду в сушильном шкафу при температуре 105^0С в течение 1 часа.

5.6 Безопасность при работе с электроустановками обеспечивают по ГОСТ 12.1.019-79 и в соответствии с требованиями инструкций к оборудованию.

6. ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ЛИЦ, ПРОВОДЯЩИХ БИОТЕСТИРОВАНИЕ

К проведению анализов по настоящей методике допускают лиц с квалификацией лаборант, освоивших методические приемы в области водной токсикологии и биотестирования.

7. УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

7.1 Анализ производят в нормальных лабораторных условиях в соответствии ГОСТ 15150-69. Помещение не должно содержать токсичных паров и газов.

7.2 Температура окружающего воздуха в лаборатории от $(+18)^0$С до $(+25)^0$С, в термостате для биотестирования $(23 \pm 2)^0$С.

7.3 Относительная влажность воздуха не более 80%.

7.4 Атмосферное давление (84 – 106) кПа; (630 – 800) мм рт. ст.

7.5 Освещение помещения естественное или искусственное, не ограниченное особыми требованиями.

7.6 При использовании электроприборов частота переменного тока (50±1) Гц. Напряжение в сети $(220\,^{+22}_{-33})$ В.

8. ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА

Предварительно подготавливают к отбору проб и выполнению анализа посуду, пробоотборники, места хранения проб, а также подготавливают рабочее место для обработки доставленных в лабораторию проб и их анализа. Все процедуры предварительной подготовки должны исключать попадание токсичных или каких-либо иных веществ в исследуемую воду.

8.1 Подготовка посуды для отбора, хранения проб и биотестирования

Обычно используют разовую посуду из пластика, а при наличии в воде нефтепродуктов, моющих средств и пестицидов используют банки из темного стекла.

Посуда для отбора проб и биотестирования должна быть химически чистой. Стеклянную посуду промывают 10%-ной азотной кислотой. Стенки посуды осторожно смачивают азотной кислотой, после чего на (2 – 3) часа посуду оставляют, затем тщательно промывают водопроводной водой, нейтрализуют раствором пищевой соды и промывают 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 160 ^{0}С в течение 1 часа.

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

Всю грязную посуду после проведения анализов подвергают стерилизации кипячением в течение 1 часа.

8.2 Подготовка культивационной воды

Культивационную воду используют для культивирования артемий, в качестве контрольной при биотестировании, для разбавления исследуемых вод. Культивационная вода готовится из отстоянной водопроводной воды с добавлением NaCl до необходимой солености.

Для подготовки культивационной воды водопроводную воду отстаивают в течение (3 – 7) суток (до полного дехлорирования) в бутыли из бесцветного стекла (или аквариуме) с аэрацией.

При отсутствии питьевой воды удовлетворительного качества допускают использование поверхностной пресной воды, отобранной вне зоны влияния источников загрязнения и профильтрованной через фильтр с размером пор 3,5 мкм.

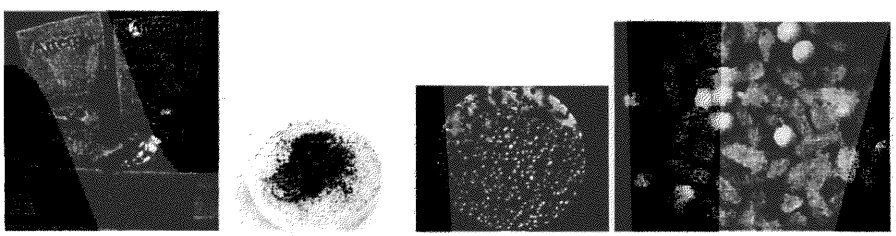
Культивационная вода удовлетворяет следующим требованиям:

- отсутствие органических загрязняющих веществ, хлора, токсических веществ и антагонистических для артемий организмов;
- pH – (8,0 - 8,5);
- жесткость общая от 60 мг/дм^3 до 200 мг/дм^3 (выраженная в $CaCO_3$);
- массовая концентрация растворенного кислорода - не менее 6 мг O_2/дм^3;
- температура (+23 ± 2) °С;

8.3 Получение исходного материала, выращивание культуры, содержание, кормление

Исходным материалом для биотестирования служат науплии в возрасте до 24 часов, полученные в лаборатории из покоящихся яиц. Науплии артемий легко получают в очень широком диапазоне солености из яиц (цист), которые могут храниться продолжительное время.

Сухие яйца артемий (рис.1) приобретают в зоомагазинах, в специализированных на рыбоводстве или аквариумистике фирмах, а также в других лабораториях, занимающихся биотестированием, имеющих культуру требуемой видовой принадлежности, чувствительность которой соответствует диапазону по пункту 3, а измеряемые с помощью этой культуры тест-параметры соответствуют метрологическим характеристикам (пункт3).



а б в с

Рис. 1 - Упаковки цист (а), сухие цисты (б), цисты при увеличении в 8 раз (в), науплии артемий при увеличении в 32 раза (с).

Сухие яйца артемий заливают отстоянной водопроводной водой с необходимой концентрацией соли NaCl (1 – 3) г яиц на 500 см^3 воды). Через 30 минут сливают слой воды над осевшими яйцами, при этом удаляют всплывшие нежизнеспособные яйца и пустые оболочки

яиц. Очистку повторяют несколько раз. Затем яйца несколько раз промывают культивационной водой (необходимой солености). Промытые яйца помещают в стакан с культивационной водой в термолюминостат для выклева. При температуре (23±2)°С науплии появляются через (24 – 36) часов.

Рост, развитие и размножение. В благоприятных условиях выклев науплиев артемий из яиц происходит через (1 – 2) суток. В первые дни жизни науплии находятся на эндогенном питании. В возрасте (3 – 4) суток (метанауплис III) науплиусы переходят на активное питание и совершают первую линьку. В зависимости от температурных условий артемии достигают половозрелости через (3 – 4) недели после выклева из яиц.

В природных условиях у артемий наблюдается как половое размножение, так и партеногенез. Партеногенетические яйца развиваются сразу после созревания, оплодотворенные яйца могут довольно долго сохраняться в покоящемся состоянии, постэмбриональное развитие со сложным метаморфозом (Определитель пресноводных беспозвоночных..., 1995).

Питание. Артемии являются фильтраторами. Взрослым особям пищей служат мелкие планктонные организмы (одноклеточные водоросли, бактерии) и частицы детрита.

В связи с эндогенным питанием науплиусы артемий не нуждаются в подкормке в течение четырех суток после выклева (Временные методические рекомендации...,1999). Таким образом, при выявлении острой токсичности при 48 часовой экспозиции кормить науплиусы не надо.

8.4 Отбор, транспортировка, хранение и подготовка проб

8.4.1 Отбор, транспортировка, хранение и подготовка проб воды

Объем пробы воды для определения острого токсического действия составляет 500 $см^3$. Отбираемый объем должен быть в два раза больше требуемого для хранения дубликата пробы до конца биотестирования.

Методы отбора, транспортировки, хранения, подготовки к выполнению биотестирования обеспечивают неизменность состава проб в интервале времени между отбором проб и их анализом.

Общие процедуры отбора проб определены в ГОСТ Р 51592-2000 "Вода. Общие требования к отбору проб".

Отбор проб, транспортировку и хранение грунтовых вод осуществляют в соответствии с СТ СЭВ 4710-84 "Воды подземные. Общие требования к отбору проб".

Отбор проб в поверхностных проточных и непроточных водоемах осуществляют в соответствии с ГОСТ 17.1.5.05-85 "Охрана природы. Гидросфера. Общие требования к отбору проб поверхностных и морских вод, льда и атмосферных осадков".

Для пробоотбора используют устройства в соответствии с требованиями ГОСТ 17.1.5.04-81 "Охрана природы. Гидросфера. Приборы и устройства для отбора, первичной обработки и хранения проб природных вод. Общие технические условия".

Пробы отбирают вручную специальными приспособлениями или с применением автоматических пробоотборников, при этом емкости для проб должны быть изготовлены из нетоксичного материала, легко вымываться из пробоотборника для очистки и мытья.

Для отбора глубинных проб воды из соленоводных объектов используют батометры системы Молчанова, Рутнера или Скадовского-Зернова.

Для отбора проб с глубины 0,5 м и более используют бутыль с привязанной пробкой, которую помещают в футляр, или пробоотборник с грузом. Футляр снабжен петлей, к которой привязывают веревку с размеченными отрезками, указывающими глубину погружения. На требуемой глубине с помощью привязанной к пробке веревки выдергивают пробку из горла бутыли. После заполнения бутыли водой (на поверхности воды не появляются пузырьки воздуха) ее поднимают на поверхность.

Отбор сточных вод осуществляют в соответствии с требованиями ПНД Ф 12.15.1-08 «Методические указания по отбору проб для анализа сточных вод».

Отбор природных и сточных вод производят в местах наибольшего перемешивания. Сточные воды отбирают на средней глубине потока, где твердые частицы равномерно распределены.

При взятии проб измеряют температуру воды. Для этого используют термометры с ценой деления (0,5)°С. Для определения температуры на месте взятия пробы, 1 $дм^3$ воды наливают в склянку, нижнюю часть термометра погружают в воду и через 5 мин отсчитывают показания, держа его вместе со склянкой на уровне глаз. Точность определения (±0,5) °С.

Пробы, предназначенные для исследования на токсичность, не консервируют.

Отобранные пробы наливают, предварительно дважды ополаскивая отбираемой водой, в банки или флаконы, заполняя их до краев и закрыв без пузырьков воздуха пришлифованными стеклянными пробками или полиэтиленовыми крышками. Под полиэтиленовые крышки подкладывают стерильные тефлоновые прокладки или прокладки из алюминиевой фольги. Пробы упаковывают в деревянные ящики для переноски проб и прокладывают бумагой или ветошью. Для лучшей сохранности в жаркую погоду пробы транспортируют в контейнерах-холодильниках при температуре от (+4) °С до (+10) °С. В холодный период года контейнеры снабжают термоизолирующими прокладками, обеспечивающими предохранение проб от промерзания. При транспортировке пробы предохраняют от света.

При отборе пробы составляют протокол по утвержденной форме (Приложение А), в котором указывают цель пробоотбора, число, время, место отбора пробы, температуру воды (или результаты других произведенных измерений), номер пробы, ставят подпись и расшифровывают подпись отбиравшего пробы. На бутыль наклеивают этикетку с указанием номера пробы, места, даты и времени ее отбора.

При отборе проб соблюдают технику безопасности. На крупных водотоках и водоемах соблюдают навигационные правила и правила эксплуатации используемого судна. Постоянные точки контроля выбирают в местах, которые были бы доступны в любое время года и где отсутствуют какие-либо природные опасности. На очистных сооружениях отбор проб осуществляют в специально предназначенных местах, маркированных и освещаемых в темное время суток. Отбор проб воды производит бригада, состоящая минимум из двух человек. Перед работой бригаду инструктируют о мерах предосторожности при выполнении программы работ в зависимости от места отбора, климатических условий и т.д. Пробы, поступающие в лабораторию для исследования, регистрируют в журнале учета с обязательным указанием числа емкостей и номера протокола отбора проб для каждой пробы.

Биотестирование проб воды проводят не позднее 6 часов после их отбора. При невозможности проведения анализа в указанный срок пробы воды охлаждают (+2 - +4) °С. Пробы хранят не более 24 часов после отбора. О продолжительности хранения проб воды делают отметку в протоколе биотестирования. В исключительных случаях, при отсутствии летучих органических веществ, допускают замораживание проб (-20 ^{0}С) и их хранение до двух недель, однако следует помнить, что после размораживания токсичность воды может измениться. В случае предполагаемого замораживания пробы при ее отборе сосуды заполняют не полностью, чтобы избежать их разрыва. Если пробы требуется отстаивать или фильтровать, то фильтрация и отстаивание предшествуют замораживанию.

Подготовка проб воды к биотестированию

Перед биотестированием предварительно охлажденные или замороженные пробы доводят до температуры от (+21) °С до (+25) °С.

При наличии в сточных водах крупнодисперсных включений (с диаметром частиц более 3,5 мкм) необходима фильтрация пробы через наиболее пористые обеззоленные фильтры "белая лента" (недопустимо использовать фильтры "синяя лента", так как они задерживают коллоидные вещества, что занижает результаты биотестирования).

Природные воды фильтруют через мембранные фильтры с диаметром пор 3,5 мкм (фильтр перед применением промывают и стерилизуют кипячением в дистиллированной воде не менее 10 мин) или через обеззоленные фильтры "белая лента".

Активный хлор, используемый для обеззараживания сточных вод, является токсическим веществом, поэтому перед биотестированием сточных вод после системы хлорирования, хлор удаляют из исследуемой воды отстаиванием пробы с открытой крышкой при температуре от (+2) °С до (+4) °С не менее 24 часов.

Перед биотестированием температуру пробы доводят до (22 ± 2) °С. Данные регистрируют в журнале.

Заключение о токсичности и, соответственно, класс опасности образцов устанавливается по результатам биотестирования водной вытяжки без нейтрализации.

Если же необходимо уточнить влияние фактора pH на степень токсичности водных проб (особенно когда pH исследуемых проб выходит за пределы диапазона 7,0-8,5), объем экспериментального исследования увеличивают и определяют токсичность исследуемых проб как без нейтрализации, так и после нейтрализации. Нейтрализацию в этом случае осуществляют либо подкислением с помощью 10 %-ного раствора HCl), либо подщелачиванием - 10 %-ным раствором NaOH. После нейтрализации пробы аэрируют (10 - 20) мин для стабилизации pH.

Результаты исследования токсичности проб после нейтрализации отражаются в протоколе в том случае, если перед исследователем ставится задача выявить возможность уменьшения токсичности, а, следовательно, перевода исследуемых объектов – сточной воды, отходов и пр., в менее опасный класс путем нейтрализации. Такая специальная задача может быть полезна при принятии правильного природоохранного решения, например, о размещении сточных вод отходов в объектах окружающей среды, в случаях, если их нейтрализация технически осуществима в производственных условиях.

В биотестируемой пробе воды измеряют соленость. Идентичный уровень солености должна иметь контрольная проба воды.

Биотестируемая проба воды должна иметь массовую концентрацию растворенного кислорода не ниже 6 мг/дм^3, в противном случае пробу аэрируют при помощи аквариумного компрессора перед процедурой биотестирования.

Приготовление разбавлений исследуемых вод для биотестирования

Для приготовления разбавлений исследуемых вод используют культивационную воду той же солености, что и тестируемая проба. Предварительно, перед приготовлением необходимых разбавлений вод для исследования, подготавливают соответствующей емкости посуду, в которой будут готовить растворы. Объем используемой посуды должен на 1/3 превышать необходимый объем приготавливаемого разбавления исследуемых вод.

Перед приготовлением разбавлений подготавливают по возможности два одинаковых сосуда: один для разбавления, а другой для хранения раствора (может случиться, что в ближайшие часы процедуру биотестирования в определенном разбавлении необходимо будет

повторить). Как во время приготовления разбавлений, так и при их хранении бутыли или другую посуду обязательно закрывают предварительно подобранными пробками и снабжают надписями о приготовленной концентрации исследуемых вод. Приготовление растворов, разбавлений, проведение биотестирования выполняют при комнатной температуре. Температура культивационной и исследуемой воды должна быть также доведена до комнатной температуры перед приготовлением разбавлений.

Для приготовления разбавлений берут определенные, отмеренные мерной посудой, объемы исследуемой и разбавляющей (культивационной) воды. В качестве мерной посуды для объемов меньше 10 $см^3$ используют мерные пипетки. Для объемов более 10 $см^3$ - мерные цилиндры. В процессе приготовления разбавлений пробы тщательно перемешивают.

8.4.2 Отбор, транспортировка, хранение и подготовка проб почвы

Отбор, транспортировка и хранение проб почвы

Методы отбора, транспортировки, хранения, подготовки к выполнению биотестирования должны обеспечить неизменность состава проб почвы в интервале времени между отбором и их анализом.

Отбор проб грунта, транспортировку и хранение осуществляют в соответствии с ГОСТ 12071-84 "Грунты. Отбор, упаковка, транспортирование и хранение образцов", ГОСТ 27753.1-88 "Грунты тепличные. Методы отбора проб".

Отбор проб почвы, их транспортировку и хранение осуществляют в соответствии с ГОСТ 17.4.3.01-83 "Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб", ГОСТ 17.4.4.02-84 "Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа", ГОСТ 28168-89 "Почвы. Отбор проб".

При отборе проб почвы определяют протяженность и топографию зон загрязнения. Участки для отбора проб почвы хорошо отражают структуру района исследования: почвенный покров, материнскую породу, рельеф, геологические и гидрологические характеристики.

Необходимым условием отбора проб почвы является предохранение их от вторичного загрязнения (в том числе атмосферных осадков) на всех этапах отбора и подготовки проб к биотестированию.

Для сравнимости результатов необходимо, чтобы приемы выбора пунктов и способ отбора проб почвы были идентичны при каждом исследовании почвы на токсичность.

Для характеристики загрязнения почвы на определенной площади отбирают объединенные пробы почвы. Объединенную пробу составляют путем смешивания единичных проб почвы, отобранных в разных точках данной пробной площадки размером не менее (10х10) м (100 $м^2$), которая располагается в типичном для данной территории месте. На каждые 20 га площади закладывается не менее одной пробной площадки. При обследовании площади менее 0,5 га размер площадки уменьшается и составляет (5х5) м.

Объединенную пробу составляют из (5 – 10) или (15 – 20) единичных проб (в зависимости от однородности исследуемого участка), равномерно размещенных на пробной площадке. Объем единичных проб почвы должен быть одинаков, поэтому для пробоотбора лучше использовать почвенный щуп. Щуп - это узкий металлический желоб, заостренный с одного конца и имеющий рукоятку для удобства пользования. Примерные размеры щупа: длина (1,25 - 1,5) м; диаметр (15 – 20) мм. Желоб в щупе составляет 3/4 его общей длины.

Взятие смешанного образца проводят следующим образом: лопатой делают прикопку на глубину до (30 – 40) см, отмечают мощность и цвет верхнего горизонта или слоя и изменения в цвете и состоянии от поверхности вглубь, после чего со стенки берут образец на

полную глубину горизонта (слоя) массой (1 – 2) кг, предварительно очистив поверхность почвы от растений. Отбирают также образец поверхностной пробы до глубины (5 – 10) см той же массы.

Единичные пробы ссыпают на крафт-бумагу или клеенку, тщательно перемешивают, квартуют (сокращают) в (3 – 4) раза (почву разравнивают на бумаге в виде квадрата, делят на четыре части, две противоположные части отбрасывают, две оставшиеся части перемешивают). Оставшуюся после квартования почву делят на (6 – 9) квадратов, из центра которых отбирают примерно одинаковое количество почвы, обеспечивая захват всей толщины слоя, в банки из стекла с герметичной крышкой, таким образом, получают объединенную пробу, масса которой приблизительно 2 кг (1 кг на анализ и 1 кг для хранения дубликата). При отборе проб почвы составляют протокол по утвержденной форме (Приложение Б), в котором указывают цель пробоотбора, число, время, место отбора пробы, номер пробы, ставят подпись и расшифровывают подпись отбиравшего. На банку, контейнер наклеивают этикетку с указанием номера пробы, места, даты и времени ее отбора.

Транспортируют пробы при температуре окружающего воздуха от (+4) °С до (+28) °С.

Пробы, поступающие в лабораторию, регистрируют в журнале учета с обязательным указанием числа емкостей и номера протокола отбора проб для каждой пробы.

Пробы почв подвергают анализу не позднее 12 ч от момента отбора. При невозможности обеспечения данного условия, объединенные пробы в естественно влажном состоянии хранят в холодильнике (в банках с притертой или плотно завинченной крышкой) не более одной недели при температуре от (+2) °С до (+4) °С. Пробы почв не консервируют.

Для проведения контрольных измерений токсичности фоновых образцов почвы проводят отбор почвы на фоновых (незагрязненных) участках обследуемых областей.

При отборе проб почвы для приготовления фоновых образцов используют типичные для данного региона почвы, характерные по агрохимическим свойствам.

Приготовление водной вытяжки из почв

В лаборатории отобранные на токсикологический анализ почвы сначала разрыхляют вручную металлическим шпателем и освобождают от материала, заведомо относящегося к инородным (случайным) механическим включениям (возможные промышленные, строительные бытовые отходы и т.п.), а также галечника, обломков камней, корневищ, веток. Решение об изъятии таких включений из подготавливаемой пробы принимают на основе изучения полевого описания конкретного места ее отбора; эти сведения являются обязательной частью сопроводительной документации к пробам, направленным на токсикологический анализ.

Перед биотестированием пробы доводят до воздушно-сухого состояния. Для чего пробу подсушивают в вытяжном шкафу или в хорошо проветриваемом помещении, размещая ее (в зависимости от массы и естественной влажности) в стеклянных кристаллизаторах подходящей вместимости, на стекле или на чистых листах плотной бумаги.

Размещенные таким образом пробы почвы выдерживают открытыми не менее двух часов при комнатной температуре и влажности воздуха (ГОСТ 5180-84 "Грунты. Методы лабораторного определения физических характеристик"). Подготовленную пробу распределяют на ровной поверхности слоем толщиной не более 1 см и отбирают ложкой или шпателем из 5-ти точек методом конверта. Не допускают предназначенные для исследования на токсичность пробы почв подвергать тепловой обработке, поэтому гигроскопическую влажность почвы определяют в отдельном образце.

Затем пробу делят на две равные части: для биотестирования и для определения гигроскопической влажности после высушивания до постоянной массы, что необходимо для пересчета воздушно-сухой пробы на массу абсолютно-сухую.

Водную вытяжку из почвы для биотестирования готовят в соотношении: 1 часть почвы (с учетом гигроскопической влажности) и 4 части культивационной воды (допускают использование дистиллированной воды). Вода не должна содержать CO_2, так как в его присутствии растворяются карбонаты кальция и магния по причине образования растворимых бикарбонатов, которые увеличивают сухой остаток и общую щелочность водной вытяжки и тем самым искажают результаты биотестирования.

Для приготовления водной вытяжки из почвы отвешивают (100 – 200) г пробы почвы в воздушно-сухом состоянии, пересчитав ее массу на массу абсолютно-сухой. Масса пробы на стадии перед приготовлением водной вытяжки должна быть достаточной для получения необходимого объема экстракта при проведении биотестирования во всех предполагаемых разведениях с учетом контрольных испытаний. Навеску почвы помещают в колбу вместимостью 1000 $см^3$ и приливают 4-кратное количество культивационной воды.

Далее на аппарате для встряхивания жидкости полученную смесь встряхивают в течение 2-х часов, после чего отстаивают в течение 30 мин. Надосадочную жидкость сифонируют, а затем фильтруют через бумажные обеззоленные фильтры "белая лента" или через мембранные фильтры с диаметром пор 3,5 мкм (фильтры предварительно промывают и кипятят в дистиллированной воде не менее 10 мин). Бумажный фильтр помещают в воронку Бюхнера диаметром (15 – 20) см.

Перед тем как вылить вытяжку на фильтр, содержимое склянки или колбы встряхивают, чтобы взмутить присутствующие взвешенные частицы почвы. На фильтр стараются перенести всю взвесь. При выливании струю суспензии направляют на боковую двойную стенку бумажного фильтра, но не на дно фильтра, так как при выливании на дно бумага может легко порваться. Фильтрацию осуществляют с помощью вакуумного водяного или электрического насоса. Для фильтрации применяют слабый вакуум (не более 20 мм рт. ст.). Первые порции фильтрата часто бывают мутными и их несколько раз перефильтровывают до прозрачного раствора.

При повышенной мутности водной вытяжки из почв (гумусированные, дерново-подзолистые, торфяные и др. почвы) допускается отстаивание проб в холодильнике до 5 суток. Затем жидкость над осадком сифонируют. Непосредственно перед началом биотестирования пробы доводят до температуры (22 ± 2) °С, измеряют содержание кислорода и pH. Данные фиксируют в лабораторном журнале.

При необходимости дополнительных исследований вытяжку перед серийным разбавлением предварительно нейтрализуют (как указано в разделе 8.4.1.). Биотестируемая проба водной вытяжки из почв должна иметь концентрацию растворенного кислорода не ниже 6 $мг/дм^3$, в противном случае пробу аэрируют. В вытяжке определяют уровень солености. Такой же соленостью должен характеризоваться контроль.

8.4.3 Отбор, транспортировка, хранение и подготовка проб осадков сточных вод, отходов

Отбор, транспортировка и хранение проб

Методы отбора, транспортировки, хранения, подготовки к выполнению биотестирования обеспечивают неизменность состава проб осадков, отходов в интервале времени между отбором и их анализом.

Отбор проб осадков сточных вод на песковых, шламовых, иловых площадках производят следующим образом.

Если осадок на площадке представлен однородной массой, площадку делят на 4 равные части. Отбирают 4 пробы из центра каждого квадрата лопатой послойно с глубины (0 – 5) см, (5 – 10) см и до конечной глубины площадки (до песка или бетонного покрытия) не менее 1000 г каждой пробы.

Если осадок на площадке находится в твердом и жидком состоянии, отбор осуществляют из разных участков, разделяя их на квадраты и отбирая из центра каждого квадрата твердые осадки, как описано ранее, а жидкие - пробоотборником с разной глубины заполненной жидкими осадками площадки из 3 горизонтов: с поверхности, середины и со дна заполнения. Жидкие и твердые осадки отбирают в разные емкости.

Жидких осадков отбирают 2 $дм^3$ (1 $дм^3$ для анализа и 1 $дм^3$ для хранения дубликата).

Пробы твердых осадков тщательно перемешивают и (3 – 4) раза квартуют как указано для почв. Вес объединенной пробы должен быть 2 кг (1 кг для анализа и 1 кг для хранения дубликата).

Пробы осадков сточных вод не подлежат консервированию.

Пробы осадков сточных вод, поступившие в лабораторию на исследование, документально оформляют и маркируют. Необходимыми сопроводительными документами являются бланк описания осадка и акт отбора проб (Приложение Б).

Пробы, поступающие в лабораторию для исследования на токсичность, регистрируют в журнале учета с обязательным указанием числа емкостей и номера протокола отбора проб для каждой пробы.

Хранят пробу в холодильнике не более одной недели в стеклянной банке с притертой или плотно завинченной крышкой.

Пробоотбор отходов может быть связан с отбором следующих групп отходов, классифицируемых: а) по типу образования: отходы производства (промышленные/производственные отходы (ПО)), отходы потребления (твердые бытовые отходы (ТБО)), смешанные отходы (смесь ПО и ТБО); б) по агрегатному состоянию: твердые (пылеобразные, порошкообразные, зернистые, шлаки, гранулированные, кусковые), пасто-, смоло- и студнеобразные (текучие, пластичные, вязкие), полужидкие (шламообразные), эмульсии, суспензии, пульпы жидкие; в) по степени однородности: гомогенные и гетерогенные.

Время взятия и периодичность пробоотбора отходов имеет существенное значение для производств, использующих сырье переменного состава или перешедших на иной вид сырья, изменяющих технологический режим процесса или его технологическую (конструкционную) схему, а также для органических ПО и ТБО. При осуществлении производственного экологического контроля за отходами частоту отбора проб определяют планом-графиком, согласованным с территориальными органами государственного контроля.

Отбор проб ПО производят не реже 1 раза в год при условии неизменности технологического процесса и используемого сырья, а также в любое другое время для осуществления контрольных проверок возможных технологических сбоев. При переходе на иные сырьевые ресурсы или при изменении технологии вновь образующиеся отходы нуждаются в установлении нового класса токсичности (опасности) по результатам нового пробоотбора.

Отбор проб ТБО, а также отходов, образующихся при их сжигании (инсинерации, пиролизе) и компостировании, проводят на предприятии не реже 4 раз в год (1 раз в квартал).

Отбор проб ПО осуществляют периодически и непрерывно. Выбираемый способ пробоотбора зависит от количества образующегося отхода в единицу времени (за один производственный цикл, сутки, год), аппаратурного оформления технологического процесса, методов сбора и накопления отхода, предполагаемой токсичности (на основании сопоставления с изученными отходами аналогичных производств).

При периодическом пробоотборе объединенная проба образуется из нескольких точечных проб, отобранных в одно и то же время из одного и того же источника образования или накопления отходов (из бункера, хвостохранилища, ковша, шламонакопителя, отвала, свалки, карьера и др.). Единичные пробы отбирают в местах хранения или захоронения отходов по равномерной сети опробования.

Отбор проб производят из горных выработок (расчисток, закопушек, канав, шурфов) или скважин, пройденных с помощью буровых станков, установок или приспособлений различных конструкций. Кроме того, в местах хранения отходов, являющихся источником образования пыли, проводят измерения загрязнения воздушной среды.

В зависимости от целей исследования различают периодический пространственный, периодический глубинный и периодический смешанный пробоотбор. При периодическом пробоотборе, как правило, имеют дело с большим исходным объемом отхода (более 1 т).

Для осуществления пространственного пробоотбора намечают пробную площадку в виде квадрата со сторонами не менее 10 м. Затем отбирают с поверхности по схеме конверта 5 единичных проб (ГОСТ 17.4.4.02-84). На каждые 20 га накопителя (хранилища, свалки) закладывают не менее одной пробной площадки. Если территория накопителя составляет менее 0,5 га, размер пробной площадки должен быть не менее (5х5) м. Из единичных проб, отобранных с одной пробной площадки, приготавливают одну объединенную промежуточную пробу. Смесь объединенных промежуточных проб образует объединенную пробу, направляемую на исследование.

При глубинном пробоотборе руководствуются ориентировочной глубиной хранилища и количеством одноразово загружаемых в него отходов.

Смешанный пробоотбор заключается в отборе проб из кучи. При отборе проб из кучи рекомендуют отбирать одну единичную пробу с ее вершины (если это возможно осуществить), не менее четырех единичных проб из равноудаленных друг от друга точек основания кучи и произвольное количество точечных проб с ее боковой поверхности. Общее число проб, отбираемое из кучи высотой до 2 м, должно быть не менее 9. При увеличении высоты кучи на 1 м минимально необходимое число проб увеличивается на 4.

При непрерывном пробоотборе объединенную пробу отхода образуют из нескольких (не менее 2-х) единичных проб, отобранных в одном и том же месте через одинаковые промежутки времени (час, сутки, месяц).

Количество отбираемых отходов выражают в единицах массы (грамм, килограмм) или в единицах объема (литры). Единицы массы используют для характеристики количества твердых сыпучих отходов. Единицы объема наиболее применимы для выражения количеств жидких и полужидких отходов. Количество пастообразных отходов характеризуют как единицами массы, так и единицами объема.

Количество и необходимый объем отбираемой пробы отхода зависит от его агрегатного состояния, влажности, степени однородности и его зернистости (для сыпучих отходов).

Объединенную пробу отхода готовят из М-го количества единичных проб или из М-го количества объединенных промежуточных проб (в случае закладки нескольких пробных

площадок на территории протяженных хранилищ). Недопустимо образование объединенной пробы одновременно из единичных и объединенных промежуточных проб.

Объединенную пробу отхода готовят по принципу средневзвешенности или среднепропорциональности.

По принципу средневзвешенности объединенную пробу отхода образуют путем смешения одинакового массового количества вещества. Обычно так поступают, имея дело с сыпучими твердыми и пастообразными отходами с влажностью от 30 % до 70 %. По принципу среднепропорциональности объединенную пробу готовят из одинаковых объемов отходов. Наиболее часто, таким образом, готовят пробу полужидких отходов и паст с высокой влажностью (> 70 %).

Единичные пробы отходов перед объединением тщательно гомогенизируют. Обращаясь с твердыми сыпучими и пастообразными отходами, используют металлические шпатели. Полужидкие отходы гомогенизируют встряхиванием.

Для механизированной проходки скважин применяют буровые станки и установки различных способов бурения (вращательного, ударно-канатного, пневмоударного, шнекового) и самых различных конструкций, обеспечивающих представительный отбор проб. Шурфы также могут проходиться механизированным способом.

Для ручной проходки скважин применяют буры и щупы различных конструкций.

Отбор единичных проб проводят по равномерной сетке, размер которой выбирают в соответствии с нормативными документами, действующими на предприятии, на котором образуется отход, или определяется необходимым числом единичных проб. Число единичных проб рассчитывают исходя из степени изменчивости нормируемых компонентов в данных отходах и заданной погрешности их определения.

Иногда, для подтверждения представительности выбранных точек пробоотбора, производят выборочное обследование точек пробоотбора.

Отбор сыпучих отходов из тары (вагон, кузов автомобиля, контейнер и др.) производят с помощью щупа. Отбор единичных проб производят погружением щупа в опробуемую массу до середины или на всю высоту тары.

Массу единичных проб устанавливают в зависимости от состава опробуемого отхода и размера максимальных частиц (кусков). Расхождение по массе отдельных единичных проб не должно превышать 20 %.

Отобранные единичные пробы соединяют в объединенную пробу или сразу после пробоотбора, или после отдельной их подготовки до определенного этапа квартования, а затем объединяют в нужных пропорциях.

Сокращение пробы в зависимости от исходной массы объединенной пробы и размера частиц (кусков) проводят строго по выбранной схеме сокращения.

Для сокращения объединенной пробы применяют метод квартования с предварительным сбрасыванием на конус. Объединенная проба отхода (при отсутствии специальных требований) должна составлять не менее 5 кг (2,5 кг для анализа и 2,5 кг для хранения дубликата).

Пробы отходов не подлежат консервированию. Пробы отходов хранят в холодильнике (в банках с притертой или плотно закрытой крышкой) не более одной недели.

Пробы отходов, поступившие в лабораторию на исследование, документально оформляют и маркируют. Необходимыми сопроводительными документами являются бланк опи-

сания отхода и протокол пробоотбора (Приложение Б). Маркировку отходов осуществляют в произвольной форме, но с обязательным занесением обозначений в лабораторный журнал.

При проведении отбора проб отходов соблюдают меры, исключающие загрязнение окружающей среды от применения бурового оборудования. Контроль за содержанием вредных веществ в воздухе рабочей зоны осуществляют в соответствии с требованиями ГОСТ 12.1.005-88. При подготовке проб соблюдают меры, исключающие запыление окружающей среды, и правила захоронения (складирования) материала пробы, полученного в результате сокращения объединенной пробы.

Приготовление водной вытяжки из осадков сточных вод, отходов

Водную вытяжку из осадков сточных вод и отходов готовят из соотношения (твердая фаза : жидкость) равным (1:10). В качестве жидкости используют культивационную воду (допускают использование дистиллированной воды).

Твердые отходы и осадки сточных вод. Пробу тщательно перемешивают перекатыванием на гладкой, гибкой и плотной подстилке, затем - совком. Для пробоподготовки пробы отходов требуется 2,5 кг, пробы осадков сточных вод - 1 кг. Общий объем отобранной пробы (5 кг отходов или 2 кг осадков) делят на представительные половины, одну из частей возвращают в сосуд для хранения, оставшуюся часть разрыхляют и тщательно просматривают. В случае обнаружения частиц более 10 мм их осторожно измельчают с помощью металлического шпателя до размера менее 10 мм. Недопустимо механически размалывать смесь. Затем пробу высушивают до воздушно-сухого состояния. При плохом высыхании отхода экспозицию высушивания допускается увеличивать до 24 часов.

После этого пробу сокращают (3 – 4) раза методом квадратирования. Тщательно перемешанную пробу разравнивают на гладкой ровной поверхности на крафт-бумаге, клеенке или полиэтиленовой пленке и с помощью линейки или специальной решетки делят на равные квадраты. Затем из квадратов в шахматном порядке отбирают порции, обеспечивая захват всей толщины слоя, и объединяя порции в пробу с минимальной абсолютно-сухой массой 200 г представительной пробы, которую делят на две части и назначают для биотестирования и определения влажности.

Влажность осадков и отходов определяют по 8.4.1. Измеренную характеристику влажности используют для расчета массы воздушно-сухой пробы, предназначенной для приготовления водной вытяжки. Обычно требуется (120 – 200) г воздушно-сухой массы пробы. После выщелачивания 100 г абсолютно-сухой массы пробы будет получено приблизительно 900 $см^3$ водной вытяжки, учитывая это, следует определить общее необходимое минимальное количество отбираемой порции с учетом процедуры сокращения пробы. Масса пробы на стадии перед приготовлением водной вытяжки должна быть достаточной для получения необходимого объема экстракта для проведения биотестирования во всех предполагаемых разведениях с учетом контрольных испытаний. Пробу осадков, отходов в воздушно-сухом состоянии взвешивают так, чтобы абсолютно-сухая масса была (100 ± 1) г. Записывают массу и содержание влаги и помещают в сосуд для выщелачивания.

Шламы. Шламы с большим содержанием твердой фазы, не разделяющиеся самостоятельно, обрабатывают также как твердые отходы. Отдельно определяют содержание влаги. Масса шлама, эквивалентная (100 ± 1) г абсолютно-сухой массы используют для приготовления водной вытяжки.

Шламы с большим содержанием жидкости (влажность более 70 %) обрабатывают следующим образом. Жидкость фильтруют через вакуумный фильтр (0,45 мкм) и собирают

300 г влажно-твердого материала. Если такого количества пробы недостаточно для получения 200 г абсолютно-сухого вещества, собирают столько, сколько необходимо. Пробы высушивают до воздушно-сухого состояния по 8.5.2.2. При плохом высушивании экспозицию допускается увеличить до 24 ч. Пробу делят на две части, в одной определяют содержание влаги, а другую часть, составляющую (100 ± 1) г абсолютно-сухой массы, переносят в сосуд для выщелачивания. В рабочем журнале регистрируют массу остатка и содержание влаги в нем. Твердые шламы выщелачивают культивационной водой в пропорции (1:10).

Жидкие отходы. Отходы и осадки сточных вод, жидкие и содержащие менее 1 % взвешенного материала не подвергают выщелачиванию, а испытывают прямо на экотоксичность методами биотестирования после фильтрации через фильтр "белая лента".

Выполнение процедуры подготовки экстракта выщелачивания. В сосуд для выщелачивания, где находится взвешенная воздушно-сухая масса отхода или осадка сточных вод с абсолютно-сухой массой (100 ± 1) г, добавляют воду, используемую для культивирования (или дистиллированную воду). Воду добавляют в сосуд для выщелачивания в соотношении (сухая масса : жидкость) — (1:10). Обычно это 1000 $см^3$ воды на 100 г абсолютно-сухой массы. Если используют меньшее количество пробы, уменьшают количество жидкости. Нельзя использовать для выщелачивания менее чем 20 г твердого вещества и 200 $см^3$ воды.

Объемы воды более 10 $см^3$ измеряют мерным цилиндром, объемы меньше 10 $см^3$ - мерной пипеткой.

Смесь перемешивают слабо на мешалке в течение (7 – 8) часов таким образом, чтобы твердое вещество находилось во взвешенном состоянии. Недопустимо измельчение частиц отходов или осадков при перемешивании. Используется большая лопасть механической мешалки или магнитная мешалка, а скорость перемешивания должна быть наименьшей, при которой материал поддерживается во взвешенном состоянии (не более 70 об/мин).

После окончания перемешивания раствор с осадком оставляют на ночь (12-18 ч) для отстаивания. Затем жидкость над осадком сифонируют.

Если после отстаивания жидкость становится прозрачной, фильтрование не требуется; если же имеется какой-либо видимый взвешенный материал, то жидкость фильтруют. В случае применения фильтрования это отмечают в рабочем журнале. Фильтрацию осуществляют через фильтр "белая лента" на воронке Бюхнера. Для фильтрации применяют слабый вакуум (не более 20 мм рт. ст.) с помощью водяного или электрического насоса такой же мощности. Вакуум выключают немедленно после прохождения всей жидкости через фильтр, во избежание дегазации фильтрата. В исключительных случаях, при повышенной мутности водной вытяжки из отхода после фильтрации допускают ее отстаивание в холодильнике до 5 суток. Затем жидкость над осадком сифонируют .

Полученный экстракт выщелачивания исследуют на токсичность. Процедуру биотестирования начинают не позднее, чем через 6 ч после приготовления вытяжки из осадка, отхода. Если это невозможно, допускают хранение экстракта в холодильнике не более 48 ч при температуре 4 °С.

Перед биотестированием измеряют pH, температуру и содержание O_2 в полученном экстракте. Данные о температуре, содержании кислорода и значения pH фиксируют в лабораторном журнале.

Если осадки сточных вод или отходы были разделены на жидкую и твердую фракции, результаты исследования жидкой фракции и экстракта выщелачивания из твердой фракции указывают в отчете отдельно. Если одна из этих частей была признана экотоксичной, экотоксичным признается весь отход.

При необходимости дополнительных исследований вытяжку перед серийным разбавлением предварительно нейтрализуют (как указано в разделе 8.4.1.).

9. ПРОЦЕДУРА БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Для определения токсичности проводят биотестирование исходной исследуемой воды или водных вытяжек и нескольких ее разбавлений по 8.4.3.

Определение токсичности каждой пробы без разбавления и каждого разбавления проводят в пяти параллельных сериях. В качестве контроля используют пять параллельных серий с культивационной водой. В качестве культивационной воды используют отстоянную водопроводную воду с добавлением NaCl, соответствующей солености, т.е. идентичной солености тестируемой пробы.

Биотестирование проводят с соблюдением требований к температуре, и качеству культивационной воды.

Для биотестирования используют бакпечатки или другие широкогорлые сосуды, в которые наливают по 10 $см^3$ испытуемой жидкости или культивационной воды (контроль). В каждую из 5 бакпечаток помещают по 4 особи артемий, таким образом, в целом, в каждом эксперименте и контроле используют по 20 особей.

Сосуды с рачками оставляют на 48 часов при температуре (21 – 25) ^{0}С. По истечении этого времени производят подсчет выживших и погибших особей. Выжившими считают артемии, которые свободно перемещаются в толще воды. Обездвиженных особей относят к погибшим. Результаты наблюдений заносят в рабочий журнал (Приложение А).

Если гибель артемий в контроле превышает 10%, результаты опыта не учитывают и его повторяют.

После того, как результаты эксперимента учтены, все артемии выбрасывают, посуду промывают водой (температура не выше 40 ^{0}С), споласкивают дистиллированной водой.

10. ОБРАБОТКА, ОЦЕНКА И ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

10.1 При определении острой токсичности исследуемых проб, а также их разбавлений устанавливают:

- среднюю летальную кратность разбавления пробы, вызывающую гибель 50% тест-объектов за 48 часовую экспозицию - $ЛКР_{50}$;
- безвредное разбавление пробы, вызывающее гибель не более 10% за 48 часовую экспозицию $БКР_{10}$.

10.2 Для оценки острой токсичности пробы рассчитывают процент погибших артемий (А, %) по формуле (1)

$$A = \frac{Xt}{Xi} \cdot 100, \qquad (1)$$

где Xi - количество исходных особей;

Xt - количество погибших особей в тестируемой воде через 48 часов.

10.3 За результат измерений принимают среднее арифметическое результатов пяти параллельных определений, если выполняется условие приемлемости (2)

$$\frac{5 \cdot \left| A_{max} - A_{min} \right| \cdot 100}{(A_1 + A_2 + A_3 + A_4 + A_5)} \le CR_{0,95}(n), \qquad (2)$$

где A_{max}, A_{min} – максимальное и минимальное значения из полученных пяти результатов параллельных определений процента погибших артемий,

$CR_{0,95}(n)$ – значение критического диапазона для уровня вероятности P=0,95 и n – результатов определений.

$$CR_{0,95} = f(n) \cdot \sigma_r$$

Для n = 5

$$CR_{0,95} = 3,9 \cdot \sigma_r, \quad (3)$$

где σ_r – показатель повторяемости (среднеквадратичное отклонение повторяемости), % (таблица 1).

Если условие (2) не выполняется, эксперимент повторяют. В случае повторного превышения выясняют причины превышения критического диапазона, устраняют их и повторяют выполнение измерений в соответствии с требованиями МВИ.

10.4 Результат анализа в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде

$$\overline{A} \pm 0,01 \cdot \delta \cdot \overline{A} \text{ при P=0,95}$$

где $\overline{A}$ - среднее арифметическое значение результатов n определений процента погибших артемий признанных приемлемыми по 10.3, %.

δ - границы относительной погрешности измерений, % (таблица 1).

11. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДИКИ В ЛАБОРАТОРИИ

Контроль качества результатов измерений в лаборатории при реализации методики осуществляют по ГОСТ Р ИСО 5725-6 (Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений), используя контроль стабильности среднеквадратического (стандартного) отклонения повторяемости по 6.2.2 ГОСТ Р ИСО 5725-6 и контроль стабильности среднеквадратического (стандартного) отклонения промежуточной прецизионности по 6.2.3 ГОСТ Р ИСО 5725-6. Проверку стабильности осуществляют с применением контрольных карт Шухарта.

Периодичность контроля стабильности результатов выполняемых измерений регламентируют в Руководстве по качеству лаборатории. Рекомендуется устанавливать контролируемый период так, чтобы количество результатов контрольных измерений было от 20 до 30.

При неудовлетворительных результатах контроля, например, превышении предела действия или регулярном превышении предела предупреждения, выясняют причины этих отклонений, в том числе проводят смену реактивов, проверяют работу оператора.

11.1 Контроль и определение чувствительности тест-организмов к стандартному токсиканту $K_2Cr_2O_7$

Для каждой новой партии яиц артемий а также ежеквартально определяют диапазон чувствительности тест-культуры к стандартному токсиканту - бихромату калия. Определяют концентрацию стандартного токсиканта, при которой за 48 час гибнет 50% подопытных организмов. Для этого на основании стандарт титра методом последовательных разбавлений готовят серии растворов $K_2Cr_2O_7$ в соленой культивационной воде с концентрациями (1,0; 2,0; 5,0; 7,0; 10,0; 12,0) мгCr/дм^3.

В соответствии с методикой проводят 48-часовой эксперимент с одновозрастными науплиусами (возраст 2-12 ч) и определяют полулетальную концентрацию ($ЛК_{50}$) бихромата калия. $ЛК_{50}$(48) при температуре 22°С, солености 10‰ (по NaCl), pH 8-8,5 должна находиться в интервале (2,0 - 7,0) мгCr/дм^3. Если чувствительность культуры артемий соответствует необходимым требованиям, культуру используют в биотестировании. Если $ЛК_{50}$(48) стандартного токсиканта не находится в данном интервале, то проверяют точность приготовления исследуемых растворов, условия проведения опыта. Если ошибки при проведении испытаний исключены, то необходимо взять новую партию тест-организмов.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А
(рекомендуемое)

Протокол №____
регистрации результатов
при определении острой токсичности водной вытяжки из образца отходов на артемиях

Место отбора образца_____
Дата проведения биотестирования_____
Условия проведения биотестирования: pH; температура *(в пределах +23 ± 2 °С);* содержание кислорода *(не менее 6 мг О₂/дм³* -;), соленость (6-*10 ‰ и выше)*
Диапазон реагирования тест-организмов_____

Номер образца	Разведение водной вытяжки из образца	Исходное количество артемий в тестируемой воде, экз						Количество погибших артемий через 48 часов экспозиции, экз.					
		повторность						повторность					
		1	*2*	*3*	*4*	*5*	*Xi*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*Xi*
	1:1	4	4	4	4	4	20	4	4	4	4	4	20
	1:10	4	4	4	4	4	20	3	3	3	2	3	16
	1:100	4	4	4	4	4	20	0	0	0	0	0	0
	1:1000	4	4	4	4	4	20	0	0	0	0	0	0
	1:10000	4	4	4	4	4	20	0	0	0	0	0	0
	Контроль (*вода с добавлением NaCl до необходимой солености)*	4	4	4	4	4	20	0	0	0	0	0	0

Оценка токсичности образца: *(рассчитывается А - % погибших особей, на основании чего делается вывод о том, оказывает/не оказывает острое токсическое действие данная проба)* _____
подпись должность, фамилия

Приложение Б
(рекомендуемое)

Форма акта отбора проб
Акт отбора проб

1. Дата и время отбора пробы
2. Цель пробоотбора
3. Наименование предприятия, в результате деятельности которого образуется отход
4. Адрес предприятия
5. Адрес участка отбора
6. Наименование объекта отбора
7. Наименование отбираемой пробы
8. Номер пробы
9. Способ отбора (используемое оборудование)*_Упаковочная тара_
10. Характер пробы
11. Проба отобрана:
    Ф.И.О., должность, подпись _____
12. Проба принята:
    Ф.И.О., должность, подпись _____

* - при отборе проб с площади более 1 м^2 прикладывается схема пробоотбора нанесенная на карту-схему объекта размещения отходов

Приложение В
(справочное)

Свидетельство о метрологической аттестации МВИ

ВНИИМС

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
МЕТРОЛОГИЧЕСКОЙ СЛУЖБЫ

119361 Москва, Озёрная ул., д. 46 E-mail: analyt-vm@vniims.ru Тел. (495) 437 9419
Факс: (495) 437 5666

СВИДЕТЕЛЬСТВО № 16-06

ОБ АТТЕСТАЦИИ МВИ

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ВЫСОКОМИНЕРАЛИЗОВАННЫХ ПОВЕРХНОСТНЫХ И СТОЧНЫХ ВОД, ПОЧВ И ОТХОДОВ ПО ВЫЖИВАЕМОСТИ СОЛОНОВАТОВОДНЫХ РАЧКОВ *ARTEMIA SALINA* L.

Методика определения токсичности высокоминерализованных поверхностных и сточных вод, почв и отходов по выживаемости солоноватоводных рачков *Artemia salina* L., разработанная лабораторией экотоксикологического анализа почв, Экспертно-аналитический центр по проблемам окружающей среды "Экотерра", ф-т почвоведения МГУ им. М.В. Ломоносова и лабораторией водной токсикологии, биологический ф-т МГУ им. М.В. Ломоносова, аттестована в соответствии с ГОСТ Р 8.563–96 и ГОСТ Р ИСО 5725–2002 (Части 1-6).

Аттестация осуществлена по результатам экспериментальных исследований МВИ.

В результате аттестации установлено, что МВИ соответствует предъявляемым к ней метрологическим требованиям и обладает основными метрологическими характеристиками, приведенными на обороте настоящего свидетельства.

При реализации методики в лаборатории обеспечивают контроль стабильности результатов анализа на основе контроля стабильности среднеквадратического отклонения повторяемости и контроля стабильности среднеквадратического отклонения промежуточной прецизионности.

Дата выдачи 12 апреля 2006 года

Заместитель директора В.Н. Яншин

РЕЗУЛЬТАТЫ МЕТРОЛОГИЧЕСКОЙ АТТЕСТАЦИИ

Наименование объекта	Диапазон измерений относительного количества погибших рачков *Artemia salina* L., %	Показатель точности (границы относительной погрешности) ±δ, % при P=0,95	Показатель повторяемости (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R, %
Высокоминерализованные отходы, осадки сточных вод	От 0 до 100 вкл.	80	35	40
Высокоминерализованные почвы		45	15	22
Высокоминерализованные сточные воды		40	16	20
Высокоминерализованные воды природные		30	13	15

Начальник отдела Ш.Р. Фаткудинова

Младший научный сотрудник С.В. Вихрова

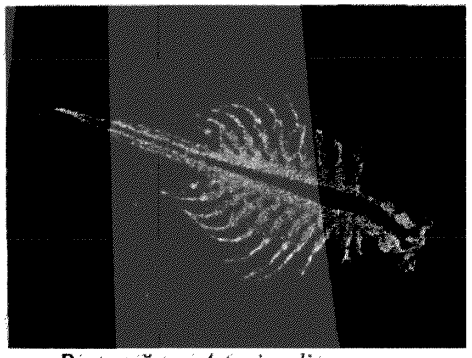
Приложение Г

(справочное)

Характеристика рачков *Artemia salina*

В качестве тест-организмов используется жаброногий рачок *Artemia salina* – широко распространенный эвригалинный вид.

Систематическое положение: класс *Crustacea*, п/класс *Entomostraca*, отряд *Phyllopoda*, п/отряд *Euphyllopoda*, сем. *Branchipodidae*, род ***Artemia***



Внешний вид *Artemia salina*

Морфология. Тело артемий удлиненное, не имеет раковины, состоит из многочисленных, ясно различимых сегментов, хорошо подразделяется на отделы: голову, трункус, несущий листовидные ножки (11 пар), и тельсон (или абдомен). Голова с двумя стебельчатыми сложными глазами и одним непарным науплиальным глазом. 2-я антенна у самцов большая и крючкообразная, превращена в хватательный орган. Абдомен закачивается фуркой, состоящей из 2 фуркальных пластинок, покрытых щетинками. Длина взрослых рачков – около 1 см (Липин, 1950, Определитель пресноводных беспозвоночных..., 1995). У этих рачков выражен половой диморфизм, самцы и самки отличаются окраской и строением и размером антенн, которые у самцов значительно больше.

Рост, развитие и размножение. В благоприятных условиях выклев науплиев артемий из яиц происходит через (1 – 2) суток. В первые дни жизни науплии находятся на эндогенном питании. В возрасте (3 – 4) суток (метанауплис III) науплиусы переходят на активное питание и совершают первую линьку. В зависимости от температурных условий артемии достигают половозрелости через (3 – 4) недели после выклева из яиц.

В природных условиях у артемий наблюдается как половое размножение, так и партеногенез. Партеногенетические яйца развиваются сразу после созревания, оплодотворенные яйца могут довольно долго сохраняться в покоящемся состоянии, постэмбриональное развитие со сложным метаморфозом (Определитель пресноводных беспозвоночных..., 1995).

Условия перехода к партеногенезу недостаточно изучены, в литературе есть указания на распространенность у рода *Artemia* облигатного партеногенеза и линии артемии, размножающиеся преимущественно партеногенетически (Varo et al., 1998). В отдельных популяциях *Artemia* отмечено живорождение.

Питание. Артемии являются фильтраторами, пищей им служат мелкие планктонные организмы (одноклеточные водоросли, бактерии) и частицы детрита. В связи с эндогенным питанием науплиусы артемий не нуждаются в подкормке в течение четырех суток после выклева (Временные методические рекомендации...,1999).

Обитание и культивирование. Артемии обитают в соленых озерах, содержащих хлориды, карбонаты и сульфаты в различной концентрации вплоть до насыщенного состояния (Яшнов, 1969). *Artemia salina* входит в число тех немногих солоноводных видов, аквакультура которых хорошо развита. В значительной степени это связано с тем, что артемию используют в аквариумистике в качестве живого корма. Науплии артемий легко получать в очень широком диапазоне солености из яиц, которые могут храниться продолжительное время. Рачок *Artemia salina* рекомендован для биотестирования морской среды (Временные методические рекомендации...1999), однако их применение ограничено только условиями морской воды (20% - 35%).

Библиография

1. Временные методические рекомендации по установлению эколого- рыбохозяйственных нормативов загрязняющих веществ для морских вод. М., изд-во ВНИРО,1999, с. 32-35.
2. Липин А.Н. Пресные воды и их жизнь. М., 1950, с. 204-210.
3. Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий. Том 2. Ракообразные. С.-П., 1995.
4. Яшнов В. А. Практикум по гидробиологии. М.,1969, с. 103.
5. Varo I., Serrano R., Navarro J. C., Lopez F. J., Amat F. Acute lethal toxicity of the organophosphorous pesticide chlorpyrifos to different species and strains of Artemia. Bull. Environ. Contam. and Toxicol. 1998, 61, 6, p. 778-785.

Приложение Д
(справочное)

Перечень методик биотестирования и коды регистрации в Федеральном реестре МВИ
Токсикологические методы контроля

ФР.1.39.2007.03222. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний (ООО "Акварос")

ФР.1.39.2007.03221. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости цериодафний (ООО "Акварос")

ФР.1.39.2007.03223. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей (ООО "Акварос")

ФР.1.39.2006.02506. ПНД Ф Т 14.1:2:3.13-06 (ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.10-06) Методика определения токсичности отходов, почв, осадков сточных, поверхностных и грунтовых вод методом биотестирования с использованием равноресничных инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg (ЛЭТАП, МГУ)

ФР 1.39.2006.02505. ПНД Ф Т 14.1:2.14-06 (ПНД Ф Т 16.1:3.11-06) Методика определения токсичности высокоминерализованных поверхностных и сточных вод, почв и отходов по выживаемости солоноватоводных рачков *Artemia salina* L.(ЛЭТАП, лаб. водной токсикологии, МГУ, ЭАЦ "Экотерра")

ФР.1.39.2007.04104. ПНД Ф Т 16.3.12-07 Методика определения токсичности золошлаковых отходов методом биотестирования на основе выживаемости парамеций и цериодафний (ЛЭТАП, МГУ и ОАО «ВТИ»).

ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04 (ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.7-04) Методика определения токсичности проб поверхностных пресных, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer). Красноярский государственный университет

ПНД Ф Т 14.1:2:4.12-06 (ПНД Ф Т 16.1:2:3:3.9-06) Методика определения токсичности водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов, питьевой, сточной и природной воды по смертности тест-объекта *Daphnia magna* Straus. Красноярский государственный университет

ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.11-04 (ПНД Ф Т 16.1:2.3:3.8-04) Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой "Эколюм" на приборе "Биотокс-10". ООО НЦ "Экологическая перспектива"

ПНД Ф Т 16.2:2.2-98 Методика определения токсичности почвы и донных осадков по хемотаксической реакции инфузорий. АОЗТ "Спектр-М"

ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.2-98 Методика определения токсичности воды по хемотаксической реакции инфузорий. АОЗТ "Спектр-М"