МЕТОДИКА ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ВОД, ВОДНЫХ ВЫТЯЖЕК ИЗ ПОЧВ, ОСАДКОВ СТОЧНЫХ ВОД И ОТХОДОВ ПО ИЗМЕНЕНИЮ УРОВНЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА И ЧИСЛЕННОСТИ КЛЕТОК ВОДОРОСЛЕЙ

Федеральный реестр (ФР)
ФР.1.39.2007.03223

Методика допущена для целей государственного экологического контроля

Москва «АКВАРОС» 2007

gost.e-ecolog.ru

МЕТОДИКА ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗМЕРЕНИЙ

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ВОД, ВОДНЫХ ВЫТЯЖЕК ИЗ ПОЧВ, ОСАДКОВ СТОЧНЫХ ВОД И ОТХОДОВ ПО ИЗМЕНЕНИЮ УРОВНЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА И ЧИСЛЕННОСТИ КЛЕТОК ВОДОРОСЛЕЙ

Федеральный реестр (ФР)
ФР.1.39.2007.03223

Методика допущена для целей государственного экологического контроля

Москва «АКВАРОС» 2007

СОДЕРЖАНИЕ

НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ 4
1 ПРИНЦИП МЕТОДА 4
2 ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОГРЕШНОСТИ 4
3 СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ПОСУДА, РЕАКТИВЫ, МАТЕРИАЛЫ 5
4 УСЛОВИЯ БЕЗОПАСНОГО ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТ 8
5 ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ЛИЦ, ПРОВОДЯЩИХ БИОТЕСТИРОВАНИЕ 8
6 УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ 8
7 ПОДГОТОВКА К БИОТЕСТИРОВАНИЮ 9
7.1 Подготовка посуды для отбора, хранения проб и биотестирования 9
7.2 Отбор, транспортировка, хранение и подготовка проб 9
7.2.1 Отбор, транспортировка, хранение и подготовка проб воды 9
7.2.1.1 Отбор, транспортировка и хранение проб воды 9
7.2.1.2 Подготовка проб воды к биотестированию 12
7.2.1.3 Приготовление разбавлений исследуемых вод для биотестирования 13
7.2.2 Отбор, транспортировка, хранение и подготовка проб почвы 14
7.2.2.1 Отбор, транспортировка, хранение проб 14
7.2.2.2 Приготовление водной вытяжки из почв 15
7.2.3 Отбор, транспортировка, хранение и подготовка проб осадков сточных вод, отходов 18
7.2.3.1 Отбор, транспортировка и хранение проб 18
7.2.3.2 Приготовление водной вытяжки из осадков сточных вод, отходов 22
7.2.4 Проведение теста на биохимическую разлагаемость осадков сточных вод, отходов 24
8 ПРОЦЕДУРА БИОТЕСТИРОВАНИЯ И ВЫПОЛНЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ 25
8.1 Процедура биотестирования и выполнение измерений при использовании прямого счета численности клеток водорослей 26
8.2 Процедура биотестирования и выполнение измерений по изменению уровня флуоресценции хлорофилла 27
9 ОБРАБОТКА, ОЦЕНКА И ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ 28
9.1 Обработка результатов биотестирования 28
9.2 Методы определения острой токсичности с использованием пробит-анализа и расчетного метода 29
9.2.1 Графический метод определения $ИК_{50\text{-}72}$, $ИКР_{50\text{-}72}$ с использованием пробит-анализа 29
9.2.2 Неграфический метод определения $ИК_{50\text{-}72}$, $ИКР_{50\text{-}72}$ 31
10 КОНТРОЛЬ ПРИЕМЛЕМОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ 33
11 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ МЕТОДИКИ В ЛАБОРАТОРИИ 34
12 ПРЕДУПРЕДИТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА 34
Библиография 36
Приложение А (рекомендуемое) Форма протокола отбора проб 38
Приложение Б (обязательное) Выращивание культуры водорослей 39
Приложение В (рекомендуемое) Регистрация результатов измерений (прямой счет водорослей) 41
Приложение Г (рекомендуемое) Регистрация результатов измерений (флуоресценция водорослей) 42
Приложение Д (рекомендуемое) Ведение рабочего журнала 43
Приложение Е (рекомендуемое) Протокол КТА (регистрационный номер, дата выдачи) 44
Приложение Ж (рекомендуемое) Характеристика тест-объекта 45
Приложение И Свидетельство об аттестации МВИ 46

НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящий документ устанавливает методику определения острой токсичности растворов отдельных химических веществ, проб поверхностных пресных, грунтовых, питьевых, сточных и очищенных сточных вод, а также водных вытяжек из почвы, осадков сточных вод и отходов по снижению уровня флуоресценции хлорофилла и снижению численности клеток зеленых протококковых водорослей *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. или *Selenastrum capricornutum* в лабораторных условиях.

Уровень флуоресценции измеряют с помощью прибора «Флюорат 02-3», «Флюорат 02-3М» или другой модели по согласованию с производителем прибора.

Численность водорослей определяют под микроскопом методом прямого счета в камере Горяева.

1 ПРИНЦИП МЕТОДА

Методика основана на регистрации снижения уровня флуоресценции хлорофилла и темпа роста (снижение численности) клеток водорослей под воздействием токсических веществ, присутствующих в тестируемой воде, водной вытяжке из почв, осадков сточных вод, отходов (опыт) по сравнению с контрольной культурой в пробах, не содержащих токсических веществ (контроль).

Критерием острой токсичности является подавление уровня флуоресценции хлорофилла водорослей или снижение численности клеток водорослей на 50 % и более по сравнению с контролем в течение 72-часовой экспозиции.

В экспериментах по определению острого токсического действия устанавливают:

1) острую токсичность или ингибирующую концентрацию отдельных веществ ($ИК_{50-72}$) или ингибирующую кратность разбавления ($ИКР_{50-72}$) вод и водных вытяжек, содержащих смеси веществ, вызывающую снижение уровня флуоресценции хлорофилла или снижение численности клеток водорослей на 50 % и более по сравнению с контролем за 72 часа экспозиции;

2) безвредную (не вызывающую эффекта острой токсичности) концентрацию ($БК_{20-72}$) отдельных веществ и безвредную кратность разбавления ($БКР_{20-72}$) вод и водных вытяжек, содержащих смеси веществ, вызывающих снижение уровня флуоресценции хлорофилла или численности клеток водорослей не более чем на 20 % по сравнению с контролем за 72 часа экспозиции.

2 ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОГРЕШНОСТИ

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

Таблица 1 — Значения метрологических характеристик для различных анализируемых объектов

Объект	Показатель точности (границы относительной погрешности) ±δ, %, при $P = 0,95$		Показатель повторяемости (относительное среднеквадратичное отклонение повторяемости, σ_r, %		Показатель воспроизводимости (относительное среднеквадратичное отклонение воспроизводимости), σ_R, %		Предел повторяемости, r, %, $P = 0,95$, $n = 2$	
	по уровню флуоресценции хлорофилла	по численности клеток водорослей	по уровню флуоресценции хлорофилла	по численности клеток водорослей	по уровню флуоресценции хлорофилла	по численности клеток водорослей	по уровню флуоресценции хлорофилла	по численности клеток водорослей
Вода (питьевая, грунтовая, поверхностная пресная, сточная, водная вытяжка из почв, осадков сточных вод, отходов производства)	20	32	7	11	9	15	20	30

3 СРЕДСТВА ИЗМЕРЕНИЙ, ПОСУДА, РЕАКТИВЫ, МАТЕРИАЛЫ

Для проведения исследований по данной методике необходимы следующие средства измерений, материалы и реактивы:

«Флюорат 02-3» (или другая модель по согласованию с производителем прибора) — возбуждение флуоресценции хлорофилла в диапазоне 400–500 нм; регистрация флуоресценции хлорофилла в диапазоне 650–750 нм; чувствительность при определении плотности культуры *Scenedesmus quadricauda* не менее 2 тыс. кл./см^3;

весы лабораторные общего назначения, 4 класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 200 г (ГОСТ 24104-2001);

весы лабораторные общего назначения, 4 класса точности, с наибольшим пределом взвешивания 1000 г (ГОСТ 24104-2001);

меры массы (ГОСТ 7328-2001);

pH-метр (ГОСТ 25.7416.01-71);

барометр–анероид типа М-67 с пределами измерений от 610 до 790 мм рт. ст.;

люксметр любого типа, например, цифровой ТЮ 1403 (ТУ 4485-0152-05764771-96);

термометр лабораторный шкальный с диапазоном измерения от 0 °С до 50 °С с ценой деления шкалы 0,5 °С (ГОСТ 28498-90);

термометр стеклянный ртутный для точных измерений с диапазоном измерения от –3 °С до +65 °С с ценой деления шкалы 0,5 °С, тип ТМ-14 (ГОСТ 13646-68);

микроскоп биологический рабочий или исследовательский типов МБР, МБИ, обеспечивающий увеличение в 100–200 раз (ТУ 3-3-1210-75);

лупа измерительная (ГОСТ 25706-83);

линейка измерительная (ГОСТ 427-75);

пипетки автоматические-дозаторы (любого типа) объемом 0,002–0,2 $см^3$; 0,02–0,2 $см^3$; 0,1–1,0 $см^3$ ±1,0 %;

микропипетки 0,1 $см^3$, 0,2 $см^3$ с ценой деления 0,01 $см^3$ (ГОСТ 29227-91);

цилиндры вместимостью 25, 50, 100, 1000 $см^3$ второго класса точности (ГОСТ 1770-74);

мензурки вместимостью 0,25; 0,5; 1,0$дм^3$ (ГОСТ 1770-74);

колбы мерные 2-25-2, 2-50-2, 2-100-2 (ГОСТ 1770-74);

колбы конические вместимостью 250, 100, 50 $см^3$ типа КН-1, КН-2 (ГОСТ 25336-82);

пипетки вместимостью 1, 2, 5, 10 $см^3$ с ценой деления 0,1 $см^3$ (ГОСТ 29227-91);

климатостат (бокс для культивирования водорослей) или эквивалентное приспособление, позволяющее поддерживать освещение лампами дневного света 3000–10000 лк и температуру окружающего воздуха от +22 °С до +25 °С;

мешалка лабораторная (ТУ 25-05-2160-76Е), или аппарат для встряхивания (ТУ 25-052160-76), или мешалка магнитная (ТУ 25-11-834-73), или перемешивающее устройство ПЭ-6410 М (ТУ 3614-008-23050963-99);

насос вакуумный любого типа, например, водоструйный стеклянный (ГОСТ 25336-82) с приемником объемом 1000 $см^3$;

аппарат Зейца или другой фильтровальный аппарат, например, отсасыватель хирургический ОХ–10 (ТУ 64-1-2941-81);

центрифуга лабораторная медицинская (ТУ 5-375-4261-76), или типа ЦЛК-1 с комплектом пробирок (ТУ 5-4260);

сушильный электрический шкаф общелабораторного назначения (ТУ 64-1-909-80);

автоклав (ГОСТ 9586-75);

плитка электрическая (ГОСТ 14919-83);

спиртовка лабораторная стеклянная (ГОСТ 25336-82);

сита почвенные (ТУ 46-47-885-73);

шпатели металлические (ГОСТ 19126-79);

холодильник бытовой, обеспечивающий замораживание (–20 ± 1°С) и хранение проб (от +2 °С до +4 °С);

баня водяная (ТУ 64-1-2850-76);

баня песочная (ТУ 46-775-74);

пробоотборник объемом 500–700 $см^3$ (ГОСТ 6859-72);

батометр-бутылка на штанге тип ГР-16М (ТУ 25-04-1749);

дночерпатель любого типа;

буры почвенные (ТУ 2.833.106-89);

ножи почвенные (ГОСТ 23707-95);

лопаты (ГОСТ 19596-87);

совок (ГОСТ 14180-80);

щупы винтообразные с продольным вырезом, поршневые (ГОСТ 2517-85);

долота, колуны; ведра, изготовленные из нержавеющей стали или с тефлоновым покрытием;

ступки и пестики фарфоровые (ГОСТ 9147-80);

мельничное сито или капроновое сито (газ) № 64–77 (ГОСТ 4403-91);

фильтры бумажные обеззоленные «белая лента» (ТУ 6-09-1678-77, ГОСТ 12026-76);

фильтры мембранные с диаметром пор 0,45; 3,5 мкм «Владипор» марки МФАС-ОС-2 (ТУ 6-55-221-1029-89), МФАС-П-4 (ТУ 6-55-221-903-88) или аналогичные зарубежного производства, имеющие международный сертификат качества ISO 9000 или EN 29000;

вата хлопковая медицинская гигроскопическая (ГОСТ 5556-81);

бинт марлевый медицинский (ГОСТ 1172-93);

груши резиновые разные — пипеточные луковицы (ТУ 38-106003);

камера для счета форменных элементов крови по Горяеву 0,1 мм глубины (ТУ 42-816);

склянки и банки стеклянные с винтовым горлом, с прокладкой и крышкой или с притертой пробкой для отбора и хранения проб и реактивов вместимостью 500, 1000, 2000, 5000 $см^3$ (ТУ 6-19-6-70);

флаконы и банки цилиндрические полиэтиленовые или политетрафторэтановые с навинчивающимися крышками для отбора и хранения проб и реактивов вместимостью 100, 250, 500, 1000, 2000 $см^3$ (ТУ 6-19-45);

воронки лабораторные (ГОСТ 25336-82);

стаканчики для взвешивания (бюксы) диаметром 30, 40 мм (ГОСТ 25336-82);

эксикаторы с крышкой (ГОСТ 25336-82);

бутыли, кристаллизаторы произвольного объема для замачивания и мытья посуды;

стекла покровные для микропрепаратов (ГОСТ 6672-75);

стаканы стеклянные лабораторные вместимостью 30, 100, 200 $см^3$ (ГОСТ 25336-82);

колбы стеклянные лабораторные вместимостью 50 $см^3$, 1 и 2 $дм^3$ (ГОСТ 25336-82);

спирт этиловый (ГОСТ 18300-87);

вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72);

аммоний ванадиевокислый мета х. ч. (ГОСТ 9336-75);

железо (III) сульфат х. ч. (ГОСТ 9485-74);

железо (III) хлорид х. ч. (ГОСТ 4147-74), 6-водное ос. ч. 5-2 (ТУ 6-09-1007-77);

калий двухромовокислый стандарт-титр (ТУ 6-09-2540-87) или х.ч. (ГОСТ 4220-75);

калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный х. ч. (ГОСТ 2493-75);

калий фосфорнокислый однозамещенный 3-водный х. ч. (ГОСТ 4198-75);

калий углекислый х. ч. (ГОСТ 4221-76);

калий азотнокислый х. ч. (ГОСТ 4217-77);

кальций азотнокислый 4-водный х. ч. (ГОСТ 4142-77);

магний сернокислый 7-водный х. ч. (ГОСТ 4523-77) или стандарт-титр (ТУ 6-09-2540-87);

марганец хлористый х. ч. (ГОСТ 612-75);

молибдена окись х. ч. (ТУ 6-09-4471-77);

натрия гидрооксид х. ч. (ГОСТ 4328-77);

цинк сульфат 7-водный ос. ч. 9-2 (ТУ 6-09-4219-76);

кислота азотная х. ч. (ГОСТ 4461-77);

кислота борная х. ч. (ГОСТ 9656-75);

кислота соляная х. ч. (ГОСТ 3118-77);

этилендиамин-N, N, $\overline{N}$, $\overline{N}$-тетрауксусной кислоты динатриевая соль двухводная (трилон Б) х. ч. (ГОСТ 10652-73);

культура зеленых водорослей *Scenedesmus quadricauda (*Turp.) Breb. или *Selenastrum capricornutum.*

Примечание Допускается использование средств измерений, вспомогательных устройств и материалов другого типа, имеющих аналогичные метрологические характеристики

4 УСЛОВИЯ БЕЗОПАСНОГО ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТ

4.1 При работе с химическими веществами, загрязненными почвами, осадками сточных вод, отходами и сточными водами соблюдают требования техники безопасности по ГОСТ 12.4.021-75, по ГОСТ 12.1.007-76 «ССВТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

4.2 При пробоподготовке загрязненных почв, осадков сточных вод и отходов пользуются средствами индивидуальной защиты: специальной одеждой по ГОСТ 14.4.103-83, респираторами по ГОСТ 12.4.034-85, головными уборами по ГОСТ 12.4.128-83, полихлорвиниловыми перчатками по ГОСТ 12.4.013-85.

4.3 К воздуху производственных помещений предъявляют санитарно-гигиенические требования по ГОСТ 12.1.005-88.

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

4.5 Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004-91, СНиП 21-01-97 «Пожарная безопасность зданий и сооружений».

4.6 Рабочие столы и поверхности содержатся в чистоте. В конце дня проводят влажную уборку рабочих поверхностей.

4.7 Организуют обучение работающих безопасности труда по ГОСТ 112.0.004-90.

5 ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ЛИЦ, ПРОВОДЯЩИХ БИОТЕСТИРОВАНИЕ

К биотестированию допускают специалистов, освоивших методические приемы водной токсикологии, имеющие специальность «биолог», «химик», и уложившиеся в нормативы контроля при освоении методики.

6 УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Биотестирование проводят в нормальных лабораторных условиях. Помещение не должно содержать токсичных паров и газов.

Температура окружающего воздуха в лаборатории от +18 °С до +25 °С, в люминостате для биотестирования от +22 °С до +25 °С.

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

Освещение помещения естественное или искусственное, не ограничено особыми требованиями. Освещение в люминостате, или эквивалентном приспособлении, лампами дневного света. Освещенность, для водорослей (3000–10000) лк.

7 ПОДГОТОВКА К БИОТЕСТИРОВАНИЮ

Для проведения биотестирования предварительно разрабатывают программу отбора проб, готовят посуду, оборудование, вспомогательные материалы для отбора проб и проведения биотестирования, пробоотборники, места хранения отобранных проб, а также рабочие места для обработки доставленных в лабораторию проб и исследования их на токсичность. Все процедуры предварительной подготовки должны исключать попадание токсичных, органических и каких-либо других веществ из окружающих предметов или среды в исследуемую воду или в водные вытяжки из почв, осадков сточных вод и отходов.

7.1 *Подготовка посуды для отбора, хранения проб и биотестирования*

Для отбора проб воды используют посуду из полиэтилена или политетрафторэтана, а при наличии в воде нефтепродуктов, моющих средств и пестицидов — банки из темного стекла.

Для отбора проб почв, осадков сточных вод и отходов используют банки из темного стекла или посуду из нержавеющей стали. Для отбора проб, исследуемых на токсичность, нельзя использовать посуду с хромовым покрытием.

Посуда из полиэтилена и стекла для отбора проб и биотестирования должна быть химически чистой. Ее промывают раствором азотной кислоты с массовой долей 10 %. Стенки посуды осторожно смачивают этим раствором, после чего на 2–3 часа посуду оставляют, затем ее тщательно промывают водопроводной водой, нейтрализуют раствором пищевой соды и промывают 3–4 раза дистиллированной водой. При сильном загрязнении посуды, а также новую посуду промывают водой, заполняют раствором азотной кислоты с массовой долей 10 % и выдерживают не менее суток, затем тщательно промывают раствором соды, водопроводной и не менее 3–4 раз дистиллированной водой. Посуду для отбора проб почв, осадков сточных вод и отходов, изготовленную из нержавеющей стали, тщательно моют, очищают пищевой содой, промывают водопроводной водой и ополаскивают 3–4 раза дистиллированной водой. Для мытья посуды не разрешается пользоваться хромовой смесью (смесь бихромата калия и серной кислоты), синтетическими поверхностно-активными веществами и органическими растворителями.

Всю грязную посуду, использованную при отборе проб, в процессе пробоподготовки и проведения биотестирования подвергают стерилизации кипячением в течение 1 часа или стерилизуют (за исключением мерной) в сушильном шкафу при 160 °С в течение 1 часа, или подвергают автоклавированию (за исключением мерной) при 121 °С и давлении 1,05 кг/см^2 в течение 15 минут. Стекло, полипропилен и тефлон можно подвергать автоклавированию.

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.

7.2 *Отбор, транспортировка, хранение и подготовка проб*

7.2.1 Отбор, транспортировка, хранение и подготовка проб воды

7.2.1.1 *Отбор, транспортировка и хранение проб воды*

Для проведения исследования на токсичность отбирают не менее 1000 см^3 водной пробы. Отбираемый объем должен быть в два раза больше требуемого для хранения дубликата пробы до конца биотестирования.

Методы отбора, транспортировки, хранения, подготовки к выполнению биотестирования должны обеспечить 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». Требования к процедуре отбора проб изложены в разделе 5.7 ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025-2000.

Отбор проб, транспортировка 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 из нетоксичного материала, легко выниматься из пробоотборника для очистки и мытья.

Для отбора глубинных проб воды из озер, водохранилищ, прудов и рек 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 проб питьевых вод осуществляют в соответствии с ГОСТ Р 51592-2000 «Вода. Общие требования к отбору проб».

Отбор питьевых вод перед поступлением в распределительную сеть производят из кранов на водоводах, расположенных на входе в установку обеззараживания.

Пробы питьевой воды в источнике водоснабжения с глубины 0,5 м отбирают пробоотборником любого типа объемом (500–700) $см^3$.

Водопроводную воду отбирают из-под крана, многократно ополоснув его отбираемой водой, после 10-минутного слива при полностью открытом кране. Кран антисептической обработке не подвергается.

Отбор сточных вод осуществляют в соответствии с требованиями НВН 33-5.3.01-85 «Инструкция 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.

Очищенные сточные, а также питьевые воды на стадии водоподготовки отбирают до системы хлорирования.

При исследовании сточных вод на токсичность не допускается отбор разовой пробы. Количество необходимых порций выбирают на основе опыта проведения анализа. Предпочтительно отбирать среднесуточную пробу каждый час в течение 24 часов, после тщательного пе-

ремешивания всего объема отобранной пробы для исследования берется необходимое количество воды. Среднесуточная проба составляется из равных объемов сточных вод, отобранных через равные определенные промежутки времени.

Допустимое минимальное количество отбираемых единичных проб для последующего смешения — три, с интервалом между отборами не менее часа.

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, держат термометр вместе со склянкой на уровне глаз. Точность определения (±0,5) °С.

Не допускается консервирование проб, предназначенных для исследования на токсичность.

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 прокладки тефлоновые или 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 должны быть снабжены термоизолирующими прокладками, обеспечивающими предохранение проб от промерзания. При транспортировке не следует держать пробы на свету.

При отборе пробы составляют протокол по утвержденной форме (см. Приложение А). На бутыль наклеивают водостойкую этикетку или пишут несмываемым водой маркером с указанием номера пробы, места, даты и времени ее отбора

При отборе проб необходимо соблюдать технику безопасности. На крупных водотоках и водоемах следует соблюдать навигационные правила и правила эксплуатации используемого судна. Постоянные точки контроля следует выбирать в местах, которые были бы доступны в любое время года и где отсутствуют какие-либо опасности. На очистных сооружениях отбор проб осуществляют в специально предназначенных местах, маркированных и освещаемых в темное время суток. Отбор проб воды производят бригадой, состоящей минимум из двух человек. Перед работой бригада должна быть проинструктирована 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 (от +2 °С до +4 °С). Хранить пробы следует в темноте не более 24 часов после отбора. О продолжительности хранения проб воды делают отметку в протоколе биотестирования. В исключительных случаях, при отсутствии летучих органических веществ, допускается глубокая заморозка проб (–18 °С) и их хранение до двух недель, а при стабильности проб до 2 месяцев (следует помнить, что после размораживания токсичность воды может измениться). В случае предполагаемого замораживания пробы при ее отборе не следует заполнять сосуды полностью, чтобы избежать их разрыва. Если пробы требуется отстаивать, центрифугировать или фильтровать, то эти процедуры должны предшествовать замораживанию.

7.2.1.2 Подготовка проб воды к биотестированию

Перед биотестированием предварительно охлажденные или замороженные пробы доводят до температуры в диапазоне от +18 °С до +25 °С.

При наличии в сточных водах крупнодисперсных включений (с диаметром частиц более 3,5 мкм) их следует удалить отстаиванием в течение 30–120 мин, фильтрованием или центрифугированием. Взвешенные частицы в исследуемой на токсичность воде могут искажать результаты биотестирования, так как снижают освещенность для водорослей. Фильтрация пробы производится через наиболее пористые обеззоленные фильтры «белая лента» (недопустимо использовать «синюю ленту», так как она задерживает 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».

Центрифугирование является предпочтительным методом удаления взвешенных частиц перед биотестированием. Воду, предназначенную для исследования на токсичность, центрифугируют 10 мин при скорости вращения от 4000 до 4500 обор/мин.

Активный хлор, используемый для обеззараживания питьевых и сточных вод, является токсическим веществом, поэтому перед биотестированием питьевых вод, а также при необходимости анализа 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.

Проба воды, подлежащая биотестированию, должна иметь pH 7,0–8,5, если pH пробы выходит за указанные пределы, требуется нейтрализация pH в исследуемой пробе до оптимальных значений, при которых обеспечивается нормальная жизнедеятельность используемых биотестов. Подкисление осуществляют раствором HCl с массовой долей 10 %, подщелачивание — раствором NaOH с массовой долей 10 %. После нейтрализации пробы аэрируют 10–20 мин для стабилизации pH. Регулирование pH не должно вызывать химической реакции с веществами, присутствующими в пробе (выпадение осадка, комплексообразование), и не должно более чем на 5 % изменять концентрацию исследуемых вод. pH выше 9,0 маскирует токсичность также как и жесткость.

При необходимости уточнения результатов биотестирования по влиянию фактора pH на усиление токсичности вод, когда установлено, что их pH выходит за пределы диапазона 7,0–8,5, эксперимент расширяют и определяют токсичность исследуемых проб после нейтрализации и без нейтрализации.

В протоколе биотестирования указывают токсичность проб после нейтрализации и без нейтрализации. *Заключение о токсичности вод дается по пробе без нейтрализации.* Данные о токсичности проб после нейтрализации указываются в протоколе для принятия правильного природоохранного решения по снижению неблагоприятного воздействия вод на объекты окружающей среды, применяя методы нейтрализации водородного показателя.

При исследовании грунтовых или других вод с содержанием железа двухвалентного более 1 мг/дм^3 (валовая форма) необходимо предварительное отстаивание проб не менее 24 часов при температуре от +2 °С до +4 °С. Затем осветленную воду сифонируют и анализируют на токсичность.

7.2.1.3 Приготовление разбавлений исследуемых вод для биотестирования

Для приготовления разбавлений исследуемых вод используют дистиллированную воду, которая должна иметь pH 7,0–7,5. Предварительно, перед приготовлением необходимых разбавлений вод для исследований, 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 готовят 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 другая посуда закрывают предварительно подобранными пробками и снабжают несмываемыми водой надписями о приготовленной концентрации исследуемых вод. Приготовление растворов, разбавлений, проведение биотестирования выполняют при комнатной температуре. Температуру дистиллированной и исследуемой воды доводят до комнатной температуры перед приготовлением разбавлений.

Для приготовления разбавлений берут определенные, отмеренные мерной посудой, объемы исследуемой и разбавляющей (дистиллированной) воды. В качестве мерной посуды для объемов меньше 10 $см^3$ используют мерные пипетки. Для объемов более 10 $см^3$ — мерные цилиндры. Поверхностные, пресные, грунтовые и сточные воды с неизвестной степенью токсичности анализируют в 100 %, 30 %, 9 %, 3 % и 1 %-ной концентрациях. Сточные и очищенные сточные воды (отобранные до системы хлорирования), если не известны их токсические свойства, тестируют в первичном испытании в большем наборе разведений при 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,12 %, 1,5 %, 0,78 %-ной концентрации. Если предварительно известно, что сточные воды обладают гипертоксичностью, а также, если это можно предположить по данным гидрохимического исследования, исследуемые концентрации уменьшают и составляют 10 %, 3 %, 0,3 %, 0,1 %. Возможен произвольный выбор разведений. Чем выше предполагаемая токсичность, тем большей должна быть кратность разбавлений исходной пробы.

После получения предварительных результатов биотестирования при необходимости готовят и анализируют дополнительные разбавления.

Если при первичном токсикологическом испытании разбавление сточных вод делают в стандартных (предложенных выше) концентрациях или наугад, то при повторном исследовании разбавления готовят, исходя из полученных результатов проведенных исследований.

В процессе приготовления разбавлений пробы тщательно перемешивают.

При выполнении практического биотестирования используют в основном два (наиболее важных) показателя, характеризующих содержание исследуемой воды в разбавленном (дистиллированной водой) растворе: во сколько раз исследуемая вода разбавлена и каково ее процентное содержание в разбавлении. Данные показатели заносят в рабочий журнал.

П р и м е р. Как путем разбавления получить x %-ный раствор сточной воды и рассчитать, во сколько раз она разбавлена. Величину x будем измерять в долях. Тогда единица соответствует раствору, в котором x — доля исследуемой воды и $(1 - x)$ — доля чистой дистиллированной воды. Дистиллированной воды в растворе больше, чем сточной в $\frac{1-x}{x}$ раз. Степе-

нью разбавления называют значение $\frac{1}{x}$. Если x измеряют в процентах, то это значение записывают в виде:

$$\frac{100\,\%}{x\,\%}.$$

Итак, если к одной доле сточной воды добавляют $(100 - x)$ % долей дистиллированной воды, то получают x %-ный раствор. Например, для получения 5 %-ного раствора сточных вод вычисляют степень разбавления следующим образом:

$$\frac{100\,\%}{5\,\%} = 20$$

и получают, что 1 доля сточных вод и 19 долей дистиллированной воды составят при смешении 5 %-ный раствор сточных вод, т.е. 5 %-ный раствор сточных вод получат при их 20-кратном разбавлении.

7.2.2 Отбор, транспортировка, хранение и подготовка проб почвы

7.2.2.1 Отбор, транспортировка, хранение проб

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, транспортировка 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 транспортировка 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 должна быть определена протяженность и топография зон загрязнения. Участки для отбора проб почвы должны хорошо отражать 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 10 × 10 м (100 м^2), которая располагается в типичном для данной территории месте. На каждые 20 га площади закладывают не менее одной пробной площадки. При обследовании площади менее 0,5 га размер площадки уменьшают, и он составляет 5 × 5 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 используют 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 (см. Приложение А). На банку, контейнер наклеивают несмываемую водой этикетку с указанием номера пробы, места, даты и времени ее отбора

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

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

Пробы почв анализируют 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.

7.2.2.2 ***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 должны являться обязательной частью сопроводительной документации к пробам, направленным на токсикологический анализ.

Перед биотестированием пробы просеивают сквозь сито с размером ячей 1 мм и 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 2-х 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. Пробы, предназначенные для исследования на токсичность почв, не подвергают тепловой обработке, поэтому гигроскопическую влажность почвы определяют в отдельном образце.

Пробу с массой приблизительно 400 г 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-сухой по формуле (1)

$$\Delta M_{\text{возд сух}} = \frac{\Delta M_{\text{абс сух}}}{K_{\text{ср}}}, \quad (1)$$

где $\Delta M_{\text{абс сух}}$ — масса абсолютно-сухого образца, г; $\Delta M_{\text{возд сух}}$ — масса воздушно-сухого образца почвы, г; $K_{\text{ср}}$ — коэффициент пересчета массы воздушно-сухой пробы на массу абсолютно-сухой (среднее расчетное значение из трех измерений).

Определение массовой доли почвы в воздушно-сухой пробе:

1 Взвешивают три пустых высушенных бюкса с крышками и фиксируют их массы (M_{0i}), затем взвешивают эти же бюксы с навесками воздушно-сухой пробы (около 1 г) и фиксируют их массы ($M_{\text{возд сух }i}$).

2 Устанавливают открытые бюксы с воздушно-сухими пробами в сушильный шкаф. Пробы выдерживают в сушильном шкафу в течение 3 ч при температуре от 105 °С до 115 °С. Закрывают бюксы притертыми крышками, переносят их в эксикатор и выдерживают там до полного остывания (около 40 мин). Взвешивают бюксы с навесками абсолютно-сухой пробы и фиксируют их массы ($M_{\text{абс сух }i}$). После взвешивания пробы почвы повторно высушивают в течение 2 ч, затем охлаждают в эксикаторе и снова взвешивают. После первого и второго высушивания допустимое расхождение в массе не должно превышать 0,005 г. В противном случае высушивание повторяют. Результат взвешивания для всех экспериментов записывают с точностью 0,001 г.

3 Рассчитывают значение коэффициента пересчета K_i для каждого эксперимента по формуле (2)

$$K_i = \frac{M_{\text{абс сух }i} - M_{0i}}{M_{\text{возд сух }i} - M_{0i}}, \quad (2)$$

где K_i — коэффициент пересчета в i-том измерении; $M_{\text{абс сух }i}$ — масса бюксы с абсолютно-сухим образцом в i-м измерении, г; $M_{\text{возд сух }i}$ — масса бюксы с воздушно-сухим образцом в i-м измерении, г; M_{0i} — масса пустой бюксы в i-м измерении, г.

4 Так как по результатам измерений получено три значения коэффициента, производят расчет его среднего значения ($K_{\text{ср}}$) по формуле (3)

$$K_{\text{ср}} = \frac{K_1 + K_2 + K_3}{3}. \quad (3)$$

Далее среди трех величин K_i рассчитывают размах (R) полученных значений с учетом максимального ($K_{\max}$) и минимального ($K_{\min}$) значения по формуле (4)

$$R = \frac{K_{max} - K_{min}}{K_{ср}} \cdot 100\% . \quad (4)$$

Если полученное значение $R > 10$ %, то эксперимент повторяют, устранив причину неудовлетворительных результатов.

Водную вытяжку из почвы для биотестирования готовят в соотношении: 1 часть почвы (с учетом гигроскопической влажности) и 4 части дистиллированной воды (pH 7,0–7,5). 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 взвешивают (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 дистиллированной воды.

Далее на аппарате для встряхивания жидкости полученную смесь в течение 2-х часов встряхивают, после чего отстаивают в течение 30 мин. Надосадочную жидкость сифонируют, а затем профильтровывают 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 фильтруют до прозрачного раствора.

В процессе подготовки проб водной вытяжки к биотестированию для их осветления и освобождения от взвешенных частиц можно применять центрифугирование (10 минут при 4000–4500 обор/мин).

При повышенной мутности водной вытяжки из почв (гумусированные, дерново-подзолистые, торфяные, лесная подстилка и др. почвы) допускается отстаивание в холодильнике до 5 суток.

В тех случаях, если влагоемкость исследуемой почвы настолько высока, что невозможно выполнить последующий процесс сифонирования данной вытяжки, допускается готовить вытяжку в соотношении 1 : 10 (почва : вода), что указывается в протоколе биотестирования.

Затем жидкость над осадком сифонируют. Вытяжка из почв должна иметь величину pH в диапазоне 7,0–8,5. При необходимости вытяжку перед серийным разбавлением предварительно нейтрализуют. После нейтрализации пробы аэрируют 10–20 мин для стабилизации pH. Непосредственно перед началом биотестирования пробы доводят до температуры в диапазоне от +18 °С до +25 °С. Если в вытяжке из почв содержится углекислый газ, вытяжку кипятят 30 мин для его удаления, затем охлаждают и используют для разведения и биотестирования.

Приготовление разведений водной вытяжки для биотестирования проводят по п. 7.2.1.3.

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

7.2.3.1 Отбор, транспортировка и хранение проб

Методы отбора, транспортировки, хранения, подготовки к выполнению биотестирования должны обеспечить 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 разделяют 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, должны быть документально оформлены и маркированы. Необходимыми сопроводительными документами являются бланк описания осадка и протокол пробоотбора (см. Приложение А).

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 частота отбора проб определяется 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, необходимо проводить на предприятии не реже 4 раз в год (1 раз в квартал).

Для определения морфологического состава ТБО и отбора проб необходимо:

– выявить компоненты, входящие в состав ТБО;

– определить процентное содержание каждого компонента в общей массе отхода;

– произвести отбор проб для лабораторных исследований (проба должна полностью отражать морфологический состав образующегося отхода).

При установлении морфологического состава отхода ТБО следует учитывать компоненты, образующиеся в результате потребления, но не являющиеся специфичными для данного предприятия (не образующиеся в результате технологического процесса).

Определение морфологического состава ТБО, образующегося в результате деятельности предприятия, можно осуществлять по двум схемам:

а) в случаях, если предприятие имеет собственный контейнер для ТБО, определение морфологического состава пробы производится непосредственно из контейнера. Для этого контейнер с отходами переворачивают, высыпают содержимое и производят сортировку на отдельные компоненты;

Примерный перечень компонентов, входящих в ТБО: бумага, картон; пищевые отходы; дерево; пластмасса; стекло; черный металл; цветной металл; текстиль; кожа, резина; камни, штукатурка; прочее.

б) в случаях, если предприятие не имеет собственного контейнера для ТБО, можно организовать временный (не менее 5 рабочих дней) раздельный сбор отхода по отдельным компонентам или накопление общей массы отхода с последующей сортировкой. В первом случае необходимо предусмотреть для каждого компонента индивидуальное место (тару) сбора и хранения.

Массу каждого выявленного компонента взвешивают на весах, а затем определяют его процентное содержание в общей массе отхода.

Процедуру определения морфологического состава проводят работники предприятия. Данные о морфологическом составе отхода и этапы его определения оформляют на фирменном бланке предприятия с указанием лиц, проводивших сортировку отхода, и подписью ответственного исполнителя

Отбор проб для лабораторных исследований проводят следующим образом: из массы каждого компонента отхода отбирают некоторый объем всевозможных составляющих этого компонента, упаковывают в отдельный пакет и снабжают этикеткой.

Объем проб каждого компонента должен быть не менее 500 г, если его доля в общей массе отхода составляет более 30 %; не менее 300 г, если доля компонента составляет более 10 %; не менее 100 г, если доля компонента в общей массе отхода — менее 10 %.

Пробы должны поступить в лабораторию с сопроводительной документацией не более чем через 12 ч после отбора.

Отбор проб ПО может осуществляться 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 объединенную пробу отбирают 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 5 × 5 м. Из единичных проб, отобранных с одной пробной площадки, приготавливают одну объединенную промежуточную пробу. Смесь объединенных промежуточных проб образует объединенную пробу, направляемую на исследование.

Осуществляя глубинный пробоотбор, руководствуются ориентировочной глубиной хранилища и количеством одноразово загружаемых в него отходов.

Смешанный пробоотбор заключается в отборе проб из кучи. При отборе проб из кучи отбирают 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 объединенная проба отхода образуется 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 может выражаться 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 может быть охарактеризовано 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).

Объединенная проба отхода может быть приготовлена из *N*-го количества единичных проб или из N-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.

Объединенная проба отхода может быть приготовлена по принципу средневзвешенности или среднепропорциональности.

По принципу средневзвешенности объединенная проба отхода образуется 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 объединенная проба приготавливается из одинаковых объемов отходов. Наиболее часто таким образом готовят пробу полужидких отходов и паст с высокой влажностью (> 70 %).

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 рассчитывается исходя из степени изменчивости нормируемых компонентов в данных отходах и заданной погрешности их определения.

Чтобы отобрать представительную единичную пробу, необходимо знать объем разового образования отходов на предприятии. Например, если сбразуется 10 мешков отходов, то достаточно отобрать пробу в одном мешке, произвольно его выбрав из 10 мешков, если отходы однородны. Но иногда требуется подтвердить эту однородность и отобрать пробу из нескольких мешков одной партии, т.е. для подтверждения представительности выбранных точек пробоотбора производят выборочное обследование точек пробоотбора.

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 проходят вручную и механизированным способом.

Для ручной проходки скважин применяют буры и щупы различных конструкций.

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 отбираемого 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, хранятся в холодильнике (в банках с притертой или плотно закрытой крышкой) не более одной недели.

Пробы отходов, поступившие в лабораторию на исследование, должны быть документально оформлены и маркированы. Необходимыми сопроводительными документами являются бланк описания отхода и протокол пробоотбора (см. Приложение А). Маркировка отходов осуществляется в произвольной форме, но с обязательным занесением обозначений в лабораторный журнал.

При проведении отбора проб отходов должны соблюдаться 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 должны соблюдаться меры, исключающие запыление окружающей среды и правила захоронения (складирования) материала пробы, полученного в результате сокращения объединенной пробы.

7.2.3.2 ***Приготовление водной вытяжки из осадков сточных вод, отходов***

Водную вытяжку из осадков сточных вод и отходов готовят из соотношения твердая фаза : жидкость равного 1 : 10. В качестве жидкости используют дистиллированную воду с pH 7,0–7,5.

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, как указано в п. 7.2.2.2. При плохом высыхании отхода экспозицию высушивания увеличивают 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 используют для биотестирования и определения влажности.

Влажность осадков и отходов определяют по п. 7.2.2.2. Измеренную характеристику влажности используют для расчета массы воздушно-сухой пробы, предназначенной для приготовления водной вытяжки. Обычно используют (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, рассчитывают 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. 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. Массу шлама, эквивалентную (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 п. 7.2.2.2. При плохом высушивании экспозицию увеличивают 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 дистиллированной водой с pH 7,0–7,5 в пропорции 1:10.

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

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 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, то уменьшают количество дистиллированной воды. 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 слабо перемешивают на мешалке в течение 7–8 часов таким образом, чтобы твердое вещество находилось во взвешенном состоянии. Недопустимо измельчение частиц отходов или осадков при перемешивании. Используют большую лопасть механической мешалки или магнитной мешалки, 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. Для осветления водной вытяжки и освобождения ее от взвешенных частиц

можно применять центрифугирование (10 мин при 4000–4500 обор/мин). В исключительных случаях, при повышенной мутности водной вытяжки из отхода после фильтрации допускается 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, допускается хранение экстракта в холодильнике не более 48 ч при температуре 4 °С.

Перед биотестированием измеряют pH, температуру в полученном экстракте.

Водная вытяжка из осадков сточных вод или отходов должна иметь pH = 7,0–8,5. При необходимости пробы нейтрализуют. После нейтрализации пробы аэрируют 10–20 мин для стабилизации pH.

Регулирование pH не должно вызывать химической реакции с веществами, присутствующими в пробе (выпадение осадка, комплексообразование), и не должно более чем на 5 % изменять концентрацию исследуемой пробы.

При необходимости уточнения результатов биотестирования по влиянию фактора pH на усиление токсичности водных вытяжек из отходов, когда установлено, что их pH выходит за пределы диапазона 7,0–8,5, эксперимент расширяют и определяют токсичность исследуемых проб после нейтрализации и без нейтрализации.

В протоколе биотестирования указывают токсичность проб после нейтрализации и без нейтрализации. Заключение о токсичности водной вытяжки из отходов дается (и класс опасности отхода устанавливается) по пробе водной вытяжки без нейтрализации. Данные о токсичности проб после нейтрализации указываются в протоколе для принятия решения о необходимости нейтрализации отхода при его размещении в объектах окружающей среды и возможности перевода отхода в менее опасный класс после его нейтрализации, если для данного вида отхода это технически осуществимо.

Перед биотестированием температуру пробы доводят до температуры в диапазоне от +18 °С до +25 °С. Если в вытяжке из осадка, отхода содержится углекислый газ, вытяжку кипятят 30 мин для его удаления, затем охлаждают и используют для разведения и биотестирования.

Данные регистрируют в журнале. Приготовление разведений водной вытяжки для биотестирования проводят по п. 7.2.1.3.

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

При выявлении разной токсичности в пробах жидких и твердых осадков, отобранных с одной иловой площадки, решение принимается по пробе, вызывающей проявление максимальной токсичности

7.2.4 Проведение теста на биохимическую разлагаемость осадков сточных вод, отходов

Для решения вопроса о возможности отнесения установленного класса опасности осадка или отхода к менее опасному — водную вытяжку осадка или отхода исследуют на устойчивость к биохимической деградации. Тест на устойчивость к биохимической деградации проводят в аэробных условиях в контакте вытяжки из осадка или отхода с активным илом в течение 28 дней.

До начала испытаний в вытяжке из осадка или отхода измеряют ХПК в натуральной и фильтрованной пробах и $БПК_5$.

Тест проводят в 4–5-литровом сосуде с крышкой, в которой имеется отверстие для шланга подачи воздуха. В сосуд наливают 2,5 $дм^3$ водной вытяжки. Если в исследуемой вытяжке из осадков сточных вод, отходов содержание $БПК_5$ составляет менее 40 $мг/дм^3$, то в раствор добавляют однократно глюкозу в количестве 5–40 $мг/дм^3$ для обеспечения активного ила питательными веществами.

Активный ил отбирают на сооружениях биологической очистки с аэротенками в объеме (100–300) $см^3$. В лаборатории его отстаивают не менее двух часов (или центрифугируют), после чего надиловую жидкость сливают при помощи сифона.

В сосуд, в котором проводят тест на биохимическую разлагаемость, добавляют сгущенный активный ил в расчете 1,0 $г/дм^3$ по сухому весу.

Сосуд с приготовленной смесью ила и исследуемой водной вытяжкой инкубируют в темноте или при слабом дневном свете при температуре (22±3) °С. Смесь аэрируют с помощью аквариумного аэратора так, чтобы перемешивание было удовлетворительным, но не избыточным (взвешенные частицы не адсорбируются на дне и стенках сосуда, жидкость не выплескивается).

Через 28 суток инкубации смесь водной вытяжки с илом отстаивают в течение 2-х часов, сливают сифоном и в надиловой воде определяют ХПК в натуральной и фильтрованной пробе.

Эксперимент на биоразлагаемость отхода может быть завершен в любой день до 28 суток, если при этом выполняется условие снижения ХПК в натуральной и фильтрованной пробе на 60 и 70 % соответственно.

Отход признают биохимически разлагаемым, если по истечении 28 дней или раньше ХПК в натуральной пробе снижается не менее, чем на 60 %, ХПК в фильтрованной пробе снижается не менее, чем на 70 % (Европейское соглашение .., 1998). При выполнении данного условия класс опасности отхода повышается на единицу (например, с 3 на 4 класс).

Всю грязную посуду после проведения теста подвергают стерилизации кипячением в течение 1 часа или автоклавированию.

8 ПРОЦЕДУРА БИОТЕСТИРОВАНИЯ И ВЫПОЛНЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ

Для биотестирования используют альгологически чистую культуру водорослей *Scenedesmus quadricauda* или *Selenastrum capricornutum*, находящуюся в экспоненциальной стадии роста (через 3–5 суток после пересева). Для поддержания экспоненциальной стадии роста водорослей пересев осуществляют регулярно 1 раз в 7 суток (см. Приложение Б).

Перед началом эксперимента исходную культуру водорослей (3–5-суточную) сгущают до образования суспензии путем центрифугирования (5 мин при 6 тыс. об/мин) или фильтрования через мембранный фильтр и определяют исходную численность клеток суспензии водорослей в камере Горяева, чтобы рассчитать необходимый объем добавки суспензии (в контрольные и испытуемые колбы), обеспечивающий нужную плотность клеток при посеве в начале эксперимента.

После пересева и тщательного перемешивания водоросли в контрольных и испытуемых колбах перед началом эксперимента подсчитывают в камере Горяева независимо от того, какой метод измерений (прямой счет или флуоресцентный) будет в дальнейшем использоваться.

Численность водорослей в начале биотестирования должна составлять в каждой колбе 25–35 тыс. кл./см^3. Повторный счет водорослей в камере Горяева осуществляют только при использовании метода прямого счета водорослей после установленного времени экспозиции (72 часа) контрольных и исследуемых вод в колбах в люминостате. При использовании метода измерений уровня флуоресценции хлорофилла, после экспозиции в люминостате (72 часа) счет в камере Горяева не осуществляют, а измеряют уровень флуоресценции на приборе.

Для определения численности клеток водорослей камеру Горяева предварительно накрывают покровным стеклом и притирают его до образования радужных колец интерференции. После чего перемешивают в колбе водоросли и затем пипеткой наносят по одной капле произвольного объема на верхний и нижний края покровного стекла. После того, как камера Горяева заполнится водорослевой культурой, ее помещают под объектив микроскопа и подсчитывают число клеток в 25 больших квадратах, а затем по формуле (5) определяют количество клеток водорослей в см^3 раствора:

$$X = n\,10^4 \qquad (5)$$

где X — количество клеток в см^3; n — число клеток в 25 больших квадратах; 10^4 — переводной коэффициент пересчета кубических мм в кубические см.

В каждой колбе подсчитывают клетки водорослей как минимум в двух камерах с последующим вычислением среднего арифметического.

В случае малого количества водорослей в пробе (например, в контрольных и испытуемых колбах в начале эксперимента) численность клеток водорослей подсчитывается по всему полю сетки камеры Горяева. Тогда количество клеток водорослей в см^3 раствора определяется по формуле (6):

$$X = n\,10^3 \qquad (6)$$

где X — количество клеток в см^3; n — число клеток по всему полю камеры; 10^3 — переводной коэффициент пересчета кубических мм в кубические см.

8.1 ***Процедура биотестирования и выполнение измерений при использовании прямого счета численности клеток водорослей***

При определении острой токсичности проб сточных и очищенных сточных, поверхностных пресных, грунтовых, питьевых вод, а также водных вытяжек из почвы, осадков сточных вод и отходов в стеклянные плоскодонные колбы вместимостью 250 см^3 наливают по 100 см^3 контрольной (дистиллированной с pH 7,0–7,5) и исследуемой воды. Повторность двукратная. Затем в каждую колбу пипеткой стерильно, над пламенем горелки добавляют по 0,1 см^3 каждого концентрированного раствора реактивов в порядке расположения в таблице 6 (см. Приложение Б). Содержимое колб перемешивают. После чего во все колбы добавляют равные объемы суспензии водорослей, с учетом того, чтобы численность клеток в них составила 25–35 тыс. кл./см^3. Например, при исходной численности культуры водорослей 2,5 млн. кл./см^3 во все колбы следует добавить по 1 см^3 водорослевой суспензии, тогда численность клеток в каждой колбе составит 25 тыс. кл./см^3. Допускается использование колб емкостью 100 см^3 и 50 см^3, при этом объем контрольной и испытуемой проб составит соответственно 50 см^3 и 25 см^3, объем каждого концентрированного раствора реактивов составит соответственно по 0,05 см^3 и 0,025 см^3, объем водорослевой суспензии — соответственно 0,5 см^3 и 0,25 см^3, численность клеток в каждой колбе составит 25 тыс. клеток в см^3. После внесения водорослей колбы вновь перемешивают.

Сразу после перемешивания производят подсчет клеток водорослей в камере Горяева во всех контрольных и испытуемых пробах. В каждой колбе дважды подсчитывают численность клеток. Содержимое колб вновь перемешивают, закрывают стерильными ватно-марлевыми пробками или стерильными колпачками из алюминиевой фольги и устанавливают в люминостат. Температуру в люминостате поддерживают от +22 °С до +25 °С, освещенность (3000–10000) лк, световой период — 24 часа. Клетки водорослей поддерживают во взвешенном состоянии в колбах путем встряхивания 1–2 раза в сутки или перемешивания на мешалке, чтобы улучшить газообмен и сократить колебания водородного показателя за счет выделяющегося углекислого газа водорослями в исследуемых растворах.

Далее подсчет численности клеток в камере Горяева в контрольных и опытных колбах проводят через 72 часа от начала биотестирования. При необходимости подсчет численности клеток можно проводить через 24, 48, 72 часа. После 72-часовой экспозиции биотестирование заканчивают. Данные регистрируются в рабочем журнале (см. Приложение В, Д)

Результаты эксперимента признают в том случае, если численность водорослей в контроле увеличилась в 10 и более раз за 72 часа экспозиции. Это увеличение соответствует скорости роста 0,7 $сут^{-1}$. В нормальных экспериментальных условиях могут быть достигнуты скорости роста от 1,5 до 1,9 $сут^{-1}$ (ISO 8692). Изменение pH в конце эксперимента не должно составлять более 1,5.

8.2 ***Процедура биотестирования и выполнение измерений по изменению уровня флуоресценции хлорофилла***

После приготовления контрольных и тестируемых проб, добавления растворов реактивов, суспензии водорослей и перемешивания содержимого колб (по п. 8.1) водоросли подсчитывают в камере Горяева, чтобы убедиться, что их численность составляет не менее 25 и не более 35 тыс. кл./$см^3$. После этого содержимое колб тщательно перемешивают и закрывают их ватно-марлевыми пробками или алюминиевой фольгой и помещают на 30 минут в люминостат. Температуру в люминостате поддерживают от +22 °С до +25 °С, освещенность 3000–10000 лк, световой период 24 часа. После 30-минутной экспозиции в контрольных колбах на приборе измеряют уровень флуоресценции. Измерение уровня флуоресценции на приборе «Флюорат-02-3» можно проводить как в режиме непрерывных измерений, так и в режиме измерительного тракта.

1) Измерение в режиме непрерывных измерений. Прибор устанавливают в режим непрерывных измерений, при этом на приборе фиксируется число усредненных измерений $N = 8$. Контрольные колбы поочередно выдерживают 3 минуты в темноте. Выдержанную в темноте колбу перемешивают легким круговым движением влево и вправо, ее содержимое выливают в 2 кюветы из кварцевого стекла. Кюветы поочередно помещают в камеру прибора. С момента появления на индикаторном табло первых цифр в течение 30 секунд наблюдают за показаниями прибора, фиксируют максимальное значение уровня флуоресценции, которое затем записывают в журнал. Содержимое кювет выливают обратно в соответствующую контрольную колбу. Далее для каждой колбы рассчитывают среднее значение уровня флуоресценции по двум измерениям.

2) Измерение в режиме измерительного тракта. Прибор «Флюорат-02-3» устанавливают в режим измерительного тракта, фиксируют число усредненных измерений $N = 8$ В других модификациях прибора число усредненных измерений N = const, выставлено производителем.

Контрольные колбы поочередно выдерживают 3 минуты в темноте. Выдержанную в темноте колбу перемешивают легким круговым движением влево и вправо, ее содержимое выливают в 2 кюветы из кварцевого стекла. Кюветы поочередно помещают в камеру прибора. В каждой кювете проводится по 10 измерений. Из 10 измерений выбирают максимальное значение уровня флуоресценции. Максимальные значения записывают в журнал. Содержимое кювет выливают обратно в соответствующую контрольную колбу. Далее для каждой колбы рассчитывают среднее значение уровня флуоресценции по двум измерениям.

После измерения колбы с контрольными пробами переносят обратно в люминостат.

Замеры уровня флуоресценции в контрольных колбах проводят через 30 мин и 72 часа от начала биотестирования. Замеры уровня флуоресценции в исследуемых колбах проводят в конце эксперимента (через 72 часа) от начала биотестирования. При необходимости дополнительные замеры проводят через 24, 48, 72 часа. После 72-часовой экспозиции биотестирование заканчивают. Данные регистрируют в рабочем журнале (см. Приложения Г, Д).

Результаты эксперимента признают в том случае, если уровень флуоресценции в контроле возрос в 10 и более раз за 72 часа экспозиции. Увеличение pH в конце эксперимента не должно составлять более 1,5.

Эксперимент можно закончить раньше при условии, если уровень флуоресценции в контроле увеличился за это время в 10 и более раз. Увеличение pH в конце эксперимента не должно составлять более 1,5.

9 ОБРАБОТКА, ОЦЕНКА И ОФОРМЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

9.1 *Обработка результатов биотестирования*

9.1.1 При определении острой токсичности питьевых, сточных, поверхностных, грунтовых вод, а также водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов и их разбавлений устанавливают:

– острую токсичность или ингибирующую концентрацию отдельных веществ ($ИК_{50-72}$), ингибирующую кратность разбавления ($ИКР_{50-72}$) вод, водных вытяжек, вызывающую 50 %-ное подавление флюоресценции хлорофилла и 50 %-ное снижение численности клеток водорослей за 72-часовую экспозицию;

– безвредную концентрацию отдельных веществ ($БК_{20-72}$), кратность разбавления вод, водных вытяжек, вызывающую не более чем 20 %-ное подавление уровня флуоресценции хлорофилла и не более чем 20 %-ное снижение численности клеток водорослей за 72-часовую экспозицию — $БКР_{20-72}$.

9.1.2 Об угнетении водорослей в опыте по сравнению с контролем судят по снижению уровня флуоресценции водорослей или снижению численности клеток водорослей через 72 часа от начала биотестирования.

При определении острого токсического действия для каждого разведения по результатам двух параллельных определений вычисляют среднее значение уровня флуоресценции или среднее значение численности клеток по формуле (7)

$$\overline{X} \approx \frac{\sum X_i}{n} \qquad (7)$$

где $\overline{X}$ — среднее значение тест-параметра (уровня флуоресценции или численности клеток); X_i — значения тест-параметра в i-том параллельном определении; n — количество параллельных определений.

Рассчитывают относительное (в %) изменение уровня флуоресценции или численности клеток водорослей для каждого разведения по сравнению с контролем (I):

$$I = \frac{\overline{X}_к - \overline{X}_0}{\overline{X}_к} \cdot 100\%, \qquad (8)$$

где $\overline{X}_к$ — среднее значение тест-параметра в контроле, $\overline{X}_0$ — среднее значение тест-параметра в опыте.

Характеристики степени токсичности испытуемой воды приведены в таблице 2.

Таблица 2 — Характеристики степени токсичности испытуемой воды

Отклонение от контроля, %	Оценка
до 20	нетоксичная
от 50 и более	острая токсичность

9.1.3 Стимуляцию (противоположная угнетению реакция тест-объектов на воздействие токсикантов) до уровня 30 % по сравнению с контролем считают как нетоксичное действие испытуемой воды на тест-объект. При стимуляции более 30 % вода, водная вытяжка из почв, отходов признается токсичной, если в хроническом опыте на дафниях или цериодафниях выявляется увеличение плодовитости рачков более чем на 30 % или гибель рачков на 20 % и более в тестируемой воде, вытяжке по сравнению с контролем.

Если экспериментально не удалось получить точного значения концентрации вещества, кратности разбавления, вызывающей 50 %-ное ингибирование водорослей за 72-часовую экспозицию, то для получения точного значения $ИКР_{50\text{-}72}$ без выполнения дополнительных экспериментов, используют графический или неграфический метод определения.

9.2 *Методы определения острой токсичности с использованием пробит-анализа и расчетного метода*

9.2.1 Графический метод определения $ИК_{50\text{-}72}$, $ИКР_{50\text{-}72}$ с использованием пробит-анализа

Чтобы получить на графике линейную зависимость, используют пробит-анализ. По оси абсцисс откладывают значения логарифмов процентных концентраций исследуемых вод По оси ординат откладывают пробиты от значений процента ингибирования тест-параметра — процентного отклонения от контроля. Значения пробитов находят по таблице 3

Значения десятичных логарифмов концентраций ($\lg C$) исследуемых вод определяются по калькулятору. Значения процентных отклонений от контроля (степени ингибирования тест-параметра) получают экспериментально.

Пробитное значение 4,16 соответствует 20 %-му ингибированию тест-параметра. Пробитное значение 5 соответствует 50 %-му ингибированию тест-параметра (см. таблицу 3).

Результаты выполненных экспериментов по установлению острого токсического действия заносятся в рабочий журнал (см. Приложение Г) и на основании этих данных составляется таблица 4.

Таблица 3 — Значения пробитов для экспериментально устанавливаемой степени ингибирования тест-параметра от 0 до 99 %

Гибель, %	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	–	2,67	2,95	3,12	3,25	3,35	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,83	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,4	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33

Таблица 4 — Результаты выполненных экспериментов по установлению острого токсического действия

Концентрация исследуемой воды, %, C	Десятичный логарифм концентрации, lg$C$	Ингибирование тест-параметра, процентное отклонение от контроля, %	Значения пробитов для % ингибирования
6,25	0,796	13	3,83
12,50	1,097	29	4,45
25,00	1,398	45	4,87
50,00	1,699	61	5,28
100,00	2,000	77	5,74

Используя данные таблицы 4, строят график (рисунок 1).

На графике параллельно оси логарифмов концентраций (lg$C$) проводят две прямые: одна из точки, соответствующей пробитному значению 4,16, вторая — пробитному значению 5,0. Из точек пересечения прямых с графиком зависимости пробитного значения ингибирования тест-параметра от логарифма концентраций опускают перпендикуляры на ось логарифма концентраций и получают значения логарифма концентраций исследуемых вод, водных вытяжек, соответствующих $БКР_{20\text{-}72}$ и $ИКР_{50\text{-}72}$. Далее логарифмы процентных концентраций переводят в процентные концентрации.

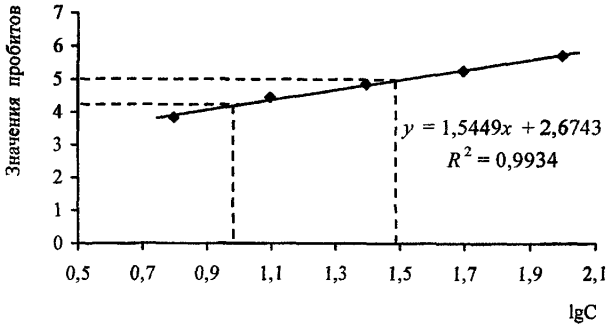

Рисунок 1 — Линейная зависимость пробитного значения ингибирования тест-параметров от логарифма концентрации исследуемых вод

Для нахождения точных значений логарифмов концентраций, соответствующих 20 % и 50 %-ному ингибированию тест-параметра, график строят в программе Excel (пакет Microsoft Office), указывая в опции «тип диаграммы» параметр «точечная». Уравнение прямой, описывающее взаимосвязь между этими величинами, получают следующим образом: в параметре «диаграмма» выбирают команду «добавить линию тренда». В опции «линия тренда», «тип» выбирают «линейная», в опции «линия тренда», «параметры» помечают галочкой окно «уравнение на диаграмме».

Из полученного уравнения линии тренда получают значения величин $x = \lg C$, соответствующие y (значениям пробитов).

Тогда пробитное значение 4,16 соответствует логарифму концентрации исследуемой воды 0,96, вызывающей ингибирование 20 % тест-параметра за 72 часа экспозиции. Логарифм концентрации переводится в процентную концентрацию: $\lg C_{20\text{-}72} = 0{,}96$ соответствует процентной концентрации 9,12 %.

Пробитное значение 5,0 соответствует логарифму концентрации исследуемой воды 1,49, вызывающей ингибирование 50 % тест-параметра за 72 часа экспозиции. Логарифм концентрации переводят в процентную концентрацию: $\lg C_{50\text{-}72} = 1{,}49$ соответствует процентной концентрации 30,90 %.

Таким образом, устанавливают, что 30,90 %-ная концентрация исследуемой воды, или разбавление в 3,24 раза (100 %/30,90 %), вызывает 50 % ингибирование тест-параметра за 72 часа, $ИКР_{50\text{-}72} = 3{,}24$. Установлено также, что 9,12 % концентрация исследуемой воды (разбавление в 10,96 раз) безвредна для тест-объекта, $БКР_{20\text{-}72} = 10{,}96$.

9.2.2 Неграфический метод определения $ИК_{50\text{-}72}$, $ИКР_{50\text{-}72}$

Десятичный логарифм концентрации исследуемых сточных вод ($\lg C$) обозначим x, а численные значения пробитов угнетения темпа роста водорослей — y. Учитывают только те значения $\lg C$, при которых наблюдается подавление темпа роста водорослей. В результате испытаний получено n пар чисел

$$(x_1 y_1), (x_2, y_2), \ldots (x_n y_n), \qquad (9)$$

по которым определяются линейная зависимость:

$$y = kx + b. \tag{10}$$

Численные значения коэффициентов k и b вычисляют по формулам

$$k = \frac{n\sum_{i=1}^{n} x_i y_i - \sum_{i=1}^{n} x_i \cdot \sum_{i=1}^{n} y_i}{n\sum_{i=1}^{n} x_i^2 - (\sum_{i=1}^{n} x_i)^2}, \tag{11}$$

$$b = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i^2 \cdot \sum_{i=1}^{n} y_i - \sum_{i=1}^{n} x_i \cdot \sum_{i=1}^{n} x_i y_i}{n\sum_{i=1}^{n} x_i^2 - (\sum_{i=1}^{n} x_i)^2}. \tag{12}$$

Для вычисления k и b используют расчетную таблицу 5. В первом столбце таблицы помещают отобранные значения x_i (десятичный логарифм концентрации $\lg C$), в третьем — соответствующие им значения пробитов y_i, четвертый и пятый столбцы рассчитывают:

Вычисляют искомые параметры k и b, по формулам (11), (12) при $n = 4$:

$$k = \frac{4 \cdot 32{,}141 - 6{,}194 \cdot 20{,}34}{4 \cdot 10{,}044 - (6{,}194)^2} = 1{,}424,$$

$$b = \frac{10{,}044 \cdot 20{,}34 - 6{,}194 \cdot 32{,}141}{4 \cdot 10{,}044 - (6{,}194)^2} = 2{,}880.$$

Таблица 5 — Расчетная таблица

x_i	Значения ингибирования тест-параметра, %	y_i	x_i^2	$x_i y_i$
1,097	29	4,45	1,203	4,882
1,398	45	4,87	1,954	6,808
1,699	61	5,28	2,887	8,971
2,000	77	5,74	4,000	11,480
$\sum_{i=1}^{4} x_i = 6{,}194$		$\sum_{i=1}^{4} y_i = 20{,}34$	$\sum_{i=1}^{4} x_i^2 = 10{,}044$	$\sum_{i=1}^{4} x_i y_i = 32{,}141$

Искомое уравнение регрессии по формуле (10): $y = 1{,}424x + 2{,}880$.

Определяют значение x, соответствующее 50 %-му ингибированию водорослей ($y = 5$), по формуле

$$x = \frac{y - b}{k}, \tag{13}$$

$$x = \frac{5 - 2{,}88}{1{,}424} = 1{,}49.$$

Полученный логарифм процентной концентрации (lgC_{50} = 1,49) исследуемой воды переводят в процентную концентрацию 30,9 %, или разведение в 3,24 раза ($ИКР_{50\text{-}72}$ = 3,24).

Все полученные значения, расчеты и график по результатам острого эксперимента вносят в рабочий журнал, и полученные значения острой токсичности вносят в протокол биотестирования (см. Приложение Е).

В протоколе указывается:

при установленном снижении уровня флуоресценции хлорофилла или численности клеток водорослей не более чем на 20 % (по сравнению с контролем за 72 часа экспозиции) об отсутствии острой токсичности в исследуемой пробе;

при установленном снижении уровня флуоресценции хлорофилла или снижении численности клеток водорослей на 50 % и более (по сравнению с контролем за 72 часа экспозиции) об острой токсичности в исследуемой пробе;

при установленном снижении уровня флуоресценции хлорофилла или снижении численности клеток водорослей в диапазоне между 20 % и 50 % (по сравнению с контролем за 72 часа экспозиции) об отсутствии острой токсичности в исследуемой пробе. Однако, дополнительно в протоколе указывается, что эти пробы нельзя признать безвредными по показателю токсичность.

10 КОНТРОЛЬ ПРИЕМЛЕМОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ

10.1 За результат измерений принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений, если выполняется условие приемлемости

$$\frac{2 \cdot |x_1 - x_2| \cdot 100}{(x_1 + x_2)} \le r, \qquad (14)$$

где x_1, x_2 — результаты параллельных определений по уровню флуоресценции (численности клеток) у.е. (тыс. кл./см^3); r — значение предела повторяемости (таблица 1).

10.2 Если условие, приведенное в формуле (14), не выполняется, получают еще один результат в полном соответствии с данной методикой. За результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов трех определений, если выполняется условие (15).

$$\frac{3 \cdot |x_{max} - x_{min}| \cdot 100}{(x_1 + x_2 + x_3)} \le CR_{0,95}, \qquad (15)$$

где x_{max}, x_{min} — максимальное и минимальное значения из полученных трех результатов параллельных определений по уровню флуоресценции (численности клеток) у.е. (тыс. кл./см^3), $CR_{0,95}$ (n) — значение критического диапазона для уровня вероятности P = 0,95 и n — результатов определений.

$$CR_{0,95} = f(n) \cdot \sigma_r. \qquad (16)$$

Для n = 3

$$CR_{0,95} = 3{,}3\,\sigma_r,$$

где σ_r — показатель повторяемости, % (таблица 1)

Если условие, приведенное в формуле (15), не выполняется, выясняют причины превышения критического диапазона, устраняют их и повторяют выполнение измерений в соответствии с требованиями методики.

10.3 Результат анализа в документах, предусматривающих его использование, представляют в виде:

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

где x — среднее арифметическое значение результатов n определений, признанных приемлемыми (п.п. 10.1–10.2), тыс. кл./см^3; $\pm\delta$ — 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. Проверку стабильности осуществляют с применением контрольных карт Шухарта.

Периодичность контроля стабильности результатов выполнения 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, при превышении предела действия или регулярном превышении предела предупреждения, выясняют причины этих отклонений, в том числе проводят смену реактивов, проверяют работу оператора.

12 ПРЕДУПРЕДИТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Предупредительный контроль качества оценки токсичности воды проводят один раз в квартал по определению чувствительности используемых тест-организмов к модельному «эталонному» токсиканту — двухромовокислому калию ($K_2Cr_2O_7$). Диапазон концентраций модельного токсиканта, при действии которого в течение 72 часов происходит 50 %-ное подавление уровня флуоресценции хлорофилла или 50 %-ное снижение клеток водорослей, составляет от 0,2 до 2,0 мг/дм^3.

Удовлетворительные результаты, полученные при проверке диапазона реагирования тест-организмов на модельный токсикант, не обеспечивают гарантии адекватного реагирования водорослей на другие токсиканты и тем более их смеси, однако регулярно проводимая проверка позволяет выявить ошибки при приготовлении исследуемых смесей и растворов, нарушения, допускаемые в процессе культивирования организмов и условиях проведения опытов

Процедура определения диапазона реагирования тест-организмов на модельный токсикант

Определяют ту концентрацию модельного токсиканта, при которой за 72 часа происходит 50 %-ное подавление уровня флуоресценции хлорофилла или 50 %-ное снижение численности клеток водорослей. Для этого на основании стандарт-титра методом последовательных разбавлений готовят серии растворов двухромовокислого калия в дистиллированной воде с массовыми концентрациями 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 мг/дм^3. В растворы добавляют питательные среды и водоросли по п. 8.1.

Испытания на водорослях проводят в соответствии с прописью методики в двух параллельных определениях.

Если концентрация двухромовокислого калия, вызвавшая острую токсичность, находится в интервале 0,2–2,0 мг/дм^3, то чувствительность культуры водорослей соответствует необходимым требованиям, она может быть использована в биотестировании.

Если концентрация модельного токсиканта, вызвавшая острую токсичность, не находится в данном интервале, то проверяют точность приготовления исследуемых растворов, условия проведения опытов. Если ошибки при проведении опытов исключают, то меняют культуру тест-организмов, т.е. берут новую культуру водорослей в учреждениях, где она имеется или осуществляют пересев водорослей с соблюдением условий стерильности.

Библиография

ГОСТ 24481-80 Вода питьевая. Отбор проб.

ГОСТ 17.1.5.04-81 Охрана природы. Гидросфера. Приборы и устройства для отбора, первичной обработки и хранения проб природных вод. Общие технические условия.

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 12071-84 Грунты. Отбор, упаковка, транспортирование и хранение образцов.

ГОСТ 5180-84 Грунты. Методы лабораторного определения физических характеристик.

ГОСТ 2517-85 Нефть и нефтепродукты. Методы отбора проб.

ГОСТ 17.4.3.03-85 (СТ СЭВ 4469-84) Почвы. Общие требования к методам определения загрязняющих веществ.

ГОСТ 26423-85 – ГОСТ 26428-85 Почвы. Методы определения катионно-анионного состава водной вытяжки.

ГОСТ 17.1.5.05-85 Охрана природы. Гидросфера. Общие требования к отбору проб поверхностных и морских вод, льда и атмосферных осадков.

ГОСТ 27753.1-88 Грунты тепличные Методы отбора проб.

ГОСТ 28168-89 Почвы. Отбор проб.

ГОСТ Р 8.563-96 ГСИ Методики выполнения измерений.

ГОСТ Р 50.2.008-2001 ГСОЕИ Методики количественного химического анализа Содержание и порядок проведения метрологической экспертизы.

МУ 2.1.7.730-99. Гигиеническая оценка качества почвы населенных мест. — Минздрав России, М., 1999.

НВН 33-5.3.01-85 «Инструкция по отбору проб для анализа сточных вод».

СТ СЭВ 4710-84. Воды подземные. Общие требования к отбору проб

Аринушкина Е.В. Руководство по химическому анализу почв. — М.: Изд-во МГУ, 1970. — 488 с.

Веселовский В.А., Веселова Т.В., Дмитриева А.Г. Метод биотестирования по определению флуоресценции водорослей с помощью портативного флуориметра // Методы биотестирования вод: Сб. ст. / АН СССР. — Черноголовка, 1988. — С. 26–29.

Европейское соглашение о международной дорожной перевозке опасных грузов — ДОПОГ и протокол о его подписании. Женева, 30 сентября 1997 г. — ООН, Нью-Йорк, Женева, 1998.

Плохинский Н.А. Математические методы в биологии Учебно-методическое пособие. — М.: Изд-во МГУ, 1978. — 340 с.

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Shlamm und Sedimente (Gruppe S). Bestommung der Eluebarkeit mit Wasser DIN 38414-S4.

ISO 3954: 1977. Powders for powders metallurgical purposes. — Sampling.

ISO 6206: 1979. Chemical products for industrial use. — Sampling. — Vocabulary. — Bilingual edition.

ISO 8213: 1986. Chemical products for industrial use. — Sampling techniques — Solid chemical products in the form of particles varying from powders to course lumps.

ISO 5884: 1987. Aircraft-fluid systems and components. — Methods for system sampling and measuring the solid particle contamination of hydraulic fluids.

ISO 2067: 1988. Granulated cork. — Sampling.

ISO 8692: 1989. Water quality. Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*.

ISO 8633· 1992. Solid fertilizers. — Simple sampling methods for small lots.

ISO 5667-10· 1992. Water quality. — Sampling. — Part 10: Guidance on sampling of waste waters

ISO 10381: 1993. Soil quality. — Sampling. — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

ISO 11464: 1994. Soil analysis. — Pretreatment of samples for physic-chemical analysis.

EPA. 1986. Test methods for evaluating solid waste. 3rd ed., SW-846, Volume II, Part III, Chhapter 9. Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, DC.

EPA. 1993. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 4th ed., EPA/600/4-90/027F. Ed. by C.I .Weber, Environmental Monitoring System Laboratory, Office of Research and Development, EPA, Cincinnati, OH.

Finney, D.J. 1971. Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge University Press, London.

ON L 105 Sampling of forest soil.

ON L 1054 Sampling of cultivated soils. — Terms, definitions and general considerations

ON L 1055 Sampling of arable soils.

ON M 6258 Water analysis. — Guidance on sampling technique. — Sampling of waste water.

ON M 6291 Analysis of sewage sludge: sampling.

ON S 2000 Waste. — Terms and definitions.

ON S 2072 Classification of waste by leaching test.

ON S 2111 Sampling of waste.

Zar, J.H. 1984. Biostatistical Analysis 2nd ed., Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.

Приложение А

(рекомендуемое)

Полное наименование лаборатории, адрес, телефон, аттестат аккредитации (№, дата выдачи, срок действия), логотип (если имеется)

Форма протокола отбора проб

(заполняется только в том случае, если отбор проб и КТА выполняют разные лаборатории)

Таблица А.1 — Протокол отбора проб № _____

1	Дата и время отбора			
2	Цель пробоотбора			
3	Место отбора (наименование точки отбора)			
4	Объект отбираемой пробы	Вода, почва, осадки сточных вод, отходы (нужное подчеркнуть)		
5	Вид пробы	Разовая, среднесуточная, точечная, объединенная (нужное подчеркнуть)		
6	Вид отбора пробы	Параллельный, последовательный (нужное подчеркнуть)		
7	Используемый пробоотборник	Стеклянный, эмалированный, нержавеющая сталь, бур почвенный, щуп, лопата (нужное подчеркнуть)		
8	Номер на емкости			
9	Материал емкости	полиэтилен, стекло, нержавеющая сталь (нужное подчеркнуть)		
10	Наличие и способ опломбирования емкости			
11	Проба отобрана для проведения анализа	На токсичность методом биотестирования, теста на биохимическую разлагаемость (нужное подчеркнуть)		
12	Условия отбора	t, °С	pH	O_2
Примечание				

Отбор проб проведен в присутствии _____

подпись расшифровка подписи

Исполнитель _____

подпись расшифровка подписи

Приложение Б
(обязательное)

Выращивание культуры водорослей

Водоросли выращивают в люминостате. Температура в люминостате должна поддерживаться в пределах от +22 °С до +25 °С, освещенность — 3000–10000 лк, световой период — 24 ч. В течение суток культуру водорослей 1–2 раза встряхивают.

Таблица Б.1 — Состав питательных сред для культивирования водорослей

Компоненты среды	Концентрация			
	Успенского № 1		Прата	
	в среде для культивирования, г/дм^3	концентрированные растворы для приготовления среды, г/100 см^3	в среде для культивирования, г/дм^3	концентрированные растворы для приготовления среды, г/100 см^3
KNO_3	0,025	2,5	0,10	10,0
$MgSO_4\ 7H_2O$	0,025	2,5	0,01	1,0
$Ca(NO_3)_2{\cdot}4H_2O$	0,144	14,4	–	
$K_2HPO_4{\cdot}3H_2O$	–	–	0,01	1,0
$KH_2PO_4\ 3H_2O$	0,025	2,5		
K_2CO_3	0,0345	3,45	–	
$FeCl_3{\cdot}6H_2O$	–		0,001	0,1

Питательные растворы готовят на дистиллированной воде (допускается приготовление питательной среды для водорослей на бидистиллированной воде, при этом нельзя пользоваться аппаратами с ионообменными смолами).

Чтобы избежать образования осадка в питательной среде, каждый ее компонент предварительно готовят в концентрированном виде отдельно в 100 см^3 дистиллированной воды. Полученные растворы концентрированных солей кипятят каждый по 30 мин, охлаждают, после чего их используют для приготовления среды в течение месяца при условии хранения при температуре от +2 °С до +4 °С. Каждый сосуд с питательными веществами должен быть подписан с указанием состава, концентрации, времени приготовления и плотно закрыт притертой пробкой во избежание высыхания и концентрирования.

Для приготовления среды для культивирования водорослей добавляют по 1 см^3 каждого концентрированного раствора (кроме солей железа) в колбу вместимостью 1 дм^3, заполненную до половины дистиллированной водой (pH 7,0–7,5), поочередно, в последовательности как указано в таблице Б.1, доводят до метки 1 дм^3 дистиллированной водой, тщательно перемешивают, кипятят раствор 30 мин, охлаждают и после этого добавляют 1 см^3 концентрированного раствора соли железа и отдельно приготовленные растворы микроэлементов*.

---

* Растворы А и В готовят отдельно, раствор А (H_3BO_3 — 2,86 г/дм^3, $MnCl_2{\cdot}4H_2O$ — 1,81 г/дм^3, $ZnSO_4\ 7H_2O$ — 0,222 г/дм^3) и раствор В (MoO_3 — 17,64 мг/дм^3, NH_4VO_3 — 22,96 мг/дм^3). Затем отдельно стерилизуют каждый раствор 30 мин кипячением, охлаждают, плотно закрывают притертой пробкой и хранят в холодильнике при температуре от +2 до +4 °С до трех месяцев

Растворы солей железа или микроэлементов можно добавлять во все среды независимо от того, указано это в прописи их состава или нет.

Для предупреждения выпадения в осадок железа и других микроэлементов дополнительно во все среды добавляют хелатирующее вещество, образующее с ионами металлов устойчивые комплексные соединения в форме, доступной для питания водорослей. С этой целью используют стерильный раствор этилендиаминтетрауксусной кислоты динатриевой соли (трилон Б) с массовой концентрацией 0,037 г/дм^3. Раствор готовят в 100 см^3 дистиллированной воды совместно с солью железа. Соли железа и трилона Б отдельно растворяют в 30 см^3 дистиллированной воды, смешивают, доводят дистиллированной водой до 100 см^3, кипятят 30 мин, охлаждают и добавляют в охлажденную среду для культивирования водорослей 1 см^3 на 1 дм^3 среды.

Например, для приготовления среды Успенского растворяют 2,5 г KNO_3; 2,5 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 14,4 г $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 2,5 г $KH_2PO_4 \cdot 3H_2O$ и 3,45 г K_2CO_3 в 100 см^3 дистиллированной воды в отдельных склянках каждой соли. Отдельно растворяют 3,7 г трилона Б и 0,3 г $Fe_2(SO_4)_3$ в 100 см^3 дистиллированной воды.

Все шесть склянок кипятят 10–15 мин, охлаждают и, соблюдая условия стерильности, (над пламенем горелки или спиртовки) переносят в колбу на 1 дм^3 по 1 см^3 из каждой склянки (кроме раствора железа и трилона Б) в 0,5 дм^3 дистиллированной воды, смешивают, доводят до метки 1 дм^3 дистиллированной водой. Полученную смесь кипятят 30 мин, охлаждают и добавляют после охлаждения 1 см^3 смеси солей железа и трилона Б и по 1 см^3 каждого раствора микроэлементов (А и В) на 1 дм^3 среды. Готовые среды не хранят Таким образом приготовленная среда Успенского используется для культивирования водорослей

Приложение В (рекомендуемое)

Регистрация результатов измерений (прямой счет водорослей)

Таблица В.1 — Пример записи в рабочем журнале результатов измерений методом прямого счета в камере Горяева

№ пробы	Время от начала биотестирования, сутки	Кратность разведения исследуемых вод и водных вытяжек, раз	№ повторностей	Численность водорослей, тыс кл /см^3	Ср значение 2-х измерений, тыс кл./см^3	Фактическая повторяемость для 2-х повторностей, %	Ср значение по 2-м повторностям, тыс кл /см^3	Значение погрешности измерений, тыс кл /см^3	Конечный результат измерений, тыс кл /см^3	Процентное отклонение от контроля, %
Контроль	4		1	409 439	424	**	469	*** ±150	469±150	
			2	497 531	514	19,2				
1	4	1	1	149 161	155					
			2	117 125	121	24,6	138	±44	138±44	71
		2	1	179 185	182					
			2	234 256	245	29,5	214	±69	214±69	54
		4	1	296 324	310					
			2	244 274	259	18	285	±91	285±91	39
		8	1	384 399	392					
			2	318 309	314	22	353	±113	353±113	25
		16	1	432 468	450					
			2	398 418	408	9,8	429	±137	429±137	9

* плотность водорослей в первый день эксперимента составляла в каждой колбе 27 тыс кл /см^3

** вычислять по формуле (17) п 10 1, результат сравнивать с r, %, п 2, таблица 1

*** вычислять по формуле п 10 3, $\bar{x} \pm 0{,}01\ \delta\ \bar{x}$, δ — границы относительной погрешности измерений, % (п 2, таблица 1)

Приложение Г (рекомендуемое)

Регистрация результатов измерений (флуоресценция водорослей)

Таблица Г.1 — Пример записи в рабочем журнале результатов измерений: методом регистрации уровня флуоресценции хлорофилла водорослей

№ пробы	Время от начала биотестирования, сутки	Кратность разведения вод, водных вытяжек, раз	№ повторностей	Показание прибора, у. е.	Ср. значение 2-х измерений, у. е.	Фактическая повторяемость для 2-х повторностей, %	Ср. значение по 2-м повторностям, у. е.	Значение погрешности измерений, у.е.	Конечный результат измерений, у.е.	Процентное отклонение от контроля, %
Контроль	4		1	3,149 3,119	3,134	**		***		
			2	2,859 2,829	2,844	9,7	2,989	±0,598	2,989±0,598	
1	4	1	1	0,625 0,645	0,635					
			2	0,773 0,754	0,764	18,4	0,700	±0,14	0,700±0,14	77
		2	1	1,098 1,105	1,102					
			2	1,204 1,217	1,211	9,4	1,157	±0,231	1,157±0,231	61
		4	1	1,573 1,575	1,574					
			2	1,722 1,715	1,719	8,8	1,647	±0,329	1,647±0,329	45
		8	1	2,073 2,069	2,071					
			2	2,204 2,192	2,198	6,0	2,135	±0,427	2,135 ±0,427	29
		16	1	2,754 2,732	2,743					
			2	2,485 2,485	2,485	9,9	2,614	±0,523	2,614±0,523	13

* плотность водорослей в первый день эксперимента составляла в каждой колбе 27 тыс кл /см^3, показания прибора — 0,285

** вычислять по формуле (17) п 10 1, результат сравнивать с r, %, п 2, табл 1

*** вычислять по формуле п 10 3, $\bar{x} \pm 0{,}01\ \delta \cdot \bar{x}$, δ — границы относительной погрешности измерений, % (п 2, таблица 1)

Приложение Д
(рекомендуемое)

Ведение рабочего журнала

Таблица Д.1 — Форма записи результатов биотестирования в рабочем журнале

1	Дата, время отбора проб	10^{20} ч, 5 августа 1997 г
2	Наименование объекта	Очистные сооружения завода «Импульс»
3	Место отбора	После вторичных отстойников
4	Вид отобранной пробы (поверхностная пресная, грунтовая, питьевая, сточная, очищенная сточная, водная вытяжка из почв, донных отложений, отходов)	Очищенная сточная вода
5	Время хранения пробы от отбора до начала биотестирования	4 ч
6	Используемые тест-организмы, возраст	*Scenedesmus quadricauda*, 3–5 суточная культура
7	Место биотестирования и условия	Люминостат, t = +22–+25 °С, освещенность 6000 лк круглосуточно
8	Питательная среда для выращивания водорослей	среда Прата, pH = 7,0–8,5
9	Продолжительность биотестирования	72 часа
10	Метод биотестирования (измерение уровня флуоресценции водорослей, прямой счет клеток водорослей в камере Горяева)	Измерение уровня флуоресценции хлорофилла водорослей на приборе «Флюорат 02-3»
11	Повторности для каждой концентрации	две
12	Исследуемые концентрации сточных вод	100; 50; 25; 12,5; 6,25 %
13	Соответствующая степень разбавления сточных вод по формуле $x = \frac{100\,\%}{\%\ \text{сточной воды в общем растворе}}$	Разбавления в 1 (без разбавления) 2, 4, 8, 16 раз
14	t °С, pH в исследуемой воде	Измерения перед началом биотестирования, все показатели в пределах оптимальных значений установленных в методике
15	Оценка качества вод и водных вытяжек: оказывает (не оказывает) острое токсическое действие на тест-объект	Оказывает острое токсическое действие на тест-объект
16	Кратность разбавления, вызывающая 50 % ингибирование тест-параметра в остром опыте, $ИКР_{50\text{-}96}$	30,9 %-ная концентрация сточных вод или кратность разбавления в 3,24 раза
17	Безвредное разбавление в остром опыте $БКР_{20\text{-}96}$	9,12 %-ная концентрация сточных вод или кратность разбавления в 10,96 раз

Приложение Е
(рекомендуемое)

Полное наименование лаборатории, адрес, телефон, аттестат аккредитации (№, дата выдачи, срок действия), логотип (если имеется)

допускается 1 лист приложения к протоколу

Протокол КТА (регистрационный номер, дата выдачи)

Наименование, адрес организации заказчика, природопользователя _____
Наименование объекта испытаний, цели исследования _____
Дата, время отбора проб _____
Место отбора проб _____
Условия отбора и транспортировки проб _____
Кем взяты пробы, реквизиты организации, выполнившей пробоотбор _____
Дата, время доставки проб в лабораторию _____
Используемые МВИ, НД для метода биотестирования и отбора проб _____
Характеристика условий испытаний и внешних факторов (O_2, pH, t °C, жесткость) в начале и при завершении биотестирования _____

Таблица В.1 — Результаты измерений с данными контроля приемлемости результатов измерений

№ пробы	Время хранения от отбора проб до начала биотестирования	Дата, время биотестирования	Тест-объект	Продолжительность наблюдения (ч, сут)	Оценка тестируемой пробы
			водоросли *Scenedesmus quadricauda*		Оказывает (не оказывает) острое (хроническое) токсическое действие. Безвредная кратность разбавления

Биотестирование проводил _____
подпись дата расшифровка подписи

Заключение _____

Начальник лаборатории или начальник организации, включающей лабораторию
_____
подпись дата расшифровка подписи

Форма протокола утверждена начальником лаборатории
_____
подпись дата расшифровка подписи

Указывается:
порядковый номер листа, общее количество листов

Приложение Ж
(рекомендуемое)

Характеристика тест-объекта

В качестве тест-объекта используют лабораторную культуру зеленых протококковых водорослей *Scenedesmus quadricauda (Turp) Breb.*:

Отдел	*Chlorophyta*
Класс	*Protococcophyceae*
Порядок	*Chlorococcales*
Семейство	*Scenedesmaceae*
Подсемейство	*Scenedesmoideae*
Род	*Scenedesmus Meyen*
Вид	*Scenedesmus quadricauda (Turp) Breb.*

Данный вид относится к ценобиальным организмам, у которых размножение происходит путем образования внутри материнской клетки 2-х, 4-х, реже 8- и 16-клеточных ценобиев. Ценобии — это смыкание одноклеточных водорослей в колонию из клеток одной и той же генерации, одно рядные в виде плоских пластинок. Клетки удлиненно — овальные, с закругленными концами, одноядерные Краевые клетки ценобия каждая с двумя длинными шипами на концах (рисунок Ж.1). Оболочка гладкая. Размеры клеток (7–43) × (2,5–16) мкм. Размножение автоспорами Иногда (особенно в условиях культивирования водорослей) вместо ценобиев образуются отдельные клетки. Вид широко распространен в разнообразных биотопах, главным образом в планктоне пресных водоемов, часто независимо от климата.

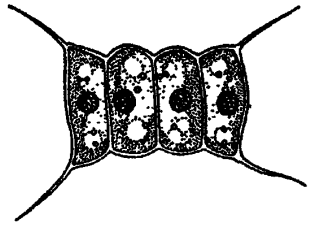

Рисунок Ж.1 — *Scenedesmus quadricauda (*Turp) Breb., 4-х клеточный ценобий

Приложение И

Свидетельство об аттестации МВИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
МЕТРОЛОГИЧЕСКОЙ СЛУЖБЫ
ВНИИМС

119361 Москва, Озёрная ул., д. 46 E-mail: gost.e-ecolog.ru Тел. (095) 437 9419
Факс: (095) 437 5666

СВИДЕТЕЛЬСТВО № 69-05

ОБ АТТЕСТАЦИИ МВИ

Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей

Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей, разработанная ООО "АКВАРОС", 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 17 октября 2005 года

Заместитель директора В. Н. Яншин

РЕЗУЛЬТАТЫ МЕТРОЛОГИЧЕСКОЙ АТТЕСТАЦИИ

Объект	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, %		Предел повторяемости, r, %, P=0,95, n=2	
	По уровню флуоресценции хлорофилла	По численности клеток водорослей	По уровню флуоресценции хлорофилла	По численности клеток водорослей	По уровню флуоресценции хлорофилла	По численности клеток водорослей	По уровню флуоресценции хлорофилла	По численности клеток водорослей
Вода питьевая, грунтовая, поверхностная пресная, сточная Водные вытяжки из почв, осадков сточных вод, отходов производства.	20	32	7	11	9	15	20	30

Начальник отдела Ш Р. Фаткудинова

gost.e-ecolog.ru