

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель Министра  
здравоохранения – Главный  
государственный санитарный  
врач Республики Беларусь

  
И.В. Гаевский

« 7 » июля 2016г.

Регистрационный № 044-1215

**МЕТОД ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
ТОКСИЧНОСТИ ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: Республиканское унитарное  
предприятие «Научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: к.м.н. Ильюкова И.И., к.м.н. Петрова С.Ю., к.б.н. Войтович  
А.М., Гомолко Т.Н., Борис О.А., Шевцова С.Н.

Минск 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель министра –  
Главный государственный  
санитарный врач  
Республики Беларусь

\_\_\_\_\_ И.В. Гаевский  
07.04.2016  
Регистрационный № 044-1215

**МЕТОД ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ  
ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: РУП «Научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: канд. мед. наук И.И. Ильюкова, канд. мед. наук С.Ю. Петрова, канд.  
биол. наук А.М. Войтович, Т.Н. Гомолко, О.А. Борис, С.Н. Шевцова,  
А.И. Докутович

Минск 2015

## ГЛАВА 1 НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая инструкция по применению (далее — инструкция) предназначена для определения степени опасности отходов производства (далее — отходов) и класса опасности опасных отходов по опасным свойствам отходов «токсичность» и «экоотоксичность» экспериментальными методами и не распространяется на инфицированные и потенциально инфицированные отходы, отходы, содержащие радиоактивные вещества и прочие отходы, обращение которых регулируется отдельными техническими нормативными правовыми актами.

2. Настоящая инструкция устанавливает подходы, схемы и методы определения степени опасности отходов и класса опасности опасных отходов и разработана в соответствии с положениями инструкции о порядке установления степени опасности отходов производства и класса опасности опасных отходов производства, утвержденной постановлением Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь, Министерства здравоохранения Республики Беларусь и Министерства по чрезвычайным ситуациям Республики Беларусь от 17.01.2008 № 3/13/2 «Об утверждении Инструкции о порядке установления степени опасности отходов производства и класса опасности опасных отходов производства».

3. Настоящая инструкция предназначена для врачей-гигиенистов, иных врачей-специалистов, иных специалистов организаций, подчиненных Министерству здравоохранения Республики Беларусь, определяющих степень опасности отходов и класс опасности опасных отходов по опасным свойствам «токсичность» и «экоотоксичность».

4. Настоящая инструкция вступает в силу 20.06.2016.

## ГЛАВА 2 ТЕРМИНЫ И ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В Инструкции используются следующие термины и определения:

- биодegradация — способность органического вещества подвергаться разложению под действием микроорганизмов;

- биодоступность — свойство химических веществ, характеризующее способность вступать в химические, биохимические и физико-химические взаимодействия (немеханическим путем) с биологическими объектами;

- биологически эффективные разведения — все значения  $R$ , при которых зарегистрирован фитоэффект;

- биохимическая потребность в кислороде (БПК) — количество кислорода, расходуемое для окисления находящихся в воде нестойких органических веществ в аэробных условиях при 20 °С в результате протекающих в воде биохимических процессов за определенный период времени ( $\text{мг O}_2/\text{дм}^3$ ). Обычно инкубацию проводят в течение 5 сут (БПК<sub>5</sub>) и 20 сут (БПК<sub>20</sub>);

- водно-миграционный показатель (ВМП) – отражает глубину миграции вредных веществ из отходов по профилю почвы и уровень их в фильтрате; рассчитывается отношением концентрации вредного вещества в фильтрате к предельно допустимой концентрации этого вещества в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования ( $ПДК_в$ );

- воздушно-миграционный показатель — отражает уровень миграции вредных летучих компонентов из отходов в воздух и рассчитывается отношением концентрации вредного вещества в воздухе к предельно допустимой максимально-разовой концентрации этого вещества в воздухе рабочей зоны ( $ПДК_{вр}$ );

- достоверный эффект воздействия – изменения в организме от воздействия токсиканта или его разведения, выходящие за пределы физиологических приспособительных реакций, или скрытая (временно компенсированная) патология;

- жизненный цикл популяции *Tetrahymena pyriformis* (TP) — время, за которое популяция проходит все этапы развития, начиная с лаг-фазы и до ее вступления в стационарное состояние на питательной среде определенного химического состава (пептон — 2%; глюкоза — 0,5%; натрий хлористый — 0,1%; дрожжевой экстракт — 0,1%; pH = 7,2) составляет 96 ч;

- зародышевая капсула — питательный матрикс с зародышем моллюска, окружен прозрачной оболочкой и находится внутри кладки;

- инокулят инфузорий — объем культуры *T.p.* в мл, содержащий известное (подсчитанное) число особей;

- кладка *Lymnaea stagnalis* — слизистый тяж, состоящий из множества (от 40 до 120) зародышевых капсул, покрытых слоистой полупрозрачной оболочкой;

- класс опасности — подразделение каждого вида опасности в зависимости от значений критериев опасности; например, вид опасности «токсичность» включает 4 класса опасности;

-  $K_{ад}$  — коэффициент адаптогенности — интегральный показатель, характеризующий адаптационный потенциал популяции *Tetrahymena pyriformis* W в хроническом эксперименте;

-  $K_{кумуляция}$  — коэффициент кумуляции, который рассчитывается путем отношения средней смертельной дозы в подостром эксперименте к средней смертельной дозе в остром эксперименте или путем отношения  $ED_{50}$ , определенной в стационарной фазе роста хронического эксперимента к  $ED_{50}$ , определенной в логарифмической фазе роста хронического эксперимента;

-  $K_{рез}$  — коэффициент резистентности, характеризующий мембранотоксические свойства отходов;

-  $LD_{16}$  — доза токсиканта в мг/мл культуры, вызывающая в остром и подостром экспериментах гибель 16% организмов;

-  $LD_{50}$  — доза токсиканта в мг/мл культуры, вызывающая в остром и подостром экспериментах гибель 50% организмов, средняя смертельная доза;

-  $LD_{50}/МНД$  — показатель опасности токсиканта, определяемый путем отношения средней смертельной дозы, определенной в остром эксперименте,

к максимальной недействующей дозе, определенной в хроническом эксперименте;

-  $LD_{84}$  — доза токсиканта в мг/мл культуры, вызывающая в остром и подостром экспериментах гибель 84% организмов;

- мантийная жидкость (гемолимфа) — внутренняя среда, выполняющая у беспозвоночных роль кроветворения и периферической крови;

- миграция веществ — перемещение веществ, входящих в отходы, в исследуемую среду (вода, воздух и т. п.);

- пороговое разведение ( $LimR$ ) — разведение экстракта из отходов, вызывающее фитозффект, равный 20%;

- микроядра — небольшие ДНК-содержащие образования, состоящие из ацентрических фрагментов хромосом или отставших на стадии анателофазы хромосом. На стадии телофазы эти фрагменты могут включаться в ядра дочерних клеток или образовывать одиночные либо множественные микроядра в цитоплазме;

- мутагены, индуцирующие замены пар оснований — агенты, вызывающие мутации типа замены пар оснований в молекуле ДНК. В данном тесте эти мутации могут происходить или в сайте исходной мутации, или в другом сайте хромосомы;

- мутагены, индуцирующие мутации типа сдвига рамки считывания — агенты, вызывающие вставку или делецию одной или нескольких пар оснований в молекуле ДНК;

- ориентировочный водно-миграционный показатель ( $ОВМП$ ) — отражает уровень миграции вредных веществ из отходов в сопредельную среду — воду; рассчитывается отношением концентрации вредного вещества в вытяжке к предельно допустимой концентрации этого вещества в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования ( $ПДК_в$ );

- пороговая концентрация — минимальная концентрация токсиканта в модельной среде тест-объекта, при которой регистрируется токсический эффект в остром эксперименте;

- среднеэффективное разведение ( $ER_{50}$ ) — разведение экстракта из отходов, вызывающее фитозффект, равный 50%;

- среднеэффективная концентрация ( $EC_{50}$ ) — концентрация токсиканта в среде, вызывающая в эксперименте на кладках *Lymnaea stagnalis* угнетение выклева на 50% по отношению к контролю;

- среднеэффективная концентрация ( $EC_{50}$ )/пороговая концентрация ( $EC_{15}$ ) — показатель опасности отходов, характеризующий зону острого действия, который определяется путем отношения среднеэффективной концентрации к пороговой концентрации, определенной в остром эксперименте;

- средняя летальная концентрация ( $LC_{50}$ ) — концентрация токсиканта в среде, которая вызывает гибель 50% группы подопытных организмов;

- тест-объект — организм, который используется при биотестировании (например, семена высших растений, кладка *Lymnaea stagnalis*);

- токсический эффект — нарушение жизнедеятельности тест-объекта под воздействием химического вещества;

- токсичность — способность отходов при попадании внутрь организма через органы дыхания, пищеварения, кожу или слизистые оболочки вызывать отрицательное воздействие на организм человека, серьезные острые или хронические заболевания, включая онкологические заболевания;

- угнетение генеративной функции *Tetrahymena pyriformis* W ( $ED_{16}$ ,  $ED_{50}$ ,  $ED_{84}$ ) — дозы токсиканта, вызывающие в хроническом эксперименте угнетение генеративной функции *Tetrahymena pyriformis* W на 16; 50; 84% по отношению к контролю;

- угнетение выклева — эмбриотоксический эффект, установленный в эксперименте на кладках *Lymnaea stagnalis*, характеризует степень снижения эффективности выклева в опыте относительно контроля;

- успешный выклев — процент выклюнувшихся особей из кладок *Lymnaea stagnalis* по отношению к исходному количеству зародышевых капсул;

- фитотоксический эффект (эффект торможения —  $E_T$ ) — ингибирование роста корней семян на 20% и более от контроля;

- химическая потребность в кислороде (ХПК) — показатель, характеризующий общее содержание в воде органических и неорганических веществ-восстановителей, реагирующих с сильными окислителями. Его выражают в единицах количества кислорода, расходуемого на окисление этих веществ, содержащихся в 1 дм<sup>3</sup> воды (мг O<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>);

- экотоксичность — способность отходов в случае попадания в окружающую среду оказывать немедленное или отложенное во времени неблагоприятное воздействие на окружающую среду посредством биоаккумуляции и (или) токсического влияния на биотические системы;

- экстракт — модельная среда, характеризующаяся концентрированным содержанием химических компонентов, мигрировавших из отходов;

- эмбриональное развитие — период развития эмбриона *Lymnaea stagnalis* в зародышевой капсуле от дробления до выклева;

- *Eisenia foetida* — тест-объект, представленный лабораторной популяцией дождевого червя вида *Eisenia foetida* (Savigny, 1826), полученной в результате регенерации и последующего размножения одной исходной особи;

- *Lymnaea stagnalis* — тест-объект, представленный лабораторной культурой пресноводного брюхоногого моллюска, является изолированной популяцией организмов, рост которой подчиняется общим закономерностям роста популяций;

-  $R$  — кратность разведения экстракта;

- *Tetrahymena pyriformis* W — тест-объект, представленный лабораторной культурой одноклеточных животных (ресничные инфузории), произрастающей в среде известного состава и являющейся изолированной популяцией организмов, рост которой подчиняется общим закономерностям роста популяций.

### ГЛАВА 3

## АЛГОРИТМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕПЕНИ И КЛАССА ОПАСНОСТИ ОТХОДОВ

1. Экспериментальное исследование степени и класса опасности отходов по параметрам экотоксичности включает:

- оценку фитотоксичности отходов;
- оценку токсичности отходов в тест-модели *Tetrahymena pyriformis* W;
- оценку эмбриотоксичности отходов в тест-модели *Lymnaea stagnalis*;
- оценку токсичности отходов в тест-модели *Eisenia foetida*.

2. Экспериментальное определение степени и класса опасности отходов по параметрам токсичности включает:

- оценку водно-миграционной опасности по ориентировочному водно-миграционному показателю;
- оценку воздушно-миграционной опасности по воздушно-миграционному показателю;
- оценку токсичности на теплокровных животных в остром эксперименте;
- оценку токсичности на теплокровных животных в подостром эксперименте;
- оценку генотоксичности в микроядерном тесте.

3. Алгоритм экспериментального определения степени и класса опасности отходов

3.1. Проведение анализа информации об отходах, включая данные о морфологическом и химическом составе и физико-химических свойствах отходов, характеристику технологического процесса образования отходов, сведения о сырье, компонентах, реактивах и материалах, используемых в отходообразующем технологическом процессе. Анализ информации проводится с целью определения программы испытаний отходов.

3.2. Составление программы испытаний

3.2.1. С целью идентификации химического состава отходов в программу испытаний включают определение валового содержания химических компонентов согласно п. 23 гл. 4 настоящей инструкции. Перечень определяемых индивидуальных химических показателей устанавливается на основе данных анализа информации об отходах.

3.2.2. Для оценки экотоксичности отходов в программу испытаний включают:

- определение фитотоксичности отходов, содержащих вредные водорастворимые компоненты;
- определение токсичности отходов методами биотестирования не менее чем на двух организмах в тест-моделях *Tetrahymena pyriformis* W, *Lymnaea stagnalis*, *Eisenia foetida*.

Определение биологической диссимилиации отходов, содержащих органические и биогенные вещества (кроме золошлаковых отходов), проводится согласно п. 11 гл. 4 настоящей инструкции, с целью решения вопроса о возможности отнесения отходов к классу меньшей опасности, чем

полученному в исследованиях на гидробионтах (*Tetrahymena pyriformis* W, *Lymnaea stagnalis*) и при определении фитотоксичности отходов.

3.2.3. Для оценки токсичности отходов программа испытаний составляется исходя из перечня оцениваемых параметров, приведенных в п. 2 гл. 3 настоящей инструкции.

3.3. Проведение испытаний отходов и оценка результатов выполняется в соответствии с главами настоящей инструкции.

3.4. Ранжирование отходов по степени и классам опасности

3.4.1. Степень и класс опасности отходов устанавливаются по лимитирующему показателю вредности, за который принимается показатель, выявивший наибольшую степень опасности отходов.

3.4.2. При оценке экотоксичности отходов необходимо учитывать, что отходы, состоящие из нестойких органических соединений, с коэффициентом биологической диссимиляции более 10, относятся к менее опасным на один класс, чем полученный при оценке фитотоксичности, токсичности на *Tetrahymena pyriformis* W, *Lymnaea stagnalis*, при условии, что токсическое действие отходов обусловлено органическими соединениями.

## ГЛАВА 4

### САНИТАРНО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ОТХОДОВ

1. Выполнение санитарно-химических исследований проводят в химико-аналитических лабораториях, оснащенных соответствующим аналитическим оборудованием, при следующих условиях:

- температура воздуха при выполнении измерений  $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ ;
- атмосферное давление 84–107 кПа;
- относительная влажность воздуха не более 80% при температуре  $25^\circ\text{C}$ ;
- напряжение питающей сети  $(230 \pm 10)$  В;
- частота переменного тока  $(50 \pm 0,4)$  Гц.

2. Пробоподготовка

2.1. Образец отходов подлежит гомогенизации. Гомогенизация может быть выполнена путем измельчения образцов ножницами, дробления, растирания в фарфоровой ступке, интенсивного встряхивания многофазных систем или перемешивания их с помощью мешалок (механических, магнитных). Гомогенизация должна обеспечивать выход в раствор всех, способных мигрировать, компонентов отхода при приготовлении вытяжки.

2.2. Параметры отходов производства, подверженные быстрым изменениям (например, рН, окисляемость, содержание аммиака, нитритов, нитратов, летучих веществ и др.), следует измерять сразу после доставки проб в лабораторию.

3. Определение валового содержания химических компонентов в отходах

3.1. При подготовке проб отходов с целью определения в них валового содержания термостабильных неорганических компонентов: натрия, калия, кальция, магния, железа, алюминия, хлоридов, сульфатов, фосфатов, боратов,

тяжелых металлов — используют методы сухого озоления или автоклавной пробоподготовки для освобождения от органической составляющей.

3.2. Для определения влажности отбирают аликвотную часть гомогенизированного образца и высушивают до постоянной массы при 105°C в сушильном шкафу или над серной кислотой в эксикаторе (в случае содержания в отходе веществ, легко разлагающихся при повышенной температуре) [1, 3]. Рассчитывают содержание влаги; полученный результат выражают в %.

3.3. При применении метода сухого озоления навеску отходов массой 10–50 г помещают в фарфоровую или кварцевую чашку и обжигают в муфельной печи при постепенном повышении температуры со скоростью 150°C/ч до 400–420°C, а затем при 400–420°C в течение 15 ч. Для растворения полученного минерализата используют концентрированные соляную (при определении натрия, калия, кальция, магния, железа, алюминия, кремния, сульфатов, фосфатов, боратов) или азотную (при определении тяжелых металлов и хлоридов) кислоты. Полученный минерализат заливают соответственно 20–50 см<sup>3</sup> концентрированной соляной или азотной кислоты и растворяют при подогревании на электроплитке. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу, чашку многократно смывают дистиллированной водой, перенося смывы в ту же мерную колбу. Объем раствора в колбе доводят до метки дистиллированной водой.

3.4. При использовании метода автоклавной пробоподготовки 2–3 г образца помещают в тефлоновый стакан прибора, прибавляют 8 см<sup>3</sup> концентрированной азотной кислоты, выдерживают в течение 12 ч при комнатной температуре, затем прибавляют 2 см<sup>3</sup> перекиси водорода (30%) и минерализуют с помощью комплекса автоклавной пробоподготовки. После минерализации раствор количественно переносят в мерную колбу, объем доводят до метки дистиллированной водой [4]. В полученном растворе определяют тяжелые металлы, хлориды, натрий, калий, кальций, магний и др.

Для количественного определения вышеназванных компонентов в полученных растворах используют утвержденные методы. Полученные результаты содержания химических веществ в отходах выражают в мг/кг исходного и/или сухого (высушенного при 105°C) образца отходов.

3.5. Для установления валового содержания термолабильных неорганических (например, нитраты) и хорошо растворимых в воде органических компонентов (например, формальдегид, спирты) используют водную вытяжку из отходов, полученную при удобном соотношении пробы отходов и растворителя в мг/дм<sup>3</sup>. Вытяжка выдерживается в течение 3 сут при комнатной температуре (20±5°C). При необходимости время экспозиции можно уменьшить.

Расчет содержания компонента X мг/кг исходного и сухого (высушенного при 105°C) образца отходов ведут по формуле:

$$X = \frac{C \times V \times 1000}{m},$$

где  $C$  — концентрация вещества в водной вытяжке из отходов, мг/дм<sup>3</sup>;

$V$  — объем модельного раствора (водной вытяжки), дм<sup>3</sup>;

$m$  — масса отходов, использованная для получения вытяжки, г.

3.6. Для определения валового содержания в отходах таких сложных органических соединений, как бенз(а)пирен и фенантрен проводят их экстракцию ацетонитрилом или гексаном трехкратно по 30 мин, из расчета 50 см<sup>3</sup> растворителя на 10 г образца (соотношение образец : растворитель равно 1:5). Объединенные экстракты упаривают досуха и сухой остаток растворяют в 0,5 см<sup>3</sup> гексана. По мере необходимости проводят очистку гексанового экстракта методом тонкослойной хроматографии.

Очищенный экстракт отходов упаривают досуха, остаток растворяют в 0,5 см<sup>3</sup> ацетонитрила и 10–20 мкл полученного раствора вводят в жидкостный хроматограф. Полученные результаты выражают в мг/кг исходного и/или сухого (высушенного при 105°C) образца отходов.

#### 4. Определение миграции компонентов отходов в водную среду

Для оценки водно-миграционной опасности отходов используется ориентировочный водно-миграционный показатель, который характеризует возможное отрицательное влияние отходов на условия жизни и здоровье человека в результате миграции его компонентов в грунтовые и поверхностные воды.

Ориентировочный водно-миграционный показатель определяется по результатам количественного химического анализа водного экстракта, отражающим содержание в отходах подвижных и водорастворимых форм элементов. В качестве растворителя используется дистиллированная вода.

Вытяжку из гомогенизированной пробы отходов готовят при соотношении отход : дистиллированная вода, равном 1:10 г/см<sup>3</sup>. Для получения вытяжки навеску отходов помещают в колбу, заливают дистиллированной водой, тщательно перемешивают, закрывают пробкой или чашкой Петри и выдерживают в термостате при 40°C в течение 24 ч или 3 сут при комнатной температуре (20±5°C) при периодическом перемешивании. Полученную вытяжку фильтруют через обеззоленный фильтр «белая лента» и подвергают анализу.

В случае невозможности приготовления вытяжки при заданных условиях отходы не исследуются по данному показателю.

Объем вытяжки регламентируется суммарным количеством ее аликвот для определения всех ингредиентов на уровне нижних пределов обнаружения.

Для определения индивидуальных органических и неорганических ингредиентов в полученной вытяжке используют известные методы, применяемые при анализе питьевых, поверхностных и сточных вод. Полученные результаты выражают в мг/л полученной вытяжки.

При оценке *ОВМП* рассчитывают кратность превышения концентрации компонента отходов *ПДК<sub>г</sub>*. Расчет производится по формуле:

$$ОВМП = \frac{C}{ПДК_g},$$

где *ОВМП* — ориентировочный водно-миграционный показатель;

*C* — концентрация индивидуального ингредиента в вытяжке, мг/л;

*ПДК<sub>г</sub>* — предельно допустимая концентрация химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования.

5. Для определения рН пипеткой отбирают аликвотную часть полученного фильтрата, переносят его в химический стакан и определяют рН с помощью рН-метра согласно [5].

6. Определение щелочности (кислотности) проводят в полученной водной вытяжке согласно [6, 7]. При величине водородного показателя вытяжки более 7,0 ведут титрование ее раствором соляной кислоты концентрации 0,1 моль/л (0,1 н) до рН 8,3 и 4,5, а при величине менее 7,0 — раствором гидроксида натрия в концентрации 0,1 моль/л (0,1 н) до рН 8,3. Результат определения выражают в ммоль/дм<sup>3</sup>.

7. Определение сухого остатка в полученной водной вытяжке проводят согласно [8, 9]. Результат определения выражают в мг/дм<sup>3</sup>.

8. Определение миграции компонентов отходов в фильтрат.

Изучение миграции ингредиентов отходов по профилю почвы проводится в расширенном эксперименте в опытах с учетом конкретных почвенно-климатических условий, специфики отходов и предполагаемого способа их утилизации. Для моделирования наиболее агравированных условий используется песчаный тип почвы. Показателем водно-миграционной опасности является глубина миграции компонентов отходов по профилю почвы и уровень содержания их в фильтрате (*ВМП*). Эффект миграции определяется по кратности превышения *ПДК<sub>г</sub>* для определяемых элементов.

Подготовку колонки и почвы перед осуществлением опыта проводят согласно методическим указаниям «Ускоренное гигиеническое регламентирование экзогенных химических веществ в почве», утвержденным 13.11.2000 (рег. № 127-0010).

Опыт проводят в стеклянных фильтрационных колонках (делительных воронках) вместимостью 1 дм<sup>3</sup> высотой 25 см, d = 8 см. Нижний конец колонки для дренажа заполняют битым стеклом. Между почвой и стеклом помещают слой марли и кружок фильтровальной бумаги. Под воронкой помещают колбу для сбора фильтрата, который анализируют на содержание изучаемого вещества. На высоту 20 см колонку заполняют высушенной до воздушно-сухого состояния просеянной через сито с диаметром ячеек 2 мм песчаной почвой. Влажность почвы доводят до 60% путем смачивания

дистиллированной водой. Взвешивают 250 см<sup>3</sup> отхода, что составляет 5 см высоты колонки, и помещают его на слой песчаной почвы.

В качестве контроля служит подготовленная аналогичным образом колонка, содержащая в верхней части вместо отхода 250 см<sup>3</sup> песчаной почвы.

Исходя из среднегодовой нормы осадков (600 мм/год) и диаметра (площади) колонки, рассчитывают норму полива почвы в колонке, которая равна 3-месячной норме осадков. При диаметре колонки 8 см она составляет 36 см<sup>3</sup> в сут. Полив производят дистиллированной водой в течение 1 мес. по 5 дней в неделю. Фильтрат собирают порциями, объем которых обеспечивает определение вещества на уровне чувствительности метода. Фильтрат собирают в течение 1 месяца.

Дистиллированную воду вливают в воронку и при полностью открытом кране собирают фильтрат в мерный цилиндр. Фильтрату дают полностью стечь из воронки. В каждой порции фильтрата определяют концентрацию вещества согласно утвержденным методикам (мг/дм<sup>3</sup>).

При оценке *ВМП* рассчитывают кратность превышения концентрации компонента отходов *ПДК<sub>в</sub>*. Расчет производится по формуле:

$$ВМП = \frac{С}{ПДК_{в}},$$

где *ВМП* — водно-миграционный показатель;

*С* — концентрация вещества в фильтрате из отходов, собранном в течение 1 мес., мг/дм<sup>3</sup>;

*ПДК<sub>в</sub>* — предельно допустимая концентрация химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования.

9. Определение миграции летучих компонентов отходов в воздух проводят для расчета воздушно-миграционного показателя.

Миграцию веществ из отходов в воздушную среду определяют с использованием эксикатора либо в микроклиматической камере, применяя методы определения этих веществ в воздухе рабочей зоны или атмосферы в зависимости от предполагаемой концентрации анализируемого вещества.

На дно эксикатора с пришлифованной крышкой и пробкой с двумя отводами вместимостью не менее 9 дм<sup>3</sup> в чашках Петри (кристаллизатор, лоток и т.д.) помещают испытуемый образец отходов. Соотношение навески отходов (г) к объему эксикатора (дм<sup>3</sup>) должно быть не менее 1:20, если удельный вес отхода выше 1 г/см<sup>3</sup>, и 1:10 — если ниже 1 г/см<sup>3</sup>.

Эксикатор плотно закрывают крышкой, герметизируют отводы в пробке и выдерживают в термостате при температуре 40°С в течение 24 ч. Отбор проб воздуха проводят с помощью электроаспиратора из эксикатора в газовые пипетки или поглотительные приборы, выбор которых зависит от природы изучаемых веществ и метода их анализа. Через эксикатор прокачивают объем воздуха, равный его трехкратному объему.

Определение миграции каждого вещества при одинаковых условиях следует проводить дважды. Одновременно с опытными устанавливают контрольные эксикаторы (без проб), выдерживаемые при указанных выше условиях эксперимента.

Воздух одного эксикатора анализируют на одно вещество.

Концентрацию вещества в отходах, способного мигрировать в воздушную среду ( $C$ , мг/кг), рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{d_{об}}{P},$$

где  $d_{об}$  — содержание вещества, мигрировавшего из образца отхода в воздушную среду, мкг (мг);

$P$  — навеска отхода, взятая для анализа, г (кг).

$$d_{об} = (C_{обр.} - C_{контр.}) \times V_{экс.},$$

где  $C_{обр.}$  — концентрация вещества, найденная в воздухе эксикатора с образцом отхода, мг/дм<sup>3</sup>;

$C_{контр.}$  — концентрация вещества, найденная в воздухе контрольного эксикатора, мг/дм<sup>3</sup>;

$V$  — объем эксикатора, дм<sup>3</sup>.

Конечный результат является средней величиной двух определений:

$$C_{ср} = \frac{C_1 + C_2}{2},$$

где  $C_1$  и  $C_2$  — результаты первого и второго определения.

Исследование степени миграции токсических веществ из отходов в воздух можно проводить в климатических камерах с объемом рабочего пространства от 0,01 до 1 м<sup>3</sup>. Конструкция камеры должна обеспечивать герметичность, автоматическое регулирование температуры. Вентиляционная система камеры должна обеспечивать равномерную циркуляцию воздуха по всему рабочему объему камеры.

В рабочий объем камеры во время исследований должен постоянно подаваться воздух с расходом, обеспечивающим воздухообмен, равный 1 объему в 1 ч. Температура воздуха камеры 40°C.

Исследуемый образец отходов в чашке Петри помещают в климатическую камеру и кондиционируют не менее 3 ч при 40°C. Соотношение навески образца отходов (г) к рабочему объему камеры (дм<sup>3</sup>) принимают такое же, как в методике с использованием эксикатора. Отбор проб

воздуха на исследуемые ингредиенты из рабочего объема камеры проводится через 3 ч с момента стабилизации параметров воздуха в камере аспирационным устройством в соответствии с требованиями методик по их определению. Допускается одновременный отбор воздуха на несколько ингредиентов. Объем отобранного воздуха не должен превышать рабочего объема камеры. Параллельно проводят отбор воздуха, подаваемого в камеру для определения в нем тех же химических веществ (контрольный опыт).

Концентрации анализируемых веществ, мигрирующих из образца отходов в воздух, рассчитывают по формулам, указанным в настоящем пункте инструкции.

Уровень воздушно-миграционной опасности определяется кратностью превышения  $ПДК_{MR}$  компонентов отходов в воздухе.

10. Для количественного определения  $XPK$ ,  $BPK_5$  или  $BPK_{20}$  применяют методы, изложенные в [10–15].

При получении водных вытяжек соблюдают соотношение отход: дистиллированная вода, равное 1:10 г/см<sup>3</sup>.

При этом навеску образца отходов массой  $300 \pm 0,1$  г помещают в коническую колбу вместимостью 5000 см<sup>3</sup>, прибавляют 3000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, тщательно перемешивают, закрывают чашкой Петри и выдерживают при периодическом перемешивании в течение 24 ч в термостате при 40°C или в течение 3 сут при комнатной температуре ( $20 \pm 5^\circ C$ ).

Полученную водную вытяжку фильтруют через обеззоленный фильтр «белая лента», необходимую аликвоту полученного раствора используют для определения  $XPK$ ,  $BPK_5$  или  $BPK_{20}$ .

Результаты определения выражают в мг О/дм<sup>3</sup>.

19. Определение биологической диссимилиации (БД).

Биологическая диссимилиация определяется в случае присутствия в составе отходов органических или биогенных веществ.

Биологическая диссимилиация равна отношению  $BPK_5$  к  $XPK$ :  $BД = BPK_5 / XPK \times 100\%$ .

## ГЛАВА 5 МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФИТОТОКСИЧНОСТИ ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА

1. *Принцип метода.* Метод определения фитотоксичности отходов основан на способности семян адекватно реагировать на экзогенное химическое воздействие путем изменения интенсивности прорастания корней, что позволяет длину корней принять за показатель тест-функции. Критерием вредного действия считается ингибирование роста корней проростков семян.

1.1. *Способ воздействия.* Эксперимент при применении метода определения фитотоксичности отходов проводится путем проращивания семян сельскохозяйственных растений в лабораторных условиях в чашках Петри с фильтровальной бумагой.

2. *Область применения.* Метод определения фитотоксичности применяется для отходов, содержащих водорастворимые компоненты.

3. Тест-объект, материалы и лабораторное оборудование.

3.1. Тест-объект: семена 3-х культур (овса, редиса, огурцов), жизнеспособность которых составляет не менее 95% по ГОСТ 12039-82.

3.2. Материалы: фильтровальная бумага, фильтр «синяя лента».

3.3. Аппаратура: термостат, обеспечивающий температуру внутри камеры 22–28°C; шкаф для сухожаровой стерилизации; весы теххимические; мельница лабораторная; сита; дозаторы пипеточные на 2–10; 1–5; 100–1000; 20–200 и 5–50 мкл.

3.4. Лабораторная посуда: колбы конические объемом от 50 до 1000 мл со шлифом с притертыми пробками и без шлифа, стаканы стеклянные объемом от 50 до 1000 мл, колбы мерные объемом от 25 до 2000 мл с притертыми пробками, чашки Петри, стеклянные палочки с загнутым концом, пинцет для извлечения проросших семян, пипетки на 5 мл.

3.5. Средства измерения: линейка для измерения длины корней проростков.

4. Подготовка отходов к исследованиям по определению фитотоксичности проводится путем гомогенизации и последующего приготовления нативного экстракта отходов.

4.1. Гомогенизация отходов может быть выполнена путем измельчения образцов ножницами, дробления, растирания в фарфоровой ступке, интенсивного встряхивания многофазных систем или перемешивания их с помощью мешалок (механических, магнитных). Гомогенизация должна обеспечивать выход в раствор всех, способных мигрировать, компонентов отходов при приготовлении экстракта.

4.2. *Приготовление нативного экстракта отходов.* Экстракция токсичных соединений осуществляется при массовом соотношении образца отходов и дистиллированной воды 1 г:10 мл. Исходя из этого навеску отходов 10 г помещают в мерную колбу и дистиллированной водой доводят до метки 100 мл. При расчете соотношения не учитывается влажность отходов. Вытяжка выдерживается в течение 3 сут при комнатной температуре (20±5°C) в вытяжном шкафу. В течение всего времени приготовления ее необходимо периодически встряхивать и перемешивать. Для приготовления нативного экстракта отходов полученная вытяжка фильтруется через фильтр «синяя лента».

5. *Постановка эксперимента.* Эксперимент проводится в два этапа: предварительный и основной.

5.1. Предварительный этап необходим для определения наиболее чувствительной культуры семян к воздействию тестируемых отходов. Выбранная культура семян используется в основном этапе эксперимента.

5.1.1. Для предварительного этапа используется по 3 чашки Петри на каждую культуру и 3 чашки Петри на контроль.

5.1.2. В чашки Петри помещают 2 слоя фильтровальной бумаги, закрывают крышками, стерилизуют и охлаждают. На внешней стороне крышек

ставится маркировка, включающая наименование пробы (контроль, название отходов), наименование культуры семян.

В каждую чашку Петри помещается по 25 сухих здоровых семян огурцов, овса и редиса по отдельности.

В опытные чашки Петри вносят по 15 мл нативного экстракта отходов, в контрольные — по 15 мл дистиллированной воды.

Подготовленные чашки помещают в микроклиматические условия (термостаты) и экспонируют в течение 7 сут при температуре 24°C, относительной влажности воздуха 50–70% в отсутствие света. Открывать чашки в процессе эксперимента запрещено, во избежание загрязнения модельной среды и, как следствие, искажения результатов.

5.1.3. На 7-е сут измеряют длину корешков проростков, причем объектом измерения у каждого проростка является корень максимальной длины.

5.1.4. Статистическая обработка данных и расчет

Определяют средние значения ( $L_{cp}$ ) в опыте и контроле.

Величина показателя  $L_{cp}$  контрольных и опытных семян вычисляется как среднее арифметическое из совокупности данных о длине корней проростков, полученных в трех повторностях эксперимента:

$$L_{cp} = \frac{\sum L_i}{n},$$

где  $L_i$  — длина максимального корня каждого семени, мм;

$\sum$  — сумма;

$n$  — общее количество семян, взятых в опыт.

Если в одной из трех повторностей результаты существенно отличаются от двух других, то эту повторность не учитывают.

Сравнивают  $L_{cp}$  опыта и  $L_{cp}$  контроля между собой по формуле:

$$E_T = \frac{L_K - L_{OP}}{L_K} \cdot 100 \cdot \%,$$

где  $E_T$  — эффект торможения, %;

$L_{OP}$  — средняя длина корней в опыте, мм;

$L_K$  — средняя длина корней в контроле, мм.

5.1.5. Оценка результатов предварительного этапа

Отбор культуры семян в основной опыт проводится по значению величины  $E_T$  — выбирают культуру с наибольшим значением.

Отходы оказывают фитотоксическое действие, если наблюдается ингибирование развития корешков проростков на 20% и более относительно контроля.

При  $E_T < 20\%$  в каждой культуре семян отмечается отсутствие фитотоксического действия отходов, и основной этап не проводится.

При  $L_{cp(on)} >$  или  $= L_{cp(K)}$  в каждой культуре семян отмечается отсутствие фитотоксического действия отходов, и основной этап не проводится.

## 5.2. Основной этап эксперимента по определению фитотоксичности

На основании результатов основного этапа устанавливают класс опасности отходов по фитотоксическому действию по параметрам фитотоксичности: среднеэффективному разведению ( $ER_{50}$ ) и пороговому разведению ( $LimR$ ).

5.2.1. В основном этапе используют семена культуры, проявившей наибольшую чувствительность на предварительном этапе.

### 5.2.2. Приготовление рабочих растворов из нативного экстракта отходов

Рабочие растворы готовят путем последовательного разведения нативного экстракта отходов, полученного согласно пп. 24.2. настоящей инструкции. Готовятся разведения из нативного экстракта отходов, кратные 2; 5; 10; 100; 1000.

### 5.2.3. Проведение основного этапа определения фитотоксичности отходов

Основной этап выполняется в 3 повторностях (по 3 чашки Петри на каждый рабочий раствор и контроль). Кратности разведений рабочих растворов выбирают с целью обеспечения диапазона биологически эффективных разведений, ориентируясь на результаты предварительного этапа.

Дальнейший эксперимент и расчет выполняются согласно пп. 5.1.2–5.1.4. настоящей инструкции.

Пример учета полученных результатов при проведении основного этапа определения фитотоксичности отходов приведен в приложении 1 к настоящей Инструкции.

### 5.2.4. Статистическая обработка данных

Определение параметров фитотоксичности ( $LimR$  и  $ER_{50}$ ) осуществляется с использованием регрессионной модели:

$$LgR = -mE_T + b,$$

где  $E_T$  — фитозффект, установленный в эксперименте;

$R$  — разведение нативного экстракта отходов;

$m$  — коэффициент, соответствующий каждому значению фитозффекта;

$b$  — коэффициент регрессии.

Коэффициенты уравнения  $m$  и  $b$  рассчитываются в результате каждого эксперимента.

Для удобства при последующем статистическом анализе результатов значение  $R$  нативного экстракта отходов условно принимается за 1, его разведение в 10 раз соответствует  $R = 10$  и т. д.

Регрессионный анализ полученных данных проводится при условии, что биологически эффективными являются не менее 3 значений  $R$ .

Вычисление уравнения регрессии  $lgR = -mE_T + b$  проводится методом «Наименьших квадратов». Наиболее целесообразно для этих целей использование компьютерных программ, в частности «Microsoft Excel», что значительно упрощает расчет параметров уравнения ( $m$  и  $b$ ).

Проводится оценка достоверности полученного регрессионного уравнения по величине коэффициента корреляции ( $r$ ), характеризующего степень линейного приближения экспериментальных и эмпирически вычисленных (по уравнению) значений фитоэффектов.

Коэффициент  $r$ , нормированный от 0 до 1. Если он равен 1, то имеет место полная корреляция с моделью, если 0, то уравнение регрессии неудачно описывает зависимость  $lgR = f(E_T)$ .

#### 6. Расчет параметров фитотоксичности и оценка опасности отходов

Определение значений пороговых ( $LimR$ ) и среднеэффективных ( $ER_{50}$ ) разведений осуществляется путем решения полученного уравнения:

$lgR = -mE_T + b$  относительно  $R$  при заданных величинах фитоэффекта ( $E_T$ ), который при определении порога фитотоксичности принимается за 20%, а при определении среднеэффективного разведения  $E_T = 50\%$ .

Класс опасности отходов устанавливается по величине  $ER_{50}$  в соответствии с критериями, представленными в приложении 2 настоящей инструкции.

Если порог фитотоксичности ( $LimR$ ) зафиксирован только при действии нативного экстракта отходов, а его разведения проявляют индифферентность относительно семян, то отходам присваивается 4 класс опасности.

Если порог фитотоксичности ( $LimR$ ) не достигается при действии нативного экстракта отходов, такие отходы относятся к неопасным.

Пример расчета класса опасности отходов производства по фитотоксичности приведен в приложении 3 настоящей инструкции.

## ГЛАВА 6

### МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ОТХОДОВ В ТЕСТ-МОДЕЛИ *TETRAHYMENA PYRIFORMIS W*

#### 1. Область применения и ограничения

1.1. Метод определения токсичности отходов в тест-модели *Tetrahymena pyriformis W* применяется для отходов, содержащих водорастворимые компоненты, твердые частицы, гидрофобные компоненты, например, нефтепродукты.

1.2. Метод определения токсичности отходов в тест-модели *Tetrahymena pyriformis W* не применяется:

- для отходов, обладающих активными денатурирующими свойствами (например, антисептики);
- для отходов, содержащих большое количество поверхностно-активных веществ.

2. Тест-объект – инфузория *Tetrahymena pyriformis* W относится к типу *Protozoa*, классу *Ciliata* (ресничные инфузории). Инфузорий выращивают на питательной среде с известным качественным и количественным составом.

2.1. *Морфофункциональная характеристика.* *Tetrahymena pyriformis* W имеет удлиненную грушевидную форму с более плоским каудальным и слегка заостренным вентральным концом. Средний размер особи 20×50 нм. Клетка покрыта двухслойной мембраной с многочисленными порами. Инфузория имеет ротовое отверстие с четырьмя мембранами, глотку, пищеварительные вакуоли, сократительную вакуоль. Штамм *Tetrahymena pyriformis* W в лабораторных условиях микроядра не имеет, но оно может появляться при неблагоприятных условиях. *Tetrahymena pyriformis* W размножается делением через каждые 2–6 ч. Оптимум рН для роста — 6,8–7,2. Температурные пределы жизни от +13 до +28°C. При температуре ниже 18°C рост инфузорий замедляется, при температуре выше 30°C *Tetrahymena pyriformis* W погибает.

2.2. *Культивирование Tetrahymena pyriformis* W в лаборатории

Необходимое требование для поддержания культуры инфузорий — систематический (1–2 раза в неделю) пересев ее на новую питательную среду.

Маточная культура инфузорий выращивается при температуре 25°C в питательной среде следующего состава:

- среда А: пептон — 2,0 г, глюкоза — 0,5 г, натрий хлористый — 0,1 г, дрожжевой экстракт — 0,1 г, дистиллированная вода — до 1 л;

- среда Б: пептон — 20,0 г, глюкоза — 5,0 г, натрий хлористый — 1,0 г, дрожжевой экстракт — 1 г, дистиллированная вода — до 1 л.

Среды А и Б доводят до рН 7,4. Приготовленную среду разливают по 10 мл в стерильные конические колбочки объемом 50–100 мл с ватно-марлевыми пробками и автоклавируют при 1 атм в течение 30 мин. В процессе стерилизации рН среды снижается до 7,1–7,2. После стерилизации колбочки со средой культивирования маточной культуры *Tetrahymena pyriformis* W можно хранить в холодильнике при +4°C в течение 1 мес. *Tetrahymena pyriformis* W является аэробом, поэтому желательно, чтобы слой среды культивирования в колбочке не превышал 1,5–2,0 см.

Пересев маточной культуры производится не менее 1 раза в неделю: 0,2 мл культуры инфузорий, выращенной в среде А, пересеивается в среду Б; 0,2 мл культуры инфузорий, выращенной в среде Б, пересеивается в среду А.

В процессе хранения и культивирования *Tetrahymena pyriformis* W возможно загрязнение культуры посторонней микрофлорой (плесени, грибки, бактерии), приводящее к изменению чувствительности инфузорий к воздействию изучаемых факторов или гибели популяции.

Для получения достоверных результатов необходимо работать с чистой культурой инфузорий. Проверку культуры на стерильность производят путем посева на мясопептонный агар, сусло-агар, бульон.

3. *Аппаратура, лабораторная посуда, реактивы, материалы*

Аппаратура: термостат, обеспечивающий температуру внутри камеры 25°C, холодильник, автоклав, бюксы, шкаф для сухожаровой стерилизации, потенциометр, весы аналитические, часы процедурные, микроскоп

биологический, дозаторы пипеточные на 2–10; 1–5 мл и 100–1000; 20–200 и 5–50 мкл, ступки фарфоровые, набор сит, штативы лабораторные, ножницы, пинцеты анатомический и хирургический, скальпель, счетная камера Фукса–Розенталя, спиртовка.

Лабораторная посуда: колбы конические объемом от 50 до 1000 мл со шлифом с притертыми пробками и без шлифа, стаканы стеклянные объемом от 50 до 1000 мл, колбы мерные объемом от 25 до 2000 мл с притертыми пробками, пробирки мерные с притертыми пробками на 10; 15; 20; 25 мл, пробирки бактериологические, пробирки центрифужные, пипетки мерные от 1 до 10 мл, стекла предметные и покровные, бюксы стеклянные разные, чашки Петри, флаконы стеклянные объемом 10 мл.

Реактивы и материалы: пептон бактериологический, глюкоза кристаллическая и глюкоза 40% для инъекций, дрожжевой экстракт, натрий хлористый химически чистый, 5% спиртовой раствор йода, вата, марля, бинты, лейкопластырь, скотч, маркер.

4. *Условия работы и процедуры.* При работе с *Tetrahymena pyriformis* W следует соблюдать стерильность. Необходимы моечная, автоклавная, бокс с предбоксом, лабораторная комната. В боксе выполняются работы, требующие строгого соблюдения стерильности: пересев маточной культуры, проведение хронического эксперимента. Стерилизация бокса осуществляется бактерицидными лампами.

В лабораторной комнате проводятся подготовительные работы (приготовление реактивов, посуды); изучение острой и подострой токсичности отходов производства, не требующее строгого соблюдения стерильности; подсчет инфузорий под микроскопом. Помещение должно быть сухим, чистым, в нем не должны проводиться какие-либо другие исследования, нельзя курить и держать вещества, выделяющие токсичные аэрозоли. Температура не должна превышать 25°C.

Оборудование и приборы для работы с *Tetrahymena pyriformis* W не следует использовать для других работ, а для посуды это полностью исключается.

Вымытые и высушенные колбы закрывают ватно-марлевыми пробками и колпачками из пергаментной бумаги. Концы пипеток закрывают ватой. Пипетки заворачивают в пергаментную бумагу в количестве, необходимом для однократного использования.

Пипетки и колбы стерилизуют в автоклаве при 1,5 атм в течение 30 мин или в сухожаровом шкафу 2 ч при 180°C или 2,5 ч при 165°C.

Ватно-марлевые пробки после каждого выращивания культуры стерилизуют при 1,5 атм 30 мин, а затем просушивают в сушильном шкафу.

Для подсчета инфузорий используют камеру Фукса–Розенталя. Считают под микроскопом при увеличении: объектив — 8, окуляр — 10. Инфузорий предварительно фиксируют 5%-м спиртовым раствором йода. Для этого 1 мл культуры вносят в 10-миллилитровый флакончик, добавляют каплю раствора йода. Подсчитывают число инфузорий в 10 больших квадратах по диагонали.

Умножая среднее число инфузорий в одном квадрате на 5000, находят число инфузорий в 1 мл культуры.

5. *Пробоподготовка.* Подготовка проб отходов проводится таким образом, чтобы сделать их доступными для потребления тест-объектом. *Tetrahymena pyriformis* W способна потреблять растворенные в воде вещества и твердые частицы, размер которых не превышает 225 мкм. Поэтому твердые отходы должны быть измельчены.

В эксперименте используется нативный образец отходов в гомогенизированном состоянии. Гомогенизация образца выполняется согласно п. 2.1 гл. 4 настоящей инструкции. Далее готовят раствор с максимальным насыщением на дистиллированной воде с концентрацией образца отходов 500 мг/мл. Измеряют рН полученного раствора.

#### 6. Постановка эксперимента

Токсичность отходов в тест-модели *Tetrahymena pyriformis* W определяется в ходе острого, подострого и хронического экспериментов.

##### 6.1. Острый и подострый эксперименты

Используется культура *Tetrahymena pyriformis* W в стационарной фазе роста.

Эффект токсического действия учитывается по реакции «жизнь-смерть». В остром (3–6 ч) и подостром (24 ч) экспериментах определяются  $LD_{16}$ ,  $LD_{50}$ ,  $LD_{84}$ ,  $K_{кум}$ . Общая длительность эксперимента — 2 рабочих дня.

В ходе острого и подострого экспериментов не требуется соблюдения стерильности. Стерильной должна быть только исходная культура.

При проведении острого и подострого экспериментов из раствора с максимальным насыщением (концентрация 500 мг/мл) готовится серия разведений концентраций от 10 до 400 мг/мл. По 1 мл раствора каждой концентрации вносится в 10-миллилитровые флакончики в двух повторностях. В контрольную пробу вносится 1 мл дистиллированной воды. В каждую пробу добавляют инокулят инфузорий в стационарной фазе роста (от 30000 до 100000 в объеме, не превышающем 0,3 мл).

В остром эксперименте пробы инкубируют при 25°C в течение 3–6 ч, в подостром — в течение 24 ч. По истечении срока инкубации под микроскопом в нативном препарате наблюдают картину интоксикации. В счетной камере Фукса–Розенталя подсчитывают число погибших инфузорий до их фиксации и общее число инфузорий после фиксации раствором йода.

По результатам эксперимента рассчитывают основные параметры токсичности:

$LD_{16}$  — дозу, вызывающую гибель 16% особей;

$LD_{50}$  — дозу, вызывающую гибель 50% особей;

$LD_{84}$  — дозу, вызывающую гибель 84% особей;

$K_{кум}$  — коэффициент кумуляции как частное между средней смертельной дозой, полученной в подостром эксперименте, и средней смертельной дозой, полученной в остром эксперименте.

Вычисление параметров токсичности проводится методом «Наименьших квадратов». Наиболее целесообразно для этих целей использовать программу «Microsoft Excel».

## 6.2. Хронический эксперимент

6.2.1. В хроническом эксперименте тестируются отходы после острого и подострого экспериментов. Хронический эксперимент осуществляется на протяжении жизненного цикла популяции *Tetrahymena pyriformis* W. Токсический эффект учитывается по результатам подсчета численности популяции в лаг-фазе, логарифмической фазе, фазе замедленного роста и стационарном состоянии. На основании результатов подсчета рассчитываются показатели, характеризующие закономерности роста популяций: мгновенная скорость роста, время генерации, число поколений; рассчитывают  $ED_{16}$ ,  $ED_{50}$ ,  $ED_{84}$ ,  $K_{кум}$ ,  $K_{рез}$ ,  $K_{ад}$ . На основании полученных данных определяют максимально недействующую дозу (далее — МНД) и рассчитывают показатель  $ЛД_{50}/МНД$ . Длительность хронического эксперимента — 96 ч.

В хроническом эксперименте используется питательная среда, приготовленная по прописи Б. Среду стерилизуют во флаконах объемом 500 мл.

В хроническом эксперименте отходы исследуют в диапазоне концентраций, охватывающем токсичные, пороговые и подпороговые концентрации. При выборе концентраций, исследуемых в хроническом эксперименте, учитываются результаты токсикометрии острого и подострого экспериментов. Как правило, отходы производства исследуются в концентрациях  $10^{-9}$ ;  $10^{-8}$ ;  $10^{-7}$ ;  $10^{-6}$ ;  $10^{-5}$ ;  $10^{-4}$ ;  $10^{-3}$ ;  $10^{-2}$ ;  $10^{-1}$ ;  $10^0$ ;  $10^1$ ;  $5 \times 10^1$ ;  $5 \times 10^2$  мг/мл. Исследование осуществляют в стерильных условиях. Растворы отходов и среда культивирования разливаются в стерильные колбочки с ватно-марлевыми пробками. В контрольные пробы вносится дистиллированная вода. Каждая концентрация исследуется не менее чем в трех повторностях. Схема разведения отходов приведена в Приложении 4 к настоящей инструкции.

Колбочки с растворами дополнительно стерилизуются при 80–90°C в течение 15–20 мин. После охлаждения в пробы вносят по 20000 инфузорий в стационарной фазе роста. Пробы в течение 96 ч выдерживают в термостате при 25°C. Регистрация состояния инфузорий и подсчет организмов осуществляется через 24 (лаг-фаза), 48 (логарифмическая фаза), 72 (фаза замедленного роста), 96 (стационарная фаза) чв. Для этого из каждой колбочки отбирают по 1 мл культуры, соблюдая стерильность.

В нативном препарате отмечают состояние организмов: наличие погибших, характер морфологических и функциональных изменений.

Морфологические признаки: внешняя форма организмов: нормальная, округлая, листовидная, змеевидная, квадратная, дисковидная, наличие выпячиваний, вакуолизация, сморщивание и другие изменения.

Размер: нормальный, мелкий, крупный.

Структурные изменения в ядре отмечают после окраски организмов метиленовым синим, пиروлином.

Функциональные признаки: подвижность, характер движения: нормальное, замедленное, вращательное, маятникообразное, броуновское, резкое изменение направления, вздрагивание.

Распределение в капле: верхняя часть, нижняя часть, в центре, по краям.

*Поведение сократительной вакуоли*

Подсчет организмов осуществляют в счетной камере Фукса–Розенталя в 10 больших квадратах.

Математическую обработку результатов подсчета инфузорий проводят с использованием компьютерной программы или следующих формул:

$$r = \ln \frac{N_t}{2000} : t; \quad n = \ln \frac{N_t}{2000} : \ln 2; \quad g = \frac{t}{n},$$

где 2000 — число организмов, внесенное в 1 мл среды культивирования;

$N_t$  — число организмов, выросших в среде культивирования с исследуемым препаратом через время  $t$ ;

$r$  — мгновенная скорость роста;

$n$  — число поколений;

$g$  — время генерации.

Хроническую токсичность определяют в диапазоне концентраций, когда увеличение эффекта пропорционально повышению концентрации. Угнетение роста для каждой из концентраций в этом диапазоне рассчитывают по формуле:

$$\text{Угнетение роста в \%} = 100 - (N_o/N_k \times 100),$$

где  $N_o$  — число организмов в опыте;

$N_k$  — число организмов в контроле.

$ED_{16}$ ,  $ED_{50}$ ,  $ED_{84}$  рассчитывают с использованием таблиц и формул, применяемых для определения  $LD_{16}$ ,  $LD_{50}$ ,  $LD_{84}$ .

По результатам, полученным в хроническом эксперименте, учитывают следующие показатели токсичности отходов:

-  $ED_{50}$  — дозу, вызывающую угнетение генеративной функции на 50% в логарифмической (24 или 48 ч) и стационарной (72 или 96 ч) фазе роста;

-  $K_{кум}$  при хроническом воздействии путем отношения  $ED_{50}$ , определенной через 96 ч (стационарная фаза) к  $ED_{50}$ , определенной через 24–48 ч (логарифмическая фаза);

- скорость роста, время генерации, число поколений, численность популяции;

- коэффициент адаптогенности ( $K_{ад}$ ), характеризующий адаптационный потенциал популяции;

- кислотную резистентность, позволяющую судить о мембранотоксическом действии отходов;

мутагенную активность отходов;

- МНД;

ЛД<sub>50</sub>/МНД.

#### 6.2.2. Определение коэффициента адаптогенности

Изучение адаптогенных свойств отходов осуществляется в хроническом эксперименте в интервалах 24–48–72–96 ч.

При хроническом воздействии токсикантов на *Tetrahymena pyriformis* W в нетоксичных концентрациях отмечается чередование периодов стимуляции и угнетения роста популяции в зависимости «доза – эффект», а также «доза – время – эффект».

Количественная оценка адаптационных колебаний численности популяции на протяжении вышеуказанных циклов ее развития позволяет вывести коэффициенты, характеризующие адаптационный потенциал популяции:

$K_{ад24-96}$  — коэффициент адаптогенности первого жизненного цикла популяции:

$$K_{ад24-96} = \frac{N_{o-24} + N_{o-48} + N_{o-72} + N_{o-96}}{N_{k-24} + N_{k-48} + N_{k-72} + N_{k-96}},$$

где  $N_o$  — число организмов в опыте;

$N_k$  — число организмов в контроле.

#### 6.2.3. Изучение мембранотоксического действия отходов

Мембранотоксическое действие отходов оценивают по резистентности одноклеточных организмов к воздействию растворов солей, кислот, щелочей – кислотной резистентности.

Методика основана на действии химических веществ на защитный покров инфузорий.

Во флакончики помещают по 1 мл взвеси инфузорий. Из микробюретки добавляют порциями 1% раствор натрия хлористого, или 0,02 N раствор серной кислоты, или 0,01 N раствор едкого натрия. Через 1 мин под микроскопом оценивают движение инфузорий. Длительность анализа не более 3 мин.

Резистентность выражают количеством миллилитров данного раствора, которое нужно добавить к 1 мл взвеси инфузорий для их обездвиживания. Например, для обездвиживания инфузорий, произраставших в течение 72 ч в стандартной пептонной среде, необходимо к 1 мл взвеси инфузорий добавить 1 мл 0,02 N серной кислоты.

Оценка резистентности:

1 мл — норма, соответствующая контролю;

>1 мл — повышение устойчивости мембран;

<1 мл — снижение устойчивости мембран.

#### 6.2.4. Изучение мутагенной активности отходов

Мутагенность исследуется после 96-часового воздействия среды, содержащей тестируемые отходы, на *Tetrahymena pyriformis* W. Для этого используют среду выживания — аллиловый спирт, кофеин или фторуксусную

кислоту. Одноклеточные организмы, произраставшие в контрольной питательной среде, погибают за 12 ч от концентрации аллилового спирта в 250 ммоль, а мутант выживает; исходный штамм *Tetrahymena pyriformis* W погибает в растворе кофеина 10 ммоль, а мутант устойчив, что и позволяет его отделить от исходного штамма.

Оценка мутагенной активности отходов на *Tetrahymena pyriformis* W проводится по шкале согласно приложению 5 к настоящей инструкции.

Пересев популяции после длительного воздействия отходов в питательную среду, не содержащую отходы, и гибель в последней организмов, а также пересев популяции после длительного воздействия отходов в среду с его токсичной концентрацией и выживаемость в последней – также позволяют судить о мутагенной активности отходов.

7. Оценка токсичности отходов на *Tetrahymena pyriformis* W проводится по критериям, приведенным в приложении 6 к настоящей Инструкции.

Отнесение отходов к классу опасности осуществляется по лимитирующему показателю, значение которого соответствует наиболее высокому классу.

## ГЛАВА 7 МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭМБРИОТОКСИЧНОСТИ ОТХОДОВ В ТЕСТ-МОДЕЛИ *LYMNAEA STAGNALIS*

1. *Принцип метода.* Метод определения эмбриотоксичности отходов в тест-модели *Lymnaea stagnalis* проводится на кладках прудовика большого *Lymnaea stagnalis* путем экспозиции кладок в растворе отходов. Оценивается воздействие отходов на эмбриогенез и эффективность выклева брюхоногого легочного моллюска *Lymnaea stagnalis* в лабораторных условиях. Критерием вредного действия считается угнетение выклева моллюска.

### 2. Область применения и ограничения

2.1. Метод определения эмбриотоксичности отходов в тест-модели *Lymnaea stagnalis* применяется для отходов различных агрегатных состояний и физико-химических свойств: жидких, твердых, многофазных эмульсий, водорастворимых и гидрофобных, содержащих твердые частицы, а также отходов с выраженными кислотными или основными свойствами.

### 2.2. В тест-модели не исследуются отходы:

- содержащие большое количество поверхностно-активных веществ;
- содержащие вещества, обладающие активными денатурирующими свойствами (например, антисептики);
- образующие воздухонепроницаемую пленку на поверхности водной среды;
- бактериальное загрязнение которых может послужить причиной гибели тест-объекта.

### 3. Тест-объект — кладки прудовика большого *Lymnaea stagnalis*

#### 3.1. Содержание моллюсков

Моллюсков содержат в отстоянной водопроводной воде, не превышая максимальную плотность посадки 1 особь на 200 мл воды. Например, можно содержать моллюсков в отдельных стаканах емкостью 1000 мл по 5 особей. При необходимости (в холодное время года) моллюсков помещают в термостат при температуре 22–26°C. В качестве корма используют листья салата, а в летнее время можно кормить листьями одуванчика.

Меняют воду и добавляют корма каждые 2–3-е сут. При этом удаляются кладки. Нельзя допускать помутнения воды в сосудах с улитками. Ежедневно очищают стенки сосудов жесткой губкой.

Температурный диапазон воды для содержания взрослых особей в лабораторных условиях: от +16 до +28°C.

Диапазон значений рН водной среды, пригодный для жизни: 6,5–8,5.

3.2. Для эксперимента используются кладки, выметанные в ближайшие 2-е сут. Нельзя использовать кладки, находившиеся в мутной воде, в среде с погибшими или больными взрослыми особями. Кладки можно снимать и накапливать в отдельной емкости в течение 2-х сут, затем использовать в эксперименте.

Перед экспериментом проводят визуальную оценку кладок, используя микроскоп стереоскопический МБС-10. При этом оценивают:

- соблюдение постадийной однородности всех задействованных кладок;
- отсутствие непригодных кладок.

Непригодными считаются кладки:

- с количеством зародышевых капсул менее 20;
- мутные;
- содержащие зародышевые капсулы с признаками гибели эмбриона или отсутствием вращательных движений в количестве 15% и более.

#### 4. Лабораторная посуда и оборудование.

Микроскоп стереоскопический МБС-10, весы аналитические, дозаторы пипеточные на 1–5 мл и 100–1000; 20–200; 5–50 мкл, ступки фарфоровые, набор сит, шейкер, экспериментальная посуда: чашки Петри, 6-луночный планшет, стеклянные бюксы.

Для отстаивания воды и приготовления растворов используют чистые стеклянные сосуды.

#### 5. Пробоподготовка отходов для эксперимента

В эксперименте используются нативные образцы отходов в гомогенизированном состоянии. Гомогенизация образца выполняется согласно п. 2.1 гл. 4 настоящей инструкции. Твердые отходы должны быть измельчены.

В качестве растворителя используют отстоянную водопроводную воду. Вода должна соответствовать стандартам питьевой воды. Хлорированная питьевая вода отстаивается в чистом сосуде из инертных материалов не менее чем 1 сут.

*Приготовление исследуемых растворов.* В растворе с максимальным насыщением концентрация исследуемого образца отходов должна составлять 500 мг/мл. Последующие рабочие растворы готовят путем последовательного разведения исходного раствора.

После смешивания необходимо выдержать не менее 2 ч для выхода в раствор водорастворимых компонентов отходов. В течение этого времени сосуд периодически встряхивают или помещают в шейкер. Измеряют pH полученного раствора с помощью pH-метра.

6. *Постановка эксперимента.* Эксперимент проводится в два этапа: предварительный и основной.

6.1. Предварительный этап проводится с целью выявления биологически эффективных концентраций.

Для предварительного этапа эксперимента из раствора с начальной концентрацией отходов 500,0 мг/мл готовят водные разведения с концентрациями 50,0; 5,0; 0,5; 0,05; 0,005 мг/мл и т. д. На предварительном этапе исследуют 3 или 5 концентраций образца отходов и контроль в одной повторности.

Используют синхронизированные кладки в количестве 2–4 на один образец отходов, в стадии гастролы. Можно использовать кладки на более поздних стадиях, однако при этом нужно учитывать, что тест-модель, возможно, будет проявлять меньшую чувствительность к действию токсиканта.

Проводится синхронизация кладок — отсечение бритвенным лезвием от концевых отделов кладки небольшого участка длиной 2–3 мм. Затем каждую кладку делят на 4–6 приблизительно равных частей, которые случайным образом расформируют на одну контрольную и 3 (или 5) опытных групп. В экспериментальную посуду помещают по 2–4 четверти кладки и добавляют исследуемый раствор.

В эксперименте используют чашки Петри диаметром 40 мм — они заполняются 10 мл исследуемого раствора. Можно использовать 6-луночный планшет — каждая лунка также заполняется 10 мл исследуемого раствора. Также используются чашки Петри диаметром 90 мм — они заполняются 30 мл раствора, или стеклянные бюксы емкостью 50 мл — они заполняются 15 мл раствора.

В контрольную пробу вносят эквивалентный объем воды.

Подсчитывается изначальное количество зародышевых капсул в каждой чашке. Для подсчета используется микроскоп стереоскопический МБС-10.

Чашки с кладками инкубируются при комнатной температуре, естественном фотопериоде, в затененном месте. При необходимости исключить испарение, чашки можно закрывать крышками. Рекомендуются температурный диапазон воды для инкубации кладок от +20 до +28°C. Температурный оптимум водной среды для инкубации кладок от +23 до +25°C. При понижении температуры воды скорость эмбрионального развития снижается.

Длительность экспозиции на предварительном этапе приблизительно 5 сут.

По окончании этапа ориентировочно оценивают гибель эмбрионов, аномалии развития. При отсутствии гибели ориентируются на отставание в развитии эмбрионов. Анализ нарушений эмбриогенеза моллюсков проводится постадийно с помощью микроскопа стереоскопического МБС-10. Визуальная идентификация этапов эмбрионального развития большого прудовика и оценка нарушений развития проводится с ориентацией на морфофизиологические критерии, предложенные В.Н. Мещеряковым, с применением соответствующей терминологии автора.

В процессе анализа отмечаются следующие стадии эмбриогенеза (в последовательности от ранних к более поздним): гастрюла → трохофора → велигер → переход на ножное движение → выклев. Идентификация отставаний в развитии проводится с ориентацией на «норму», в качестве которой служат лидеры контрольной группы, т.е. зародыши на самых поздних стадиях эмбриогенеза на каждом из этапов оценки.

Для оценки предварительного этапа значимым считается отставание на 2 и более стадии.

## 6.2. Основной этап эксперимента

6.2.1. В ходе основного этапа эксперимента тестируются концентрации отходов в интервале биологически эффективных. Основной эксперимент выполняется не менее чем в трех повторностях.

В основном эксперименте должно быть испытано не менее 4 концентраций отходов; оптимально — 5. Обязательно использование отрицательного контроля с отстоянной водопроводной водой.

### 6.2.2. Приготовление кладок

В эксперимент берутся кладки от взрослых улиток лабораторного разведения. Изымается необходимое количество кладок (3–6 на одну повторность), содержащих зародыши на начальных этапах дробления (стадии 2–4 бластомеров), либо гастрюлы, либо на стадии ранней трохофоры. При этом необходимо соблюдать постадийную однородность всех задействованных кладок.

Проводится легкая синхронизация кладок — отсечение бритвенным лезвием от концевых отделов кладки небольшого участка длиной 2–3 мм. Затем каждую кладку делят на 4–6 приблизительно равных частей, которые случайным образом расформируют на одну контрольную и 3 (или 5) опытных групп, и помещают в экспериментальную посуду, содержащую исследуемые растворы (например, чашки Петри диаметром 40 мм на 10 мл раствора). Таким образом, в каждую контрольную и опытную группу попадает 1/4 или 1/6 часть одной кладки. Каждая часть содержит приблизительно одинаковое количество зародышевых капсул. Поскольку для эксперимента на одну повторность используют 3–6 кладок, то в каждой группе (чашке) оказывается по 3–6 частей, т. е. по 40–90 зародышевых капсул.

6.2.3. Чашки с кладками заливают исследуемыми растворами. В контрольную пробу вносят эквивалентный объем воды. Оптимально исследовать 5 концентраций отходов и 1 контроль — 6 чашек на одну повторность.

Подсчитывается изначальное количество зародышевых капсул в каждой чашке. Для подсчета используется микроскоп стереоскопический МБС-10.

Чашки с кладками инкубируются при комнатной температуре, естественном фотопериоде, в затененном месте. Достаточная интенсивность аэрации достигается благодаря небольшой высоте водного столба среды в каждой чашке. При необходимости исключить испарение, чашки можно закрывать крышками. Добавление свежей воды в инкубационную среду осуществляется по мере ее испарения в течение всего периода экспозиции.

Максимальный срок экспозиции составляет 19 сут. Температурный оптимум водной среды для инкубации кладок от +23 до +25°C. При его соблюдении срок экспозиции сокращается до 9–10 сут.

6.2.4. *Учитываемые параметры.* По окончании основного этапа количественно оценивают гибель эмбрионов, аномалии развития и выклев.

Основной критерий учета эмбриональной гибели — фрагментация зародыша, а также (со стадии трохофоры до выклева) полная остановка движения моллюска внутри яичевой капсулы, которая сопровождается разрушением тканей и фрагментацией эмбриона. Оценивается микроскопически.

Живые зародыши, сохраняющие вращательные движения внутри яичевых капсул, но имеющие различные уродства и другие аномалии морфологической и функциональной организации, учитывают как «аномалии развития». Оценивается микроскопически.

Доля выклюнувшихся особей определяется по окончанию 9–19-х сут экспозиции, после полного прекращения выклева. Выклюнувшиеся особи подсчитываются невооруженным глазом.

#### 6.2.5. Оценка основного этапа

В результате основного этапа эксперимента в тест-модели *Lymnaea stagnalis* оценивается эффект угнетения выклева.

Для расчета угнетения выклева в % визуально ведется подсчет выклюнувшихся особей в каждой концентрации с частичным эффектом гибели и в контроле (все повторности) и рассчитывается процент выклюнувшихся особей относительно изначального количества зародышевых капсул — это % успешного выклева. Если в одной из повторностей результаты существенно отличаются от других, то эту повторность не учитывают.

Затем рассчитывается усредненный показатель % успешного выклева из всех повторностей и коэффициент вариации. Для расчета применяют методы описательной статистики; наиболее целесообразно использование компьютерной программы «Statistica 6.0».

На основании усредненного показателя % успешного выклева для каждой концентрации относительно контроля рассчитывается *угнетение выклева* по формуле:

$$\text{угнетение выклева (\%)} = K - O / K \times 100\%,$$

где K — % успешного выклева в контроле;

O — % успешного выклева в опыте.

Принцип оценки степени опасности отходов базируется на экспериментально установленной зависимости величины угнетения выклева (%) от концентрации отходов в мг/мл. Зависимость выражается уравнением прямой общего вида:  $y = mx + b$ .

Учитывая прямолинейный характер данной зависимости, определение параметров эмбриотоксичности ( $EC_{50}$  и  $EC_{15}$ ) осуществляется с использованием регрессионной модели.

Опасность отходов в отношении эмбриотоксичности на кладках *Lymnaea stagnalis* оценивается по показателям:

- среднеэффективная концентрация ( $EC_{50}$ );
- пороговая концентрация ( $EC_{15}$ );
- среднеэффективная концентрация ( $EC_{50}$ )/пороговая концентрация ( $EC_{15}$ ) — показатель, характеризующий зону острого действия, рассчитывается отношением  $EC_{50}$  к  $EC_{15}$ .

Регрессионный анализ экспериментальных данных проводится при условии наличия дозозависимого эффекта на 4 и более концентрациях.

Пример расчета класса опасности отходов по эмбриотоксичности на кладках *Lymnaea stagnalis* приведен в приложении 7 к настоящей инструкции.

#### 7. Критерии достоверности теста:

- «успешный выклев» в контроле должен составлять не менее 70%;
- количество наблюдений в каждой повторности — минимум 30;
- коэффициент вариации показателей из 3, 4-х повторностей — не более 30%.

Оценка достоверности полученного регрессионного уравнения проводится по величине коэффициента корреляции ( $r$ ). Коэффициент  $r$  имеет значения от 0 до 1. Если  $r$  равен 1, то имеет место полная корреляция с моделью. При значении  $r \geq 0,6$  можно считать, что уравнение регрессии удачно описывает зависимость концентрация – эффект.

#### 8. Ранжирование отходов по классам опасности

Эмбриотоксическое действие отходов на кладках *Lymnaea stagnalis* считается доказанным, если отмечено угнетение выклева на 15% относительно контроля при действии раствора с максимальным насыщением (500 мг/мл). В этом случае отходы относятся к 4-му классу опасности.

Отсутствие эмбриотоксического действия отходов на кладках *Lymnaea stagnalis* отмечается в случае, если угнетение выклева менее 15% при действии раствора с максимальным насыщением (500 мг/мл). В этом случае отходы относятся к неопасным.

Ранжирование отходов по классам опасности проводится по лимитирующему параметру эмбриотоксичности согласно приложению 8 настоящей инструкции.

## ГЛАВА 8

### МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ОТХОДОВ В ТЕСТ-МОДЕЛИ *EISENIA FOETIDA*

1. *Принцип метода.* Метод определения токсичности отходов в тест-модели *Eisenia foetida* основан на регистрации ответных реакций половозрелых особей дождевого червя вида *Eisenia foetida* на воздействие отходов разных концентраций. Оцениваемый параметр: средняя летальная концентрация.

2. *Область применения.* Метод применяется для отходов различных агрегатных состояний и физико-химических свойств: жидких, твердых, многофазных, масляных эмульсий, водорастворимых и гидрофобных, содержащих твердые частицы, а также отходов с выраженными кислотными или основными свойствами.

Отходы, содержащие органические загрязнители, такие как синтетические поверхностно-активные вещества, фенолы, нефтепродукты и пр., оцениваются с учетом их способности к биodeградации.

3. Тест-объект — генетически однородная лабораторная популяция дождевого червя вида *Eisenia foetida* (Savigny, 1826), полученная в результате регенерации и последующего размножения одной исходной особи.

3.1. В эксперименте должны использоваться половозрелые особи массой 200–400 мг, имеющие поперечный поясок.

#### 3.2. Культивирование *Eisenia foetida*

Популяцию *Eisenia foetida* выращивают из коконов в ящиках вместимостью 10–50 л при достаточном количестве корма. Рекомендуются усредненный корм — смесь ферментированного навоза крупного рогатого скота и торфа 50:50. Корм должен иметь рН примерно 6–7 (регулируется карбонатом кальция). Субстрат должен быть влажным, но не мокрым. Выращивают при комнатной температуре воздуха от +18 до +26°C.

Черви считаются здоровыми, если они подвижны, не стараются покинуть среду и размножаются. Корм вносится, если движения особей замедляются и кончик отдельных особей приобретает желтый цвет.

#### 4. Модельная среда для эксперимента

Модельный почвенно-питательный субстрат состоит из гумуса (гумифицированная почва в результате жизнедеятельности червей) и компоста (растительные остатки и ферментированный навоз крупного рогатого скота). Гумус продуцируется в результате жизнедеятельности червей. Для хранения гумус и компост высушиваются на воздухе и измельчаются. Перед применением субстрат размачивается водопроводной водой. В субстрате соотношение гумуса и компоста примерно 1:1 в расчете на массу сухого вещества.

Показатели качества субстрата:

- рН 6,5–7,3;

- массовая доля влаги 70±7%.

Перед экспериментом в субстрат вносится образец отходов в определенной концентрации. Корректировка влажности субстрата в ходе

эксперимента проводится добавлением водопроводной воды и контролируется взвешиванием контейнеров с периодичностью 3–4 сут.

#### 5. Пробоподготовка

В эксперименте используются нативные образцы отходов в гомогенизированном состоянии. Твердые отходы должны быть измельчены.

Для эксперимента используются пластиковые контейнеры объемом 500–1000 мл.

В качестве растворителя используют отстоянную водопроводную воду. Она должна соответствовать стандартам питьевой воды. Хлорированная питьевая вода отстаивается в чистом сосуде из инертных материалов не менее чем 1 сут.

6. *Постановка эксперимента.* Эксперимент проводится в два этапа: предварительный и основной.

6.1. Длительность предварительного этапа — 3-е сут; основного — 7 сут.

Эксперименты проводятся при комнатной температуре 20–25°C, естественной освещенности. В помещениях без естественного освещения продолжительность циклов свет-темнота должна составлять примерно 10/14 ч.

6.2. *Оптимальное соотношение количества червей к массе субстрата.* В предварительном этапе эксперимента соотношение составляет 3 особи на 300 г среды; в основном — 7–10 особей на 500–600 г среды.

6.3. Предварительный этап проводится с целью выявления биологически эффективных концентраций.

6.3.1. В ходе предварительного этапа выполняется подбор концентраций для основного этапа. На предварительном этапе соблюдается одна повторность.

6.3.2. Готовый модельный почвенно-питательный субстрат помещают в мелкие контейнеры емкостью 500–1000 мл. В контейнеры вносят отходы в определенных концентрациях: 0,1; 1,0; 10,0; 100,0 и 1000,0 г/кг. В итоге в каждом контейнере должно быть 300 г модельной среды с отходами. Концентрация 1000,0 г/кг считается максимально насыщенной. Количество концентраций может быть разным. Целесообразно использовать 3–5 концентраций. В эти же сутки после 2-часовой экспозиции отходов в модельную среду вносятся взрослые особи червей, по 3 особи на 300 г модельной среды. Пробы с червями инкубируются 3-е сут при комнатной температуре в условиях поддержания постоянной влажности на уровне 70%. В течение этого времени наблюдаются изменения в поведенческих реакциях червей и регистрируется их гибель. Срок регистрации гибели (в первые часы, спустя 1, 2, 3-е сут) является свидетельством степени токсичности испытуемых концентраций отходов.

6.3.3. Результаты предварительного эксперимента отмечаются в протоколе. Например: концентрация 1000,0 г/кг вызывала моментальную гибель животных; при концентрации 100,0 г/кг наблюдалось снижение активности, ползание по поверхности, отсутствие зарывания в субстрат, гибель в течение первых суток; при действии 10,0; 1,0; 0,1 г/кг поведенческие реакции червей не отличались от контроля; при концентрации 10,0 г/кг на 3-е сут

отмечалась гибель всех особей; 0,1 г/кг является недействующей концентрацией по эффекту гибели.

#### 6.4. Основной этап

В ходе основного этапа эксперимента испытываются отходы в диапазоне биологически эффективных концентраций.

6.4.1. В модельный почвенно-питательный субстрат вносят гомогенизированный образец отходов в определенных концентрациях, например, 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10,0 и 100,0 г/кг. Регистрируют вес контейнеров с готовой модельной средой для последующего контроля влажности. Вермикультуру вносят в контейнеры спустя 1 сут. Отбирают взрослые особи червей, взвешивают каждую особь.

6.4.2. Для оценки способности органосодержащих отходов к биодegradации и инактивации гуминовыми кислотами отходы выдерживают в субстрате на протяжении 3-х недель или более длительного срока. В течение указанного периода происходит биоразложение компонентов отходов под действием естественной микрофлоры почвенно-питательного субстрата и нейтрализация тяжелых металлов посредством взаимодействия с гуминовым веществом почвы. По истечении срока в контейнеры вносится вермикультура.

6.4.3. В качестве отрицательного контроля используют почвенно-питательный субстрат с вермикультурой при тех же условиях без внесения токсиканта.

#### 6.4.4. Эксперимент выполняется в трех повторностях

В ходе основного эксперимента в каждый контейнер вносят по 7–10 половозрелых особей червей на 500–600 г модельной среды. Пробы с червями инкубируются при комнатной температуре в условиях поддержания постоянной влажности на уровне 65–70% и рН среды 7,4–7,7 на протяжении 7 сут.

В течение этого времени наблюдаются изменения в поведенческих реакциях и регистрируется гибель животных.

Показатель поведенческих реакций животных – скорость их зарывания в грунт. Критерием токсичности является отсутствие зарывания червей в почву, активное ползание по ее поверхности и попытки покинуть посуду.

В конце эксперимента каждую особь взвешивают. Рассчитывают прирост коллумелярного веса в опытных концентрациях и контроле.

6.5. В результате основного этапа эксперимента регистрируются количественные и качественные оценочные показатели.

Основным параметром токсичности отходов на *Eisenia foetida* является  $LC_{50}$ , рассчитанная по гибели на 7-е сут. Расчет показателя проводится по средним из трех повторностей при наличии дозозависимого эффекта в 4-х и более концентрациях. Для определения  $LC_{50}$  применяют пробит-анализ по методу Финни.

Влияние на физиологические параметры оценивается по изменению прироста коллумелярного веса особей опытных групп по сравнению

с контролем. Отмечаются концентрации, в которых выявляется достоверное отличие прироста коллумелярного веса от контроля.

Качественными показателями являются патологические поведенческие реакции организмов и видимые морфологические изменения организмов: нарушения на поверхности слизистой оболочки, изменение цвета.

7. Критерии достоверности теста:

- допустимая гибель в контроле не более 1 особи;
- коэффициент вариации показателей гибели из трех повторностей — не более 30%.

8. Ранжирование отходов по классам опасности

Класс опасности отходов устанавливается по величине  $LC_{50}$  в соответствии с критериями, представленными в приложении 9 к настоящей инструкции.

В случае отсутствия дозозависимого эффекта проявлением токсического эффекта отходов считается:

- гибель как минимум 2-х особей при действии наиболее насыщенной концентрации;
- достоверное снижение прироста коллумелярного веса и проявление патологических поведенческих реакций организмов.

Если токсический эффект зафиксирован только при действии максимально насыщенной концентрации, а разведения проявляют индифферентность, то отходам присваивается 4-й класс опасности.

Если токсический эффект не зафиксирован на максимально насыщенной концентрации, то отходы относятся к неопасным.

## ГЛАВА 9 МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ОТХОДОВ НА ТЕПЛОКРОВНЫХ ЖИВОТНЫХ

1. Определение токсичности на теплокровных животных необходимо для оценки потенциальных неблагоприятных эффектов воздействия отходов на организм человека. Выполняются острый и подострый эксперименты.

2. Использование лабораторных животных в токсикологическом эксперименте должно основываться на принципах гуманного обращения с животными.

Условия содержания лабораторных животных должны соответствовать требованиям действующих технических нормативных правовых актов, регламентирующих положения лабораторной практики.

Условия должны быть стандартными, обеспечивающими надлежащее состояние здоровья животных, и учитывать современные требования к параметрам микроклимата, режиму освещения, площади размещения и конструкции клеток и боксов. Температура помещения должна составлять 19–25°C. Относительная влажность должна быть в пределах 30–70%, за исключением времени уборки комнаты; оптимальное значение влажности 50–60%. Искусственное освещение должно создавать режим чередования светлого

и темного времени суток. При кормлении используется обычная лабораторная диета с неограниченным количеством питьевой воды. Животные должны содержаться в клетках группами, их количество в группах не должно препятствовать наблюдению за каждым из них.

### 3. Токсичность на теплокровных животных в остром эксперименте

В зависимости от физико-химической характеристики отходов и предполагаемого сценария воздействия на человека токсичность отходов на теплокровных животных может устанавливаться при различных путях поступления в организм животного: внутрижелудочном введении, ингаляционной заправке, накожном нанесении.

3.1. Острый токсикологический эксперимент при внутрижелудочном введении проводится методом «фиксированной дозы». Данный метод предназначен для установления класса опасности отходов по реакциям животных (гибель, интоксикация) на введение независимо от характера компонентов отходов и степени их идентификации.

#### 3.1.1. Подготовка к проведению эксперимента

##### 3.1.1.1. Подготовка животных к проведению эксперимента.

В эксперименте используют белых рандомбредных крыс одного пола (предпочтительно самок). Формируют опытные группы по 5 животных. Отбирают здоровые половозрелые особи массой 180–220 г. Перед внутрижелудочным введением животных необходимо ограничить в пище (отменить прием пищи накануне) без ограничения питья. Животных помечают для идентификации и регистрируют их вес.

3.1.1.2. Проведению испытания должен предшествовать анализ информации о компонентах отходов, а также токсикологических данных о структурно родственных веществах. Цель анализа — сформировать представление о вероятной степени токсичности отходов. Это необходимо для выбора подходящего стартового разведения.

##### 3.1.1.3. Подготовка отходов к проведению эксперимента

Исследованию подлежит нативный гомогенизированный образец отходов либо вытяжка с максимальным насыщением.

При приготовлении вытяжки с максимальным насыщением используется соотношение пробы отходов и растворителя 1 г : 1 мл. В случае если такое соотношение получить невозможно, необходимо соблюдать иное, обеспечивающее получение максимального насыщения соотношение, например, 1 г : 2 мл, 1 г : 3 мл, 1 г : 5 мл, 1 г : 10 мл и т. д. Вытяжка выдерживается в течение 3-х сут при комнатной температуре ( $20 \pm 5^\circ\text{C}$ ). В течение всего времени приготовления ее необходимо периодически встряхивать и перемешивать. Готовая вытяжка сливается и используется для тестирования.

Нерастворимые в воде отходы, особенно те, которые наряду с тяжелыми металлами содержат загрязнители органического происхождения, можно растворять в Твин-80 или с использованием растворителей, начиная от наименее токсичных (диметилсульфоксид в конечной концентрации до 5%, этиловый спирт, полиэтиленгликоль и др.); для перорального введения

грызунам порошкообразных веществ можно использовать растительное масло (кукурузное) или 1,0–2,0% крахмальный клейстер.

Предпочтительно использовать нативный образец отходов. Измеряют рН образца отходов или вытяжки с помощью рН-метра.

Из отходов в нативном виде либо вытяжки из отходов с максимальным насыщением готовят стандартные разведения с соотношениями отход (вытяжка) / дистиллированная вода:

1 г : 10 мл;

1 г : 100 мл;

1 г : 1000 мл.

### 3.1.2. Собственно проведение эксперимента

В ходе эксперимента группе из 5 животных внутрижелудочно однократно с помощью иглы-зонда вводят фиксированные объемы испытуемого образца отхода 3 мл/200 г массы тела крысы. Стартовое разведение подбирается таким образом, чтобы при стартовом введении наблюдались некоторые токсические эффекты: признаки интоксикации или гибель части животных. В зависимости от наличия или отсутствия токсических эффектов в испытуемой группе животных далее другой группе животных вводят разведения с более высокими или более низкими концентрациями. Процедура продолжается до тех пор, пока концентрация не выявит выраженную токсичность, а также до тех пор, пока не будет наблюдаться отсутствие токсических эффектов при введении наибольшей концентрации.

Временной интервал между введением каждой последующей дозы должен быть достаточным, чтобы установить токсические эффекты от введения предыдущей дозы.

Рекомендуемые разведения для стартового введения животным в зависимости от предполагаемого класса опасности отходов:

4 класс — без разведения;

3 класс — разведение 1:10;

2 класс — разведение 1:100;

1 класс — разведение 1: 1000.

### 3.1.3. Наблюдение и оценка

#### 3.1.3.1. Рекомендуемый период наблюдения — 14 дней.

При наблюдении за подопытными животными необходимо регистрировать их поведение, состояние, внешний вид, наличие аппетита, уровень водопотребления, степень проявления реакции на внешние раздражители. Регистрируются наличие рвоты, видимые кровоизлияния, частота дыхания, мышечные подергивания, тремор, судороги, парезы, параличи, температура тела, окраска ушей, конечностей, глаз, развитие наркотического или коматозного состояния и других симптомов интоксикации. Обращают внимание на сроки гибели животных.

3.1.3.2. Оценка реакций на введение отходов и отнесение их к определенному классу опасности по свойству «токсичность» проводится по схеме, приведенной в приложении 10 к настоящей инструкции.

Отходы не классифицируются как неопасные на основании метода «фиксированной дозы».

### 3.2. Острый токсикологический эксперимент при статической ингаляционной заправке

В результате статической ингаляционной заправки устанавливается способность отходов, содержащих токсичные летучие компоненты, вызывать гибель или клинические симптомы интоксикации лабораторных животных, что позволит судить о степени их потенциальной опасности в плане возможности возникновения острого отравления. Статическая ингаляционная заправка проводится по утвержденным методикам.

Класс опасности отходов оценивается по показателю  $LC_{50}$  при ингаляционном воздействии в  $мг/м^3$  согласно ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

### 4. Токсичность на теплокровных животных в подостром эксперименте

4.1. Подострый токсикологический эксперимент проводится с целью установления проявления возможного токсического действия отходов при длительном воздействии на организм человека и теплокровных животных.

Изучение токсичности при многократном введении необходимо проводить с учетом вероятного пути воздействия отходов на организм человека: внутрижелудочно, ингаляционно, чрескожно.

Подострый токсикологический эксперимент с внутрижелудочным многократным введением проводится для тех отходов, которые по результатам острого эксперимента отнесены к 4-му классу опасности.

4.2. При планировании эксперимента должен учитываться принцип использования минимального количества животных. Оптимальное количество животных в группе — 7–10 особей. Продолжительность введения 1–2 мес. по 5 раз в неделю. Доза для введения подбирается экспертом индивидуально в каждом отдельном случае. Доза должна составлять примерно 1/10 или 1/5 от введенной в остром эксперименте. Вводимый крысам объем жидкости не должен превышать 1 мл/100 г массы тела. Контрольной группе животных вводится дистиллированная вода либо растворитель в эквивалентных объемах.

4.3. При оценке результатов проводится сравнение каждой опытной группы животных с контрольной. Воздействие отходов на организм оценивается по наличию признаков интоксикации и/или по статистически достоверным изменениям показателей функционального состояния организма (гематологическим, биохимическим, иммунологическим и др.), определяющим достоверный эффект воздействия. Выбор показателей, отражающих патологические изменения в организме животного, осуществляется экспертом на основе анализа информации об исследуемом веществе. Учитывается также гибель животных.

5. В случае присутствия в отходах веществ с неизвестными токсикологическими характеристиками в схему оценки можно включать тесты для изучения сенсibiliзирующего действия и отдаленных эффектов (тератогенный, эмбриотропный, гонадотропный, мутагенный, канцерогенный).

Объем исследований определяется степенью изученности отдельных компонентов отходов в отношении их способности вызывать те или иные виды специфических и отдаленных эффектов. Для проведения исследований применяют утвержденные методики. Например, сенсibiliзирующая активность отходов изучается в провокационном внутрикожном тесте опухания лапы мыши.

## ГЛАВА 10 МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ОТХОДОВ В МИКРОЯДЕРНОМ ТЕСТЕ

1. Метод основан на микроскопической регистрации клеток с микроядрами в препаратах мантийной жидкости брюхоногого моллюска после экспозиции в растворе с отходами.

В качестве тест-объекта используют брюхоногого моллюска *Lymnaea stagnalis*.

### 1.1. Содержание животных

Моллюсков содержат в отстоянной водопроводной воде, в отдельных стаканах емкостью около 200 мл, при необходимости (в холодное время года) помещают в термостат при температуре 22–24°C. Кормят в летнее время листьями одуванчика; в зимнее — мелко порезанными листьями капусты, салатом.

1.2. Пробоподготовка отходов для эксперимента проводится аналогично подготовке проб для токсикологических экспериментов. Необходимо довести рН модельной среды до оптимальных параметров естественной среды обитания 6,0–7,5 путем разведения водой.

1.3. Определение подпороговых концентраций по показателю летальности

В эксперименте используют подпороговые концентрации отходов, не вызывающие гибель моллюска и токсических эффектов.

Для их определения проводят анализ токсического действия растворов отходов определенных концентраций с учетом летальности животных и признаков интоксикации. Длительность экспозиции составляет 5 сут. Эффекты оценивают визуально.

### 1.4. Ход эксперимента

1.4.1. Эксперимент выполняется в двух повторностях. В два стеклянных сосуда наливают по 500 мл раствора отходов подпороговых концентраций. В качестве растворителя используется отстоянная водопроводная вода. Контролем служат аналогичные емкости, содержащие отстоянную водопроводную воду и кварцевый песок.

В каждый сосуд помещают по 4–5 животных, рандомизированных по весу. На 6-е сут у животных забирают мантийную жидкость путем раздражения ноги кисточкой. Забор мантийной жидкости можно проводить несколько раз, так как это не приводит к гибели животных.

#### 1.4.2. Приготовление препаратов мантийной жидкости

Мантийную жидкость собирают в пробирку с метанолом или этанолом, в котором образец можно хранить до 1 года. Перед приготовлением препаратов добавляют уксусную кислоту (3:1). Фиксированные клетки центрифугируют при 1000 об./мин в течение 10 мин, удаляют надосадочную жидкость. Осадок ресуспендируют встряхиванием и раскапывают тонкой пипеткой на замороженное предметное стекло. Препараты окрашивают красителем Гимза.

#### 1.4.3. Анализ препаратов

Митотическая активность пойкилотермных животных невысокая. Поэтому необходимо проводить учет клеток с микроядрами и признаками апоптоза. Анализ клеток мантийной жидкости облегчен морфологическим сходством большинства клеток.

Спонтанная частота клеток с микроядрами составляет 0,1–0,2%.

Препараты анализируют при использовании микроскопии в проходящем свете. При исследовании необходимо отличать микроядра от фрагментов хроматина. При образовании микроядер, как правило, сохраняется форма ядра, тогда как при фрагментации хроматина целостность ядра нарушается. При этом микроскопическая картина события характеризуется изрезанной неровной поверхностью ядра.

При проведении микроядерного теста необходимо учитывать не менее 1000 клеток на одно животное, минимальное количество клеток в группе — 4000.

#### 1.5. Оценка результатов

Критерием генотоксичности является статистически значимое при 95% доверительном интервале увеличение числа клеток с микроядрами в опытной группе по сравнению с контрольной.



**Критерии отнесения отходов к классам опасности по фитотоксичности**

Показатель	Классы опасности отходов			
	1-й класс	2-й класс	3-й класс	4-й класс
Величина $ER_{50}$	$>10^2$	$>10-10^2$	$>1-10$	$\leq 1$

**Пример расчета класса опасности отходов производства  
по фитотоксичности**

Рабочие растворы ( $R$ )	Средняя длина корней ( $L_{cp}$ ) мм	Средняя длина корней ( $L_{cp}$ ), % к контролю	Фитоэффект, %	Тест-реакция
Контроль	81,92	81,92	100	Норма
1000	78,89	78,89	96,3	Норма
100	60,18	60,18	73,46	Эффект торможения
10	48,92	48,92	59,72	
5	44,12	44,12	53,86	
2	21,55	21,55	26,31	
Нативный экстракт	0	0	100	Гибель семян

**Результаты расчета показателей по определению фитотоксичности  
отходов**

$\lg R = -0,024 \cdot 20 + 2,63$	$\lg R = -0,024 \cdot 50 + 2,63$
$\lg R = 2$	$\lg R = 1,48$
$\text{Lim}R = 100$	$ER_{50} = 30$

В соответствии с критериями  $ER_{50}$  отходы по фитотоксичности относятся к высокоопасным (2-й класс опасности).

**Приготовление растворов отходов для исследования  
в хроническом эксперименте на *Tetrahymena pyriformis* W**

Исходный раствор		H <sub>2</sub> O, мл	Рабочий раствор		Питательная среда Б, мл	Конечный раствор, мг/мл	№ проб
мг/мл	мл		мг/мл	мл			
5×10 <sup>2</sup>	–	–	5×10 <sup>2</sup>	2,0	8,0	10 <sup>2</sup>	12
5×10 <sup>2</sup>	2,0	8,0	10 <sup>2</sup>	1,0	9,0	10 <sup>1</sup>	11
10 <sup>2</sup>	1,0	9,0	10 <sup>1</sup>	1,0	9,0	10 <sup>0</sup>	10
10 <sup>1</sup>	1,0	9,0	10 <sup>0</sup>	1,0	9,0	10 <sup>-1</sup>	9
10 <sup>0</sup>	1,0	9,0	10 <sup>-1</sup>	1,0	9,0	10 <sup>-2</sup>	8
10 <sup>-1</sup>	1,0	9,0	10 <sup>-2</sup>	1,0	9,0	10 <sup>-3</sup>	7
10 <sup>-2</sup>	1,0	9,0	10 <sup>-3</sup>	1,0	9,0	10 <sup>-4</sup>	6
10 <sup>-3</sup>	1,0	9,0	10 <sup>-4</sup>	1,0	9,0	10 <sup>-5</sup>	5
10 <sup>-4</sup>	1,0	9,0	10 <sup>-5</sup>	1,0	9,0	10 <sup>-6</sup>	4
10 <sup>-5</sup>	1,0	9,0	10 <sup>-6</sup>	1,0	9,0	10 <sup>-7</sup>	3
10 <sup>-6</sup>	1,0	9,0	10 <sup>-7</sup>	1,0	9,0	10 <sup>-8</sup>	2
10 <sup>-7</sup>	1,0	9,0	10 <sup>-8</sup>	1,0	9,0	10 <sup>-9</sup>	1
Контроль		H <sub>2</sub> O	0	1,0	9,0	0	К

**Шкала оценки мутагенной активности отходов  
на *Tetrahymena pyriformis* W**

Гибель инфузорий, %	Мутагенная активность	
	по выраженности эффекта	баллы
100	отсутствует	0
50–100	слабо выраженная	1
25–50	умеренно выраженная	2
0–25	выраженная	3

**Критерии отнесения отходов к классам опасности  
по показателям их токсичности на *tetrahymena pyriformis* w**

Показатель	Классы опасности отходов			
	1-й класс	2-й класс	3-й класс	4-й класс
ЛД <sub>50</sub> , мг/мл	менее 0,1	0,1–1,0	1,1–20	более 20
Ккум <sub>ас.</sub>	менее 0,1	0,10–0,30	0,31–0,50	более 0,50
Ккум <sub>chr.</sub>	менее 0,1	0,10–0,30	0,31–0,50	более 0,50
МНД, мг/мл	менее 10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup> –10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup> –10 <sup>-1</sup>	более 10 <sup>-1</sup>
ЛД <sub>50</sub> /МНД	более 10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup> –10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup> –10 <sup>4</sup>	менее 10 <sup>4</sup>

Отходы относятся к неопасным (не проявляют токсических свойств на *Tetrahymena pyriformis* W) в случае отсутствия достоверных отличий ( $p \leq 0,05$ ) от контроля в исследованной максимально насыщенной концентрации.

**Пример оценки эмбриотоксического действия отходов на кладках *Lymnaea stagnalis* (анализ усредненных из трех повторностей данных по тестированию отходов)**

Концентрация (мг/мл)	Успешный выклев, %	CV, % коэффициент вариации	Угнетение выклева, %
Контроль	90,3	1,4	–
0,55 мг/мл	86,3	6	4,4
1,66 мг/мл	79,4	1,5	12
5,0 мг/мл	44,9	7	50,2
10,0 мг/мл	8,5	19	90,5

Среднеэффективная концентрация ( $EC_{50}$ ) = 5,35 ( $\pm 0,84$ ) мг/мл.

Пороговая концентрация ( $EC_{15}$ ) = 1,69 мг/мл.

Зона острого действия = 3,16.

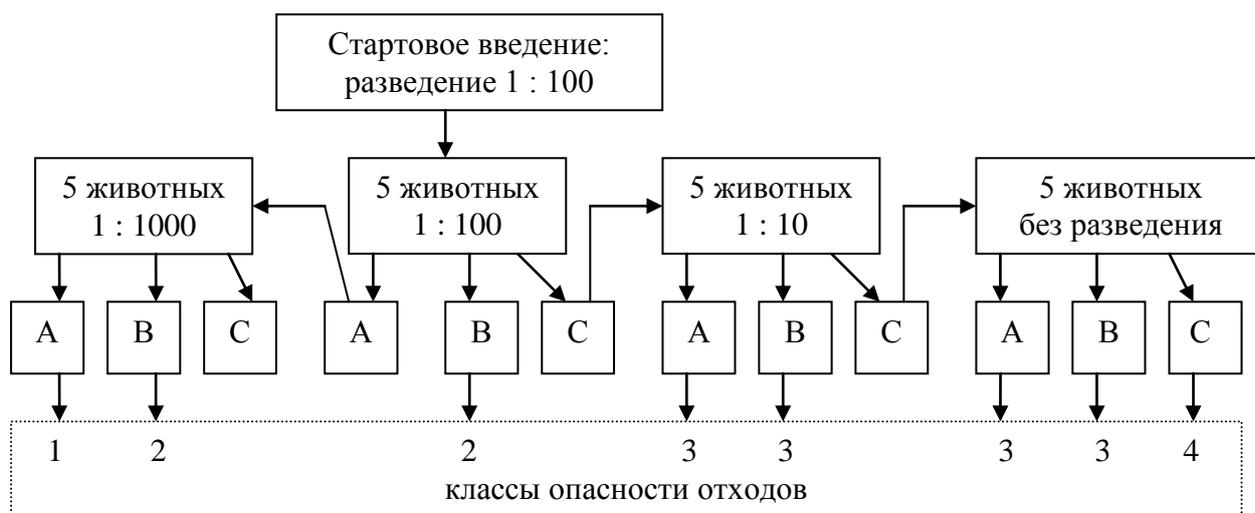
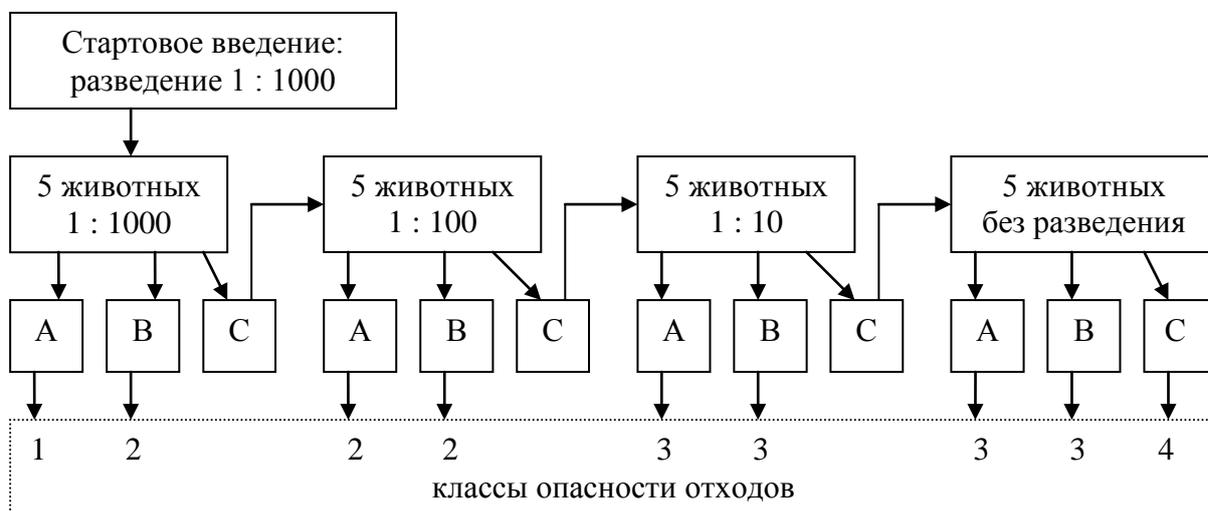
**Критерии отнесения отходов к классам опасности  
по показателям эмбриотоксичности на кладках *lymnaea stagnalis***

Показатель	Классы опасности отходов			
	1-й класс	2-й класс	3-й класс	4-й класс
EC <sub>50</sub> , мг/мл	менее 0,1	0,1–1,0	1,1–20	более 20
пороговая концентрация (EC <sub>15</sub> ), мг/мл	менее 10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup> –<10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-3</sup> –0,5	более 0,5
EC <sub>50</sub> / EC <sub>15</sub>	более 10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> –>10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> –10	менее 10

**Критерии отнесения отходов к классам опасности  
по показателю токсичности на *eisenia foetida***

Показатель	Степень и классы опасности отходов				
	опасные				неопасные
	1-й класс	2-й класс	3-й класс	4-й класс	
Токсичность на <i>Eisenia foetida</i> , $LC_{50}$	$\leq 0,1$	$>0,1-1,0$	$1,1-50,0$	$\geq 50,0$	отсутствие

**Схема оценки токсичности отходов в остром эксперименте  
на теплокровных животных методом «фиксированной дозы»**



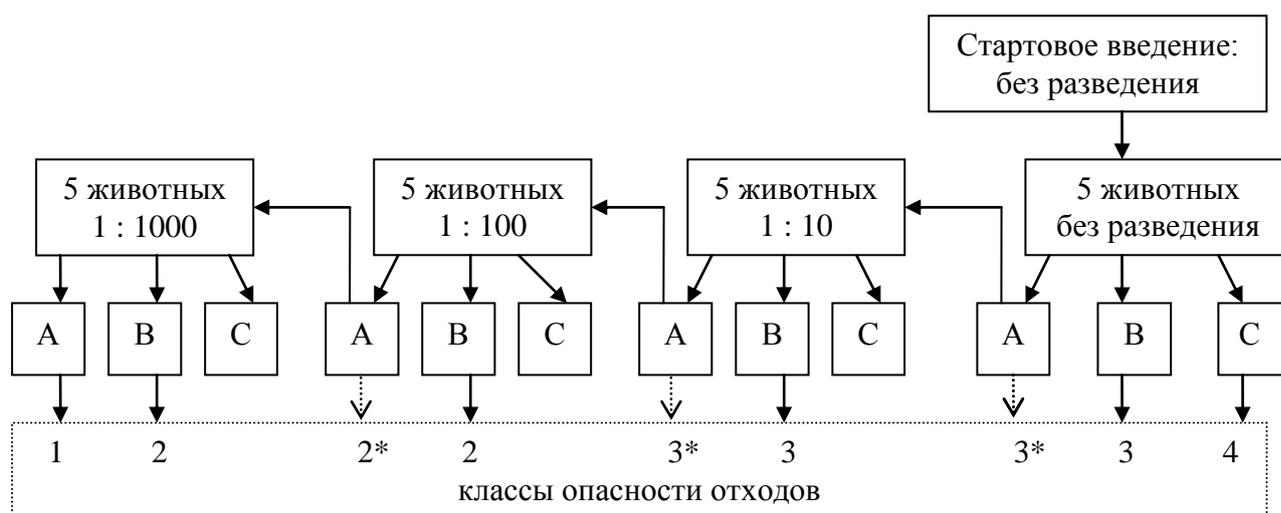
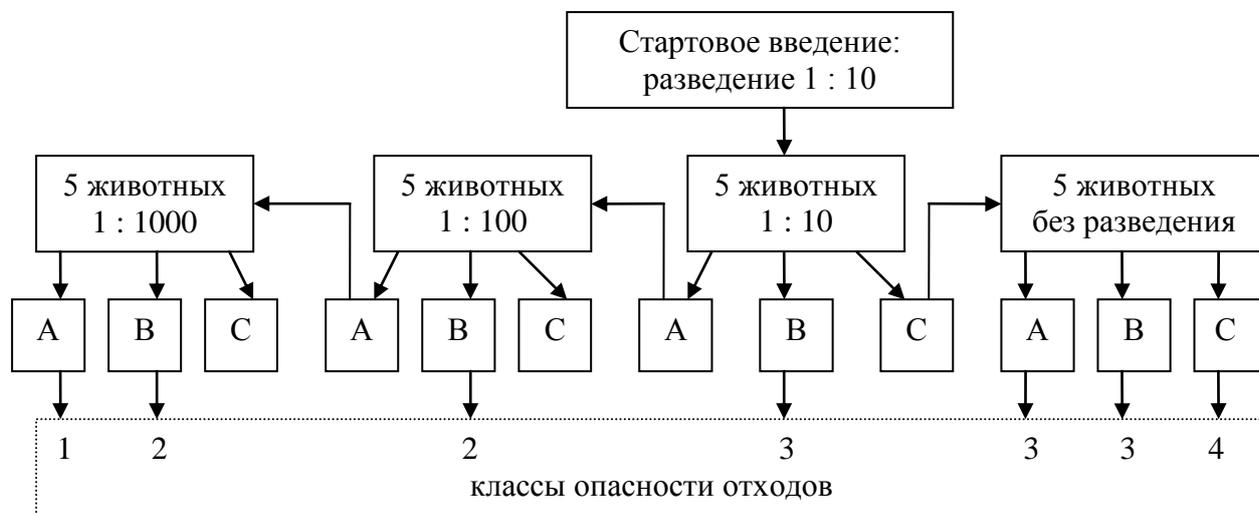
Результат:

**A** — гибель 2-х и более животных;

**B** — гибель 1-го животного (не более) и/или 1 животное и более с признаками интоксикации;

**C** – отсутствие токсических эффектов.

**Схема оценки токсичности отходов в остром эксперименте  
на теплокровных животных методом «фиксированной дозы»  
(продолжение)**



Результат:

**А** — гибель 2-х и более животных;

**В** — гибель 1-го животного (не более) и/или 1 животное и более с признаками интоксикации;

**С** — отсутствие токсических эффектов.

\*рекомендуется удостовериться в отсутствии более выраженного токсического эффекта, используя разведения, перед установлением класса опасности отходов.

## Перечень взаимосвязанных методик

1. ГОСТ 28268-89. Почва. Методы определения влажности, максимальной гигроскопической влажности и влажности устойчивого завядания растений.
2. ГОСТ 26713-85. Удобрения органические. Метод определения влаги и сухого остатка.
3. СТБ 2042-2010. Торф. Методы определения влаги и зольности.
4. Инструкция 4.1.10-14-5-2006. Методика автоклавной пробоподготовки продовольственного сырья, пищевых продуктов, биологических материалов, косметической продукции, почвы, отходов производства и потребления для определения содержания в них токсичных и минеральных элементов, утв. постановлением гл. гос. сан. врача РБ № 18 от 17.02.2006.
5. СТБ ИСО 10523-2009. Качество воды. Определение рН.
6. СТБ ИСО 9963-1-2009. Качество воды. Определение щелочности. Часть 1. Определение общей и составной щелочности.
7. СТБ ИСО 9963-2-2012. Качество воды. Определение щелочности. Часть 2. Определение карбонатной щелочности.
8. ГОСТ 18164-72. Вода питьевая. Метод определения содержания сухого остатка.
9. Методика 2.2.50.2. МВИ концентрации растворенных веществ (сухой остаток) гравиметрическим методом // Сборник методик выполнения измерений, допущенных к применению при выполнении измерений в области охраны окружающей среды. – 4-е перераб. и доп. изд. – Минск : БелНИЦ «Экология», 2011. – Ч. I. – С. 255.
10. СТБ 17.13.05-11-2009/ ISO 15705:2002. Охрана окружающей среды и природопользование. Аналитический контроль и мониторинг. Качество воды. Определение показателя химического потребления кислорода (Метод с использованием термостойких реакционных пробирок).
11. Методика 2.2.58.3. МВИ ХПК бихроматным методом // Сборник методик выполнения измерений, допущенных к применению при выполнении измерений в области охраны окружающей среды. – 4-е перераб. и доп. изд. – Минск : БелНИЦ «Экология», 2011. – Ч. II. – С. 258.
12. Методика 2.1.45. МВИ ХПК (химическое потребление кислорода титриметрическим методом) // Сборник методик выполнения измерений, допущенных к применению при выполнении измерений в области охраны окружающей среды. – 4-е перераб. и доп. изд. – Минск : БелНИЦ «Экология», 2011. – Ч. III. – С. 149.
13. Методика 2.2.58.1. МВИ ХПК бихроматным методом // Сборник методик выполнения измерений, допущенных к применению при выполнении измерений в области охраны окружающей среды. – 4-е перераб. и доп. изд. – Минск : БелНИЦ «Экология», 2011. – Ч. III. – С. 239.
14. СТБ 17.13.05-22-2011/ISO 5815-1:2003. Охрана окружающей среды и природопользование Аналитический контроль и мониторинг. Качество воды. Определение биохимического потребления кислорода после  $n$  дней (БПК <sub>$n$</sub> ). – Ч. 1: Метод с разбавлением и добавлением аллилтиомочевины.
15. СТБ 17.13.05-23-2011/ISO 5815-2:2003. Охрана окружающей среды и природопользование. Аналитический контроль и мониторинг. Качество воды. Определение биохимического потребления кислорода после  $n$  дней (БПК <sub>$n$</sub> ). – Ч. 2 : Метод без разбавления проб.