

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель министра здравоохранения –
Главный государственный санитарный
врач Республики Беларусь, д.м.н,
профессор



М.И. Римжа
М.И. Римжа

2007г.

регистрационный № 021-0407

**ИНСТРУКЦИЯ
ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ
ГИГИЕНИЧЕСКИХ НОРМАТИВОВ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВ**

Учреждение-разработчик: ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены»

Авторы: доктор медицинских наук, профессор С.М. Соколов, кандидат медицинских наук А.И. Котеленец, кандидат медицинских наук И.И. Ильюкова, кандидат медицинских наук С.Ю. Петрова, кандидат биологических наук А.М. Войтович, кандидат географических наук О.В.Лукашев, доктор географических наук, профессор В.С.Хомич. Г.В.Дудко, Зенькевич В.В.

Минск – 2007

ГЛАВА 1 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая инструкция устанавливает порядок определения предельно допустимой концентрации экзогенных химических веществ (далее – ЭХВ) для различных функциональных зон почвы населенных мест, приведенных в приложении 1 инструкции.

2. Настоящая инструкция предназначена для использования в практике работы государственного санитарного надзора, Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды, научных организаций, для осуществления мониторинга и контроля качества почвы, при согласовании строительных проектов, определения и прогноза степени опасности почв для здоровья и условий проживания населения, разработки мероприятий по их рекультивации, градостроительных проектов общего и детального планирования.

3. Опасность загрязненной почвы определяется:
источником вторичного загрязнения приземного слоя атмосферного воздуха и источников водопользования;
возможным отрицательным воздействием при непосредственном контакте с человеком и через загрязненные пищевые продукты;
отрицательным влиянием на биологическую активность почвы и процессы ее самоочищения.

ГЛАВА 2 ТЕРМИНЫ И ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Санитарное состояние почвы – совокупность физико-химических и биологических свойств почвы, определяющих качество и степень ее безопасности в эпидемическом и гигиеническом отношениях.

Буферная способность почвы – способность почвы поддерживать химическое состояние на неизменном уровне при воздействии на почву потока химического вещества.

Приоритетный компонент загрязнения почвы – вещество или биологический агент, подлежащий контролю в первую очередь.

Предельно допустимая концентрация (далее - ПДК) экзогенного химического вещества в почве – максимальное количество вещества (в мг/кг абсолютно сухой почвы), которое не вызывает прямого или опосредованного отрицательного влияния на здоровье настоящего и последующих поколений человека и экосистему.

Подпороговые концентрации загрязнителей в почве – это концентрации, при которых их переход в растения не приводит к превышению максимально допустимого уровня (далее - МДУ) для продуктов питания, миграция в подземные воды не выше ПДК для воды

питьевой, эмиссия в воздух атмосферы не больше норматива для атмосферного воздуха, отсутствует фитотоксичность и отрицательное влияние на процессы самоочищения почвы и ее микробоценоз.

Почва (земля) – самостоятельное естественноисторическое органоминеральное природное тело, возникшее на поверхности земли в результате длительного воздействия биотических, абиотических и антропогенных факторов, состоящее из твердых минеральных и органических частиц, воды и воздуха и имеющее специфические генетико-морфологические признаки, свойства, создающие для роста и развития растений соответствующие условия.

Загрязнение почвы - накопление в почве веществ и организмов в результате антропогенной деятельности в таких количествах, которых понижают технологическую, питательную и гигиеническо-санитарную ценность выращиваемых культур и качество других природных объектов.

Глобальное загрязнение почвы – загрязнение почвы, возникающее в результате дальнего переноса загрязняющего вещества в атмосфере на расстояния, превышающие 1000км от любых источников загрязнения.

Региональное загрязнение почвы - загрязнение почвы, возникающее вследствие переноса загрязняющего вещества в атмосфере на расстояния более 40км от техногенных и 10км от сельскохозяйственных источников загрязнения.

Локальное загрязнение почвы – загрязнение почвы вблизи одного или совокупности нескольких источников загрязнения.

Транслокационный показатель – характеризует переход вещества из почвы в растение; фитотоксический – показатель токсического действия ЭХВ на семена, проростки, растения; миграционный водный показатель характеризует способность перехода вещества из почвы в грунтовые воды и водоисточники; миграционный воздушный показатель вредности характеризует переход вещества из почвы в атмосферный воздух, и общесанитарный показатель вредности характеризует влияние загрязняющего вещества на самоочищающую способность почвы и ее биологическую активность.

Ориентировочно допустимая концентрация (далее - ОДК) – государственный временный гигиенический норматив максимального допустимого содержания экзогенного химического вещества в почве, определяемый расчетным путем.

Класс опасности – градация химических веществ по степени возможного отрицательного воздействия на почву, растения, животных и человека.

Апоптоз – форма гибели клетки, проявляющаяся в уменьшении ее размера, конденсации и фрагментации хроматина, уплотнении

наружной и цитоплазматической мембран без выхода содержимого клетки в окружающую среду.

Доза средняя смертельная (далее - DL_{50}) – количество яда, вызывающее гибель 50% стандартной группы подопытных животных при определенном сроке последующего наблюдения.

Максимально недействующая доза токсиканта (далее – МНД), в мг/мл, определяемая в хроническом и пролонгированном экспериментах.

Токсичность – это свойства, которые определяют способность химического вещества оказывать вредное действие на живые организмы разными способами, кроме механических.

Техногенный ландшафтно-геохимический фон химического элемента в почве функциональной зоны — исторически сложившееся под действием естественных и техногенных факторов к определённом моменту времени его среднее валовое содержание в верхнем (20 - 25см) слое почвы (грунта).

ГЛАВА 3 ПОРЯДОК ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ГИГИЕНИЧЕСКИХ НОРМАТИВОВ ЭХВ В ПОЧВЕ

4. Гигиеническое нормирование базируется на определении безопасного уровня воздействия экзогенного химического вещества, выше которого появляется риск возникновения негативных последствий для человека и окружающей среды.

5. Схема определения дифференцированных гигиенических нормативов экзогенных химических веществ в почвах населенных мест различных функциональных зон приведена в приложении 2 настоящей инструкции.

6. На первом этапе проводится сбор и анализ информации о территории населенного пункта, определяется характер и уровень основных источников загрязнения и устанавливаются границы функциональной зоны согласно СНБ 3.01.04-02 «Строительные нормы Республики Беларусь. Градостроительство. Планировка и застройка населенных пунктов, утвержденных приказом Министерства архитектуры и строительства Республики Беларусь от 31 декабря 2002г.- №114.- Минск, 2003». Перечень приоритетных показателей химического загрязнения почв определяется исходя из специфики источников загрязнения, определяющих характер (состав и уровень) загрязнения изучаемой территории.

На втором этапе проводится отбор проб почвы каждой функциональной зоны населенного пункта.

На третьем этапе определяется техногенный ландшафтно-геохимический фон ЭХВ в почве каждой функциональной зоны населенного пункта.

На четвертом этапе устанавливается ПДК ЭХВ для каждой функциональной зоны населенного пункта на основании определения подпороговых концентраций экзогенных химических веществ в почве (в мг/кг абсолютно сухой почвы) по следующим критериям вредности: фитотоксическому, транслокационному /фитоаккумуляционному/, общесанитарному, миграционному водному, миграционному воздушному и токсикологическому с учетом наиболее значимых критериев вредности для каждой функциональной зоны и техногенного ландшафтно-географического фона ЭХВ в каждой функциональной зоне населенного пункта.

ГЛАВА 4

ОТБОР ПРОБ ПОЧВЫ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

7. Места отбора проб предварительно отмечаются на картосхеме, отражающей структуру городского ландшафта. Пробная площадка должна располагаться на типичном для изучаемой территории месте. При неоднородности рельефа площадки выбирают по элементам рельефа. На территорию, подлежащую контролю, составляют описание с указанием адреса, точки отбора и источников загрязнения, растительного покрова, функциональной зоны и других данных, необходимых для правильной оценки и трактовки результатов анализов образцов почвы согласно приложению 3 настоящей инструкции.

8. Картирование территории крупных городов с многочисленными источниками загрязнения проводится по сети апробирования. Для выявления очагов загрязнения рекомендуемая плотность отбора 1- 5 проб/км² с расстоянием между точками отбора 400-1000м. Для дальнейшего выделения территории с максимальной степенью загрязнения сеть апробирования сгущается до 25-30 проб/км² и расстоянием между точками отбора около 200м. Пробы рекомендуется отбирать с глубины 0 – 25см. Размер сети апробирования может меняться в зависимости от масштаба картирования, характера использования территории.

9. В селитебной, агроселитебной, сельскохозяйственной и рекреационно-ландшафтной зоне населенного пункта пробы почвы отбирают с глубины 0-25см. На каждые 0-15га закладываются не менее одной площадки размером 100 – 200м² в зависимости от рельефа местности.

В промышленной зоне, площадки для отбора проб располагают на площади трехкратной величины санитарно-защитной зоны (далее – СЗЗ) вдоль векторов розы ветров на расстоянии 100, 200, 300, 500, 1000, 2000, 5000 метров и более от источника загрязнения.

В транспортно-коммуникационной зоне пробные площадки закладываются на придорожных полосах с учетом рельефа местности, растительного покрова, метео- и гидрологических условий. Пробы почвы отбирают с узких полос длиной 200- 500м на расстоянии 0-10, 10-50, 50-100м от полотна дороги.

Одна смешанная проба составляется из 20-25 точечных проб, отобранных с глубины 0-25см.

10. Подготовка проб к анализу проводится в соответствии с видом анализа. В лаборатории проба освобождается от посторонних примесей, доводится до воздушно-сухого состояния, тщательно перемешивается и делится на части для проведения анализа. Отдельно оставляется контрольная часть от каждой анализируемой пробы (около 200г) и хранится в холодильнике 2 недели на случай арбитража.

11. В лабораторных условиях отобранные образцы почвы просеивают через сито с диаметром ячеек 3мм для проведения физико-химических испытаний и диаметром 1мм – для биохимических. Для некоторых анализов пробы после просеивания доводят до воздушно-сухого состояния путем высушивания в расстиле при комнатной температуре. Пробы хранят в полиэтиленовых пакетах, банках или другой герметической таре в холодильнике при температуре 4°С. Лабораторную пробу высыпают на противень или полиэтиленовую пленку, хорошо перемешивают, распределяют ровным слоем толщиной не более 10мм и ложкой или шпателем не менее чем в 5 местах отбирают необходимую для анализа навеску.

При установлении содержания в почве концентраций тяжелых металлов, находящихся в подвижных формах, для их экстракции из почв используется ацетатно-аммонийный буферный раствор с рН 4,8 и ацетатно-натриевый буферный раствор с рН 4,7.

При изучении валового содержания тяжелых металлов в почвах для их извлечения применяется 1 н раствор азотной кислоты при кипячении. При этом степень извлечения достигает 80-90%.

ГЛАВА 5 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕХНОГЕННОГО ЛАНДШАФТНО- ГЕОХИМИЧЕСКОГО ФОНА

12. Определение техногенного ландшафтно-геохимического фона каждой функциональной зоны включает:

Выделение в границах каждой функциональной зоны группы репрезентативных участков, имеющих типичный для данной зоны почвенный покров.

Для характеристики фона функциональной зоны отбирают не менее 30 смешанных проб. Смешанная проба на участках с отсутствием явно выраженного техногенного загрязнения отбирается с площадки 10×10 м и состоит из 3-4 единичных почвенных проб, которые отбираются из горизонта 0—25 см весом по 300—400 г, что позволяет оценить среднее содержание большинства химических элементов на площадке с ошибкой ± 20 %.

В пределах техногенных ареалов смешанные пробы отбираются в соответствии с показателями, приведёнными в приложении 4 настоящей инструкции.

Определение содержания химического вещества в пробах проводят по метрологически аттестованным и допущенным к применению методикам проведения испытаний.

13. Из выборки полученных данных для каждого элемента устраняются верхние аномальные показатели (устранение логарифмического «хвоста» из гистограммы выборки) и рассчитывается средняя величина его содержания, принимаемая за техногенный ландшафтно-геохимический фон этого элемента в почве данной функциональной зоны.

ГЛАВА 6 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ДЛЯ ОБОСНОВАНИЯ ГИГИЕНИЧЕСКИХ НОРМАТИВОВ

14. В основу безопасного уровня воздействия положены оценочные показатели вредности, используемые при гигиеническом нормировании ЭХВ в почве. Нормирование предельно допустимой концентрации (ПДК) для каждой функциональной зоны определяется отдельно по наиболее значимым показателям вредности для этой функциональной зоны.

15. Перечень оценочных показателей вредности для нормирования химических загрязнителей в почвах различных функциональных зон приведен в приложении 5 настоящей инструкции.

Для большинства приоритетных загрязнителей допустимые уровни по основным показателям вредности приведены в приложении 6 инструкции.

Экспериментальные исследования для обоснования ПДК проводятся в случае отсутствия сведений о ЭХВ в приложении 6. Если литературные данные свидетельствуют о наличии генотоксичности у

изучаемого химического вещества, то объем экспериментальных исследований должен включать тест на генотоксичность.

16. Экспериментальные исследования для определения ПДК экзогенных химических веществ в почве проводятся на моделях дерново-подзолистой супесчаной почвы (фитотоксический, транслокационный и общесанитарный критерии), и песчаной почвы, обладающей максимальной фильтрующей и минимальной сорбционной способностью (миграционный водный и миграционный воздушный показатели).

17. Для постановки вегетационных, полевых и лабораторных опытов отбирается дерново-подзолистая супесчаная почва пахотного слоя (0-25см) с заведомо незагрязненных участков, где предварительно определены основные агрохимические, санитарно-химические и физические свойства:

содержание гумуса должно быть в пределах 1,5-2,5% (метод определения приведен в приложении 7);

гранулометрический состав почвы: содержание частиц диаметром менее 0,01 мм в супесчаных почвах составляет 10-20% (приложение 8);

содержание нормируемых веществ (содержание пестицидов и компонентов нефтепродуктов не допускается, концентрация микроэлементов, тяжелых металлов, компонентов минеральных удобрений, сернистых соединений – не выше техногенного ландшафтно-геохимического фона;

полная влагоемкость – для последующего приведения к влажности 60% от полной влагоемкости (приложение 9);

рН (КСИ) должен быть в пределах 5,0-6,5 (приложение 10);

влажность (приложение 11);

плотность (приложение 12);

для оценки плодородия модельной почвы рекомендуется определять содержание подвижных форм фосфора и калия (приложения 13,14).

18. Для постановки миграционных опытов на песчаной почве используется рыхлый средне-мелкозернистый карьерный песок, взятый с глубины около 3 м, с заведомо незагрязненных участков, в котором предварительно определены основные агрохимические свойства:

содержание гумуса (должно быть не более 0,2%);

гранулометрический состав: диаметр частиц среднезернистого песка составляет 0,5-0,25 мм, мелкозернистого – 0,25-0,05 мм (по Н.А.Качинскому), содержание частиц диаметром менее 0,01 мм – менее 10 %;

содержание нормируемых веществ (содержание пестицидов и компонентов нефтепродуктов не допускается, концентрация микроэлементов, тяжелых металлов, компонентов минеральных удобрений, сернистых соединений – не выше фонового уровня /кларка/);

полная влагоемкость;

pH (Kci), плотность, влажность и др.

ГЛАВА 7 ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ЭКЗОГЕННЫХ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В ПОЧВЕ И ВЫБОР ИХ РАБОЧИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ

19. Определение стабильности экзогенных химических веществ в почве имеет важное значение для определения целесообразности нормирования и прогнозирования их возможных уровней загрязнения.

20. Для решения вопроса о нормировании и для уточнения схемы эксперимента исследования по определению стабильности токсиканта проводится согласно приложению 15 настоящей инструкции.

Последующая периодичность исследований представлена в приложении 16.

Количество необходимых для опыта проб определяется из расчета 3-х повторностей на 1 определение.

Эксперимент прекращается по достижении сроков полураспада.

21. Снижение концентрации ЭХВ в почве может быть описано экспоненциальной зависимостью:

$$C_t = C_o \times e^{-kt}, \text{ где}$$

C_t – концентрация ЭХВ в период времени t ,

C_o – начальная концентрация ЭХВ в почве,

e - основание натурального логарифма,

k - постоянная скорости процесса деструкции,

t - период времени.

Период времени T_{99} , в течение которого содержание вещества уменьшится на 99%, составляет:

$$T_{99} = \frac{4,6}{K};$$

Период времени T_{50} , в течение которого содержание вещества уменьшится на 50%, составляет:

$$T_{50} = \frac{0,7}{K};$$

Константу скорости процесса деструкции рассчитывают по методу наименьших квадратов:

$$-k = \frac{n \sum_{i=1}^n x_i y_i - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2}, \text{ где}$$

n – количество измерений,

x – время (t),

y – концентрация ЭХВ в почве.

22. При выборе рабочих концентраций химических элементов (тяжелые металлы, микроэлементы), берут за основу уровень техногенного ландшафтно-географического фона и увеличивают его в 5, 10 и т.д. раз в соответствии с уровнем существующего загрязнения.

23. Для органических веществ (компоненты нефтепродуктов, продукты их сгорания, полиароматические углеводороды), загрязняющих почву с выбросами промышленных предприятий, автотранспорта и др., испытывают реально встречающиеся уровни загрязнения почвы.

24. Испытуемые вещества вносят в виде водного раствора, суспензии или эмульсии во весь объем почвы из расчета на 1кг воздушно-сухой почвы, в полевых условиях – на 1кг пахотного слоя, при этом количество вносимой жидкости должно увлажнять почву до 60% от полной влагоемкости.

25. При нормировании химических элементов (тяжелые металлы и др.) используют для проведения исследований их ионную форму – в виде водорастворимых солей, так как это обеспечивает наибольшую токсичность и миграционные свойства веществ.

26. Для проведения экспериментальных исследований следует использовать только химически чистые (х.ч.) или чистые для анализа (ч.д.а.) вещества. Расчет доз препарата для внесения в почву проводят на нормируемый ион и с учетом гигроскопичности соединений. Массу навески соли, вносимой в почву виде водного раствора (суспензии), рассчитывают по формуле:

$$m_c = \frac{C \times m_n \times M_c}{M_s}, \text{ где}$$

m_c – масса вносимой навески соли (мг),

C – концентрация элемента в почве, которую необходимо создать (мг/кг),

m_n – масса навески почвы (кг),

M_c – молекулярная масса соли, с учетом гигроскопической воды,

M_s – атомный вес элемента.

27. Рабочей концентрацией в почве для проведения экспериментальных исследований веществ, целенаправленно вносимых в нее – средств защиты (пестицидов, биопрепаратов) и регуляторов

роста растений, минеральных удобрений и микроэлементов – является создающаяся (по действующему веществу) при максимальной норме расхода препарата концентрация, ее расчет производится по формуле:

$$C = \frac{P \times K}{h \times d \times 100}, \text{ где}$$

C – концентрация препарата в почве (мг/кг),

P – норма расхода пестицида (кг/га),

K – концентрация действующего вещества в препарате (%),

h – глубина пахотного слоя почвы (дм),

d – объемная плотность почвы (г/см³).

Нормы расхода пестицидных препаратов изложены в периодически издаваемом Министерством сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь «Каталоге пестицидов и удобрений, разрешенных для применения в Республике Беларусь».

28. Если в результате экспериментальных исследований пестицидов и регуляторов роста растений эта концентрация оказывается недействующей (подпороговой), то она принимается за ПДК ЭХВ в почве, в противном случае испытывают более низкие концентрации. Для пестицидов, стойкость которых превышает длительность вегетационного периода (Т₉₉ в почве более 1 года), следует испытывать концентрации, в 2 и более раз превышающие создающиеся при максимальных нормах расхода.

Для минеральных удобрений и микроэлементов при подпороговости концентрации, создающейся при максимальной норме расхода, испытывают на порядок более высокие дозы.

ГЛАВА 8

ОЦЕНКА ФИТОТОКСИЧНОСТИ ЭКЗОГЕННЫХ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

29. Оценка фитотоксичности проводится путем определения подпороговой концентрации ЭХВ в почве, которая не оказывает токсического действия на семена, проростки и растения.

30. Показателями фитотоксического действия ЭХВ являются снижение (по сравнению с контролем) всхожести семян, общей фитомассы, наземной массы растений, веса и длины корней, прироста и урожайности, изменение фаз развития культуры и ее вегетационного периода. При этом наиболее выраженными характеристиками для проведения лабораторных опытов обладают показатели всхожести семян, развития проростков и их корней, в полевых и вегетационных опытах – урожайность растений.

31. При исследовании фитотоксического действия ЭХВ определяют концентрации испытуемых веществ, которые вызывают ингибирование роста корней на 20 %.

Исследования проводят в 4 этапа. На первом этапе проводят – предварительные эксперименты, целью которых является определение в краткосрочном опыте ассортимента растений, фитотоксичности изучаемого вещества, и рабочих концентраций для постановки основного опыта.

Второй этап – лабораторное биотестирование фитотоксичности препаратов на прорастание семян, который выполняют по расширенной схеме (около 90 вариантов).

Третий этап – биологический тест фитотоксичности экзогенных химических веществ на проростках семян в почве, который позволяет выявить концентрации ЭХВ, вызывающие ингибирование роста корней сельскохозяйственных культур на 20 %.

На четвертом этапе проводят биологический тест проверки выбранных концентраций исследуемых веществ на проростках семян.

32. Метод выбора растений (фитопретендентов) по всхожести семян на почве. Тест проводят на проростках семян сельскохозяйственных растений согласно приложению 17 настоящей инструкции.

33. На втором этапе лабораторного биотестирования выполняют биологический тест фитотоксичности ЭХВ на прорастание семян в почве согласно приложению 18 настоящей инструкции по расширенной схеме (около 90 вариантов).

Принцип теста основан на наличии зависимости между концентрацией вещества в почве и степенью воздействия на всхожесть и прорастание семян. В качестве биотестов используются семена и проростки сельскохозяйственных растений.

Исследования выполняют на сортах растений отобранных по результатам опыта полученных на первом этапе исследований. Метод позволяет быстро проверить испытуемые концентрации веществ и отобрать нужные для последующих исследований.

Варианты опыта, где нет различий между контролем, или где наблюдается значительное ингибирование растений или их гибель, выбраковываются. Такой отбор вариантов позволяет сэкономить время, затраты и материалы для проведения дальнейших исследований.

На основании проведенного исследования для последующих вегетационных опытов выбирают виды растений, по отношению к которым не обнаружено фитотоксичного действия, и концентрации препаратов, не вызывающие фитотоксичное действие на растения.

34. На третьем этапе лабораторного биотестирования выполняют биологический тест фитотоксичности экзогенных химических веществ на проростках семян в почве согласно приложению 19, который позволяет выявить концентрации ЭХВ, вызывающие ингибирование роста корней сельскохозяйственных культур на 20%.

Концентрация вещества, которая вызывает явное ингибирование развития растений (снижение роста проростков семян) на 20% - это максимальная доза внесения препарата при постановке полевого или вегетационного опытов по определению величины миграции вещества в растения, так же она является исходной для проведения полевых исследований.

Для каждого химического соединения выбирают средний показатель концентрации (которая вызывает 20% ингибирование роста) из данных всех анализируемых культур, так как цифровое значение даже по одной культуре значительно варьирует в зависимости от сроков посева семян, фазы лунного календаря, сорта и прочих параметров.

Рекомендуют выращивать проростки 7 дней, затем проводить измерение длины и массы корней проростков, так как при выращивании растений, более 7 суток, увеличивается вероятность гибели их от бактериальной гнили и нарушается чистота опыта.

Из-за невозможности быстро определить границу перехода подсеменного колена в корень у салата и свеклы измеряется длина всего растения. Корреляция между длиной проростка и длиной его корней, почти прямо пропорциональна.

Большинство растений имеют сложную корневую систему. Учитывая то, что количество числа корешков у проростков обусловлено в большей степени генетическим фактором, нежели воздействием на них испытываемых веществ, целесообразно за длину корня принимать расстояние от корневой шейки до кончика самого длинного корешка. Достаточно измерения одного параметра – общей длины проростков семян для двудольных культур или длины корней у ячменя.

Так как размер и масса корней может измениться при отмывании их от почвенного субстрата, проводится измерение длины корней или проростков без промывания их в воде. Непосредственно перед измерением корней, за 10-15 минут до начала, почву в чашках Петри сильно увлажняют. Из влажного субстрата проростки легко извлекаются по одному.

35. На четвертом этапе проводят биологический тест проверки выбранных концентраций исследуемых веществ на проростках семян в почве согласно приложению 20 настоящей инструкции, используя те же концентрации исследуемых веществ, что и в полевых или вегетационных опытах.

Метод дает возможность проверить правильность выбора концентраций, вызывающих снижение роста проростков семян на 20 %.

ГЛАВА 9 ОЦЕНКА ТРАНСЛОКАЦИОННОГО ПОКАЗАТЕЛЯ ЭКЗОГЕННЫХ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

36. Определение транслокационного (фитоаккумуляционного) показателя проводится путем определения подпороговой концентрации ЭХВ в дерново-подзолистой супесчаной почве, которая обуславливает переход вещества в сельскохозяйственные растения, наиболее аккумулирующие загрязнения, в количестве, не превышающем к моменту сбора урожая ПДОК (МДУ) для пищевых продуктов.

Концентрации исследуемых препаратов, которые при проведении биотеста на фитотоксичность вызывают ингибирование роста корней сельскохозяйственных культур на 20%, являются максимальными дозами внесения их при постановке полевого опыта по определению величины миграции пестицида и загрязняющих веществ в растения. Остальные концентрации составляют 50, 25% (и менее) от максимальной дозы.

37. Выбор параметров для проведения лабораторных и полевых исследований:

навеска почвенного субстрата в г,
эталон для сравнения результатов – чашки Петри без почвы, с
тремя слоями фильтровальной бумаги,
ассортимент растений-индикаторов,
количество семян и растений,
концентрация исследуемых веществ,
температурный режим,
условия и продолжительность постановки опыта, и другие
параметры.

38. Метод вегетационного опыта по изучению транслокационного показателя вредности для почвы позволяет определить накопление испытываемых препаратов или продуктов их метаболизма в растениях в период товарной спелости урожая и проводится согласно приложению 21 настоящей инструкции.

39. Метод полевого исследования транслокационного показателя вредности для почвы приведен в приложении 22 настоящей инструкции.

При выборе индикаторных растений для обоснования ПДК химического вещества в почве по транслокационному показателю предпочтение следует отдавать растениям-концентраторам и растениям,

широко представленным в пищевом рационе человека: злаки, картофель, морковь, свекла, горох, листовые овощи. При изучении транслокации удобрений и пестицидов выбирают те растения, на которых этот пестицид применяется, а также те сельскохозяйственные культуры, которые выращиваются на полях после применения пестицидов в течение 2-3 лет в зависимости от стойкости препарата.

При постановке опытов с микро-, макроэлементами и другими веществами, для которых отсутствует ПДОК в пищевых продуктах, берутся растения, которые широко используются в питании человека: злаки (лучше пшеница), картофель, морковь, свекла, горох, редис, листовые овощи. Этот набор растений по окончании опыта даст возможность рассчитать количество изучаемого вещества, которое поступает в организм человека с растительным рационом.

ГЛАВА 10 ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭХВ НА ОБЩЕСАНИТАРНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ ПОЧВ

40. Предварительное обоснование диапазона концентрации ЭХВ для последующих экспериментов по влиянию на микробоценоз и биохимическую активность почвы проводят на *Tetrahymena pyriformis* согласно приложению 23 настоящей инструкции

41. Оценка общесанитарного показателя вредности, характеризующего процессы изменения биологической активности почвы от загрязнения химическими веществами, проводится путем определения подпороговой концентрации ЭХВ в почве (мг/кг абсолютно сухой почвы), которая не вызывает изменений общей численности микроорганизмов основных физиологических групп более чем на 50%, также ферментативной активности почвы более чем на 25% относительно контрольной пробы.

42. Гигиеническое нормирование ЭХВ в почве осуществляют путем учета численности чувствительных групп почвенного микробоценоза или специально отобранных индикаторных штаммов микроорганизмов, интродуцируемых в почву: актиномицеты, целлюлозоразрушающих и аммонифицирующих микроорганизмы.

43. Численность целлюлозоразрушающих микроорганизмов определяют методом предельных разведений. Высев анализируемой почвенной суспензии (0,2 мл, разведения $10^{-2} - 10^{-4}$) проводят на модифицированную среду Виноградского, состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - 1,0$; $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 1,0$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,5$; $\text{NaCl} - 0,5$; агар - 20,0; вода водопроводная - 1л; pH 7,0-7,2. Почвенную суспензию равномерно распределяют стерильным стеклянным шпателем по всей поверхности агара, на который затем накладывают кружки стерильной

фильтровальной бумаги, служащей в качестве источником углерода, и притирают шпателем так, чтобы они плотно прилегали к нему. Инокулированные чашки Петри помещают крышками вниз во влажную камеру с температурой 24-26°C. Учет целлюлозоразрушающих микроорганизмов осуществляют на 7-14-ые сутки. Для учета микроорганизмов в 1г абсолютно сухой почвы число клеток в 1г влажной почвы умножают на коэффициент влажности.

44. Численность бактерий-аммонификаторов определяется методом посева на мясо-пептонный агар, численность актиномицетов определяют методом посева на крахмально-аммиачный агар.

45. В качестве индикаторных микроорганизмов для тестирования токсических концентраций полиароматических углеводов предлагаются бактерии *Rhodococcus rhodochrous* БИМ В-95 и *Streptomyces griseoviridis* БИМ В-2224, для тяжелых металлов и пестицидов – *Micrococcus luteus* БИМ В-241 и *Pseudomonas* sp. В-152. Предлагаемые штаммы индикаторных микроорганизмов хорошо приживаются в почвах и имеют специфические морфологические и физиологические признаки, позволяющие легко идентифицировать эти культуры в составе биоценозов. Возможность идентификации *S. Griseoviridis* БИМ В-2224 обеспечивается способностью к росту на среде с антибиотиками (крахмало-аммиачный агар КАА с добавлением 100 мкг/мл стрептомицина), а остальных бактерий – ярко выраженной пигментацией (*M.luteus* БИМ В-241 и *R.rhodochrous* БИМ В-95 – соответственно желтой и красной при выращивании на мясо-пептонном агаре МПА, *Pseudomonas* sp. В-152 – голубой при выращивании на агаризованном бульоне Хоттингера).

Бактерии культивируют в колбах на качалке (200 об/мин) на мясо-пептонном бульоне в течение 2 суток и вносят в загрязненную исследуемым ЭХВ почву (до конечной концентрации $1,0-5,1 \cdot 10^7$ КОЕ/г почвы). Влияние токсикантов на развитие исследуемых микроорганизмов контролируют в динамике путем посева проб почвы на вышеуказанные агаризованные среды. Снижение титра исследуемых культур на 50 % и более по сравнению с контролем (почва без ЭХВ) служит показателем присутствия в почве токсических концентраций ксенобиотиков. Статистическую обработку результатов проводят путем определения средних арифметических и их доверительных интервалов для уровня вероятности 95%.

46. Изучение влияния ЭХВ на биохимическую активность почв проводят в вегетационных сосудах (Митчерлиха и др.) в пару, то есть без возделывания какой-либо культуры, не менее чем в 4-кратной повторности. Для исследований берут по 5кг подготовленной почвы на сосуд. Влажность почвы в течение проведения опытов поддерживается

на постоянном уровне 60% от полной влагоемкости путем регулярного полива дистиллированной водой.

Продолжительность опытов 60 дней. Отбор проб для определения всех показателей производится из всех сосудов с одинаковой глубины (0-20см) с последующей подготовкой попарно-смешанных лабораторных проб на 3, 7, 10, 14, 20, 30 сутки от начала опытов и далее регулярно через каждые две недели до их окончания.

47. В качестве наиболее чувствительных показателей биохимической активности почвы при воздействии ЭХВ могут рассматриваться в первую очередь целлюлазная (приложение 24), аммонифицирующая (приложение 25, 26) активность почвы, при загрязнении тяжелыми металлами – интенсивность продуцирования почвой углекислого газа (приложение 27).

ГЛАВА 11

ИЗУЧЕНИЕ МИГРАЦИОННО – ВОЗДУШНОГО ПОКАЗАТЕЛЯ ЭКЗОГЕННЫХ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

48. Оценка миграционной воздушной способности ЭХВ из почвы производится путем определения его максимально возможной концентрации в приземном слое атмосферного воздуха на основании литературных данных о молекулярной массе вещества и давлении его насыщенных паров, исходя из уравнения Менделеева-Клапейрона, по следующей формуле:

$$C = \frac{1,6 \times 10^4 \times M \times P}{T}, \text{ где}$$

C – максимально возможная концентрация, мг/м³;

M – молекулярный вес вещества;

P – давление насыщенных паров, мм рт. ст.;

T – абсолютная температура в °K, при которой проводилось определение давления насыщенных паров.

Данные о давлении насыщенных паров химических веществ имеются в химических справочниках, пересчет других единиц измерения давления (бар, паскаль) в миллиметры ртутного столба может быть проведен по следующему равенству:

$$750,06 \text{ мм рт.ст.} = 1 \text{ бар} = 10^5 \text{ Па.}$$

Давление насыщенного пара неорганических соединений можно рассчитать по уравнению температурной зависимости давления паров:

$$\lg P = -AT^{-1} + B - C \lg T - DT, \text{ где}$$

P – давление насыщенных паров, мм рт. ст.,

А, В, С, D – коэффициенты уравнения температурной зависимости,

T – абсолютная температура в °K,

49. Если максимально возможная концентрация вещества в приземном слое атмосферного воздуха при температуре 50°C (или выше) меньше, чем его ПДК в атмосферном воздухе, проводить экспериментальные исследования по установлению миграционного воздушного показателя не следует.

50. Определение миграционного воздушного показателя для почвы проводится путем определения подпороговой концентрации ЭХВ в почве, при которой его миграция в атмосферный воздух не превышает ПДК для атмосферного воздуха.

51. Перед проведением основного опыта по определению воздушно-миграционного показателя в почве рекомендуем провести предварительный эксперимент. В герметично закрывающиеся стеклянные сосуды, оборудованные устройствами для отбора воздуха, вносят почву с содержанием в ней ЭХВ в подпороговой концентрации по общесанитарному показателю, с влажностью 10% (суховоздушное состояние) и 80%, соблюдая соотношение S (почвы): V (сосуда) = 1см²:1см³, при этом толщина почвы должна быть не менее 5см. Сосуды с почвой помещают в термостат и выдерживают при температуре 50°C в течение 24 часов. Объем сосуда регламентируется минимальным количеством воздуха необходимого для определения ½ ПДК (ОБУВ атмосферного воздуха) исследуемого соединения. С помощью электроаспиратора проводят отбор проб воздуха из сосудов, соблюдая температурный режим эксперимента. Условия отбора проб воздуха зависят от изучаемого вещества и соответствующего метода анализа при этом объем пробы воздуха не должен превышать объема сосуда с исследуемой почвой.

52. В случае если в пробах воздуха ЭХВ не обнаруживается, дальнейшее проведение опыта по изучению миграционно – воздушного показателя считается не целесообразным.

При обнаружении концентрации ЭХВ, превышающей ПДК для атмосферного воздуха, эксперимент проводят по схеме описанной в приложении 28 настоящей инструкции.

53. Концентрация ЭХВ в почве, при которой его концентрация в протягиваемом через эксикатор воздухе не превышает ПДК в атмосферном воздухе, является допустимой по воздушному миграционному показателю.

ГЛАВА 12

ИЗУЧЕНИЕ МИГРАЦИОННОГО ВОДНОГО ПОКАЗАТЕЛЯ ЭХВ В ПОЧВЕ

54. Оценка миграционной водной способности вещества проводится путем определения подпороговой концентрации ЭХВ в почве, которая обуславливает его переход в подземные воды в количестве, не превышающем ПДК для питьевой воды.

55. Проведение исследований проводят для всех веществ по предлагаемой схеме:

При изучении миграционного водного показателя перед проведением предварительного опыта в колонках длиной 25см и основного эксперимента в колонках длиной 1м проводят экспресс-опыт в колонках длиной 12см.

В качестве колонки для проведения экспресс-опыта используют цилиндрические делительные воронки объемом 100 см³ (воронка ВД-1-100- ХС). Диаметр колонки составляет 4см, высота – 12см. Продолжительность опыта 2 дня.

Подготовку колонки почвы перед проведением экспресс опыта проводят согласно методическим рекомендациям № 127-0010 «Ускоренное гигиеническое регламентирование экзогенных химических веществ в почве», утвержденной Постановлением главного государственного санитарного врача Республики Беларусь 13 ноября 2000г.

В колонку вносят 50г предварительно подготовленной почвы. Для предотвращения свободного проникновения воды вдоль стенок колонки почву сильно уплотняют с помощью стеклянной палочки. Объем уплотненной почвы занимает примерно 0,5 объема воронки. Внесенную в колонку почву увлажняют до влажности 60%, приливая к ней 20 см³ дистиллированной воды. Для внесения изучаемого вещества в поверхностном слое увлажненной почвы делают углубление стеклянной палочкой. В углубление вносят рассчитанное количество стандартного раствора вещества, создавая максимальную из планируемых концентрацию (мг/кг). После впитывания стандартного раствора, углубление прикрывают краями почвенной воронки и начинают полив.

Для полива используют дистиллированную воду. Количество воды должно составлять 3-месячную норму осадков. Так как среднегодовая норма составляет 600мм (60см), то для воронки диаметром 4см (площадь поверхности равна 12,6 см²) она составит:

$$60 : 12 \times 3 \times 12,6 = 189 \text{ см}^3$$

Дистиллированную воду вливают в воронку и при полностью открытом кране собирают фильтрат в мерный цилиндр. Фильтрату дают полностью стечь из воронки, рассчитывают количество вещества в фильтрате (мг) и степень миграции вещества из почвы. При отсутствии вещества в фильтрате или при обнаружении его в количестве, не более 1% от внесенного в почву, предварительный опыт в колонках длиной 25 см (приложение 29) и основной опыт в колонках длиной 1 м не проводится.

56. Концентрация ЭХВ в верхнем слое почвы, при которой его количество в полученных в течение месяца пробах фильтрата не превышает ПДК в воде питьевой, является допустимой по миграционному водному критерию.

ГЛАВА 13 ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

57. Токсикологический эксперимент на лабораторных теплокровных животных проводится в следующих случаях:

недостаточно полная токсикологическая характеристика нормируемого вещества в опубликованной литературе;

оценка степени чистоты исследуемого вещества (препарата), путем сравнения показателей острой токсичности с литературными данными;

отсутствует ПДОК вещества в пищевых продуктах или ПДК в воде питьевой, для расчета ДСД;

имеются литературные данные о возможности сочетанного, комплексного или комбинированного действия вещества, которое более выражено по сравнению с изолированным влиянием, что в схемах гигиенического регламентирования при проведении токсикологических экспериментов по установлению пороговых и недействующих доз ЭХВ не всегда учитывается;

имеются данные о возможных отдаленных последствиях действия ЭХВ.

58. Для экспериментального определения допустимой суточной дозы вещества проводится острый эксперимент на лабораторных животных (мыши, крысы) по методике установления параметров острой токсичности в соответствии с главой 2 Инструкции 1.1.11-12-35-2004 «Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ», утвержденной постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 14 декабря 2004 года № 131.

При этом определяются LD_{50} и вероятностная величина εT_{50} , характеризующая сроки гибели животных при дозе LD_{50} .

Для определения εT_{50} подсчитывается суммарное время (в часах) гибели всех животных от каждой из испытанных доз, из которых рассчитывается среднее время гибели одного животного по формуле:

$$t_1 = \frac{t_c}{n}, \text{ где}$$

t_1 – среднее время гибели одного животного (в часах),

t_c – суммарное время гибели всех животных от каждой из испытанных доз (в часах),

n – общее количество животных, погибших от данной дозы.

Затем в логарифмическом масштабе строят прямоугольную систему координат, откладывая на оси абсцисс время гибели животных (в часах), на оси ординат – использованные в опыте дозы вещества. На график наносятся точки, соответствующие значениям t_1 для каждой из доз, и через них проводится прямая, на которой находят время гибели животных εT_{50} , соответствующее LD_{50} .

Максимальную недействующую дозу (МНД) находят по формуле:

$$\lg \text{МНД} = 1,302 \times \lg \varepsilon T_{50} + \lg LD_{50} - 2,22$$

Допустимая суточная доза рассчитывается с учетом коэффициента запаса.

59. Влияния ЭХВ на мутагенную активность почв изучают по Инструкции 2.1.7.1-12-5-2004 «Гигиеническая оценка почвы населенных мест», утвержденной постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 03 марта 2004г., №32.

60. Исследование генотоксических свойств ЭХВ проводят согласно приложению 30 настоящей инструкции.

Приложение 1
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

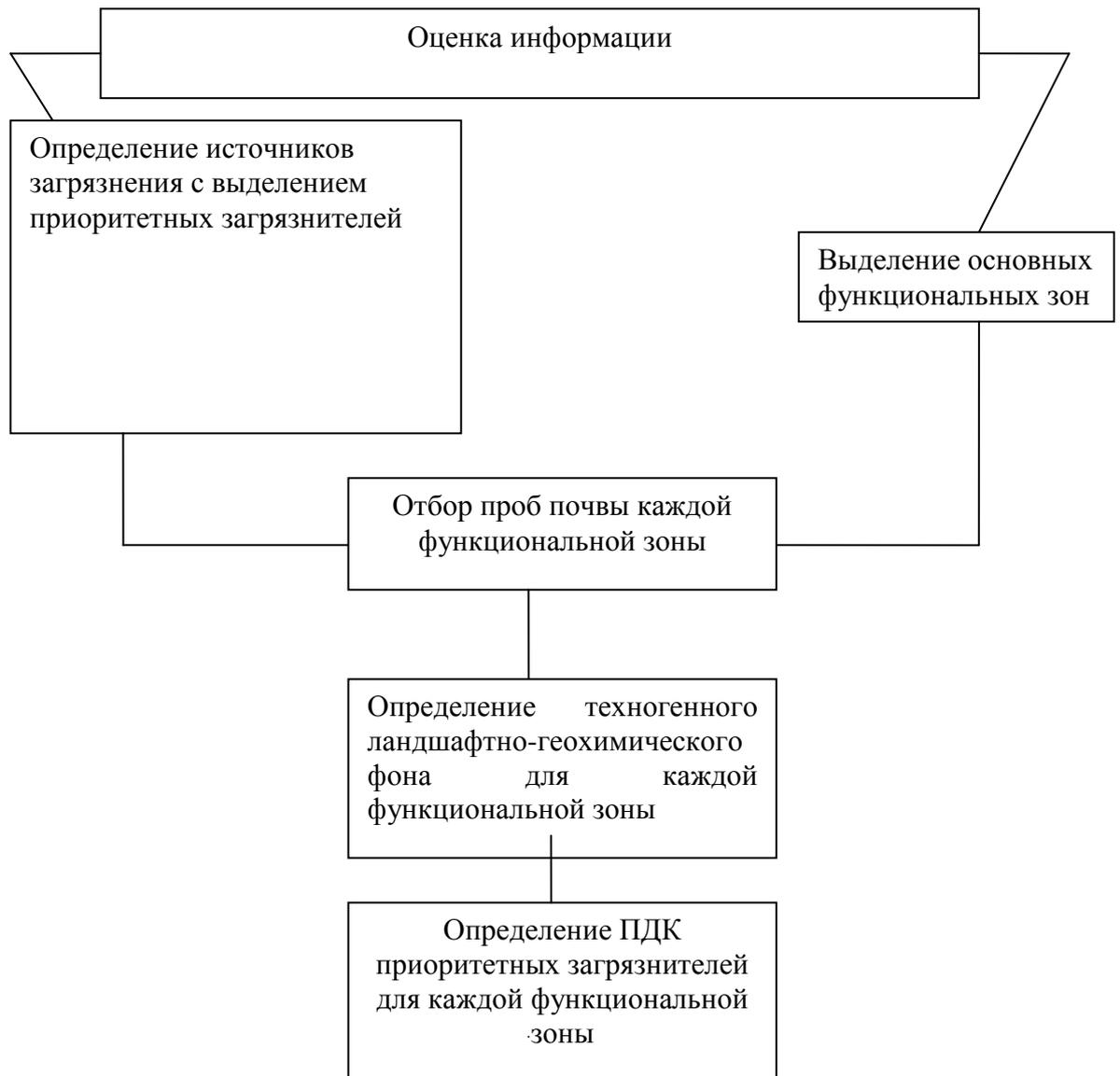
Функциональные зоны земель населенных пунктов

Функциональная зона	Категория земель
1	2
Селитебная	Земли городов, используемые для жилой застройки (в ведении ЖКХ, жилых кооперативов; жилых центров военных городков, земли общественно-культурных центров и административные (кроме земель индивидуальной застройки))
Агроселитебная	Земли сельских населенных пунктов и городские земли под индивидуальной застройкой (кроме земель производственных объектов, полигонов отходов, очистных сооружений, территорий ферм, складских помещений и других предприятий в сельском хозяйстве)
Промышленная	Земли промышленных предприятий и приравненные к ним (включая земли производственных объектов сельскохозяйственных предприятий, животноводческих комплексов, территории ферм, складов, хранилищ, нефтебаз, терминалов, земли под полигонами отходов, очистными сооружениями, отвалами, шламохранилищами, военные полигоны, горнодобывающие предприятия, неиспользуемые земли, земли отвода под трубопроводы и т.д.)
Рекреационно-ландшафтная	Земли зеленых насаждений общего пользования городов (городских и микрорайонных парков, скверов), зеленых городов, зон отдыха, курортов, лечебно-оздоровительных, детских дошкольных учреждений, учебных учреждений, лесохозяйственных предприятий (лесопокрытые и непокрытые лесом), природоохранные (заповедники, национальные парки, болотный фонд), территории водозаборов

1	2
Сельскохозяйственного назначения	Пахотные земли сельскохозяйственных предприятий, парниково-тепличных хозяйств, земли садоводческих товариществ, земли подсобных хозяйств других предприятий.
Транспортно-коммуникационная	Автомобильные, железные дороги и зоны их влияния, аэродромы, аэропорты, подсобные сооружения транспорта

Приложение 2
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Порядок определения дифференцированных гигиенических
нормативов загрязнения почв



Приложение 4
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Оптимальное число проб в выборке для малых площадок в
центральной части аномалии

Ошибка	Pb	Zn	Cu	Sn	Cr	Ni	Sr	Mn	V	Mo	Ga
Центры загрязнения: площадка 10 × 10 м											
±20 %	18	27	27	58	5	6	8	15	7	13	11
±30 %	8	12	12	25	2	3	4	7	3	6	5
Слабая аномалия: площадка 1 × 1 м											
±20 %	9	8	6	4	7	4	8	8	6	11	10
±30 %	4	4	3	2	3	2	4	4	3	5	5

Приложение 5
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Оценочные показатели для обоснования ПДК ЭХВ в почве

Функциональная зона	Наименование показателя вредности				
	фитотоксический (К ₅)	транслокационный (К ₁)	миграционный		Санитарно-токсикологический (К ₄)
			водный (К ₂)	воздушный (К ₃)	
Селитебная	+	-	+	+	+
Агроселитебная	+	+	+	+	+
Промышленная	-	-	+	+	+
Транспортно-коммуникационная	+	-	+	+	-
Рекреационно-ландшафтная	+	+	+	+	+
Сельскохозяйственного назначения	+	+	+	+	+

Для примера рассмотрим принцип определения ПДК для транспортных автомагистралей. Напомним, что гигиенический норматив ПДК определяется по показателям вредности К (транслокационный – К₁, миграционно-водный – К₂, миграционно-воздушный – К₃, санитарно-токсикологический – К₄) по лимитирующему критерию. Принимая во внимание, что на территории автомагистралей не проводятся сельскохозяйственные работы и почвы являются технологически измененными (имеют искусственное покрытие или подсыпку из песка, гравия, щебенки) при определении ПДК для автомагистралей следует учитывать только три критерия вредности: санитарно-токсикологический, миграционно-воздушный и миграционно-водный.

Приложение 6
к Инструкции по определению
дифференцированных гигиенических
нормативов загрязнения почв

Предельно допустимые концентрации (ПДК) неорганических химических веществ в почве и допустимые уровни их содержания по показателям вредности

Наименование вещества	Форма содержания	ПДК, мг/кг почвы	Допустимые уровни показателей вредности ($K_1 - K_4$), мг/кг				Класс опасности
			Транслокационный (K_1)	Миграционный		Общесанитарный (K_4)	
				Водный (K_2)	Воздушный (K_3)		
1	2	3	4	5	6	7	8
Медь	Подвижные формы	3	3,5	72	-	3	2
Хром	Подвижные формы	6	6	6	6	6	2
Никель	Подвижные формы	4	6,7	14	-	4	1
Цинк	Подвижные формы	23	23	200	-	37	1

1	2	3	4	5	6	7	8
Марганец для чернозема	Подвижные формы	140	320	1860	-	140	3
Марганец дерново-подзолистая почва с рН 4	- // -	60	220	1000	-	60	3
Марганец дерново-подзолистая почва с рН 5.1-6.0	- // -	80	220	1000	-	80	3
Марганец дерново-подзолистая почва с рН > 6	- // -	100	-	1600	-	100	3
Марганец черноземы	Извлекаемый 0.1 н H ₂ SO ₄	700	1600	9300	-	700	3
Марганец дерново-подзолистая почва с рН 4	- // -	300	1100	5000	-	300	3

1	2	3	4	5	6	7	8
Марганец дерново- подзолистая почва с рН 5,1- 6,0	- // -	400	1100	5000	-	400	3
Марганец дерново- подзолистая почва с рН > 6	- // -	500	1100	8000	-	500	3
Кобальт	Аммонийно- натриевый буфер рН 3,5 для сероземов и 4,7 для дерново- подзолистой почвы	5	25	>1000	-	5	2
Фтор	водорастворимы й	10	10	10	-	25	1
Сурьма	валовая	4,5	4,5	4,5	-	50	2
Марганец	валовая	1500	3500	15000	-	1500	3
Ванадий	валовая	150	170	350	-	150	3
Марганец+ва надий	валовая	1000+100	1500+150	2000+200	-	1000+100	2

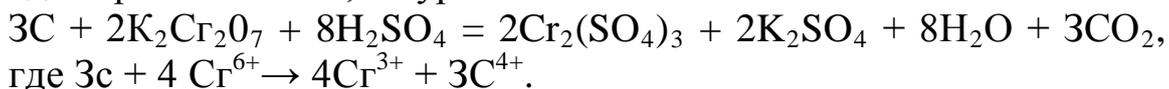
1	2	3	4	5	6	7	8
Свинец	валовая	32	35	260	-	32	1
Мышьяк	валовая	2	2	15	-	10	1
Ртуть	валовая	2,1	2,1	33,3	2,5	5	1
Свинец+ ртуть	валовая	20+1	20+1	30+2	-	30+2	1
Хлористый калий (K ₂ O)	валовая	360	1000	560	1000	5000	4
Нитраты	валовая	130	180	130	-	225	1
Сернистые соединения (S): Элементар- ная сера	валовая	160	180	380	-	160	4
Сероводород (H ₂ S)	валовая	0.4	160	140	0.4	160	4
Серная кислота	валовая	160	180	380	-	160	1
Отходы флотации угля (далее - ОФУ)	валовая	3000	9000	3000	6000	3000	1
Комплексные гранулированны е удобрения (далее - КГУ)	валовая	120	800	120	800	800	4

1	2	3	4	5	6	7	8
Жидкие комплексные удобрения (далее - ЖКУ)	валовая	80	>800	80	>8000	800	4
Бенз(а)пирен	валовая	0.02	0.2	0.5	-	0.02	1

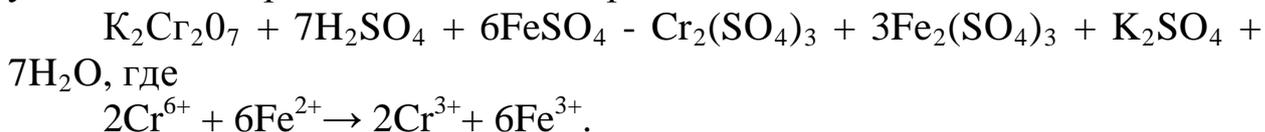
Приложение 7
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Определение гумуса почвы по методу В.Тюрина

Метод основан на учёте бихромата, расходуемого на окисление углерода перегнойной почвы, по уравнению:



Окисление происходит в сильноокислой среде и сопровождается восстановлением шестивалентного хрома в трёхвалентный. Избыток бихромата, оставшегося в растворе после окисления перегнойной, учитывают титрованием солью Мора.



Выполнение определения. Навеску почвы, подготовленной путём тщательного отбора корешков, просеянной через сито с отверстиями диаметром 0,25мм и растёртой в ступке, отвешивают на аналитических весах в количестве 0,3г. Навеску переносят в сухую коническую колбу ёмкостью 100 см³. Бюреткой приливают 10 см³ 0.4 н раствора K₂Cr₂O₇, приготовленного на разбавленной 1:1 серной кислоте.

Содержимое колбы осторожно перемешивают круговыми движениями, закрывают колбу маленькой воронкой, ставят на песчаную баню, доводят до кипения и кипятят ровно 5 мин. По окончании кипячения колбу снимают с плитки, охлаждают. После охлаждения в колбу приливают по 5 капель 0.2%-ного раствора фенилантрапиновой кислоты, являющейся индикатором, и титруют оставшуюся неизрасходованной после окисления органического вещества хромовую кислоту 0.1 н раствором соли Мора.

Содержание гумуса (в % к воздушно - сухой массе) в почве вычисляют по формуле:

$$(a-b) \times K \times 100$$

$$\text{гумус} = \frac{\quad}{m}, \text{ где}$$

a- количество раствора соли Мора, пошедшая на титрование 10 см³ 0,4 н раствора K₂Cr₂O₇ при холостом анализе (см³),

в- количество соли Мора, пошедшая на титрование после окисления гумуса (см^3),

(а-в) - количество раствора соли Мора, отвечающая количеству хромовой кислоты израсходованному на окисление гумуса,

К - коэффициент перевода в гумус с внесённой поправкой на нормальность раствора соли Мора;

м- навеска воздушно-сухой почвы (г).

При вычислении содержания гумуса принята следующая величина:
 1 см^3 0,1 н раствора соли Мора соответствует 0,000517г гумуса.

Реактивы:

раствор двуххромовокислого калия 0,4 н;

раствор соли Мора 0,1 н;

0,1 н раствор KMdO_4 ;

0,2%-ный раствор фенилантраниловой кислоты;

Приложение 8
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Определение гранулометрического состава почвы
методом пипетирования

Разделение частиц методом пипетирования основано на том, что в спокойной воде скорость падения почвенных частиц прямо пропорциональна их диаметру.

Сущность заключается во взятии пипеткой небольших проб суспензии (20-25 см³) через определенное время с определенной глубины и в определении в этих пробах содержания почвенных частиц различного размера.

Подготовленная к механическому анализу почвенная суспензия (обычно 10г почвы) пропускается через сито с отверстиями 0,25мм. Сито устанавливается на стеклянную воронку, которая вставляется в литровый цилиндр. Почва на сите промывается струей воды при легком растирании. Оставшиеся на сите частицы почвы струей воды переносятся в чашку, а затем в предварительно взвешенный стаканчик; лишняя вода сливается, почвенные частицы высушиваются на песчаной бане, затем в термостате при 105°С до постоянной массы.

Суспензия в цилиндре доливается дистиллированной водой до 1 дм³, тщательно взмучивается и из нее пипеткой (обычно объемом в 25 см³) через определенный промежуток времени берется первая проба суспензии. Затем суспензия вновь взмучивается, берется вторая проба суспензии и т.д. Всего забирается четыре пробы суспензии с отдельным взмучиванием для каждой из них.

Удобными считаются глубины погружения пипетки для выделения фракций почвенных частиц различной крупности (таблица 1).

Таблица 1 - Глубина погружения пипетки

Размер частиц, мм	Глубина погружения, см
менее 0,050	25
менее 0,010	10
менее 0,005	10
менее 0,001	7

Сроки забора проб с различных глубин, считая с момента окончания взмучивания суспензии, варьируют в зависимости от температуры суспензии и удельного веса почвенных частиц.

Анализ следует проводить в помещении с мало изменяющейся температурой. Цилиндры с суспензией при отстаивании желательно накрывать картонными цилиндрическими колпаками, которые будут предохранять суспензию от случайных нагреваний и возникающих при этом тепловых конвекционных токов жидкости. Температуру суспензии определяют термометром, помещенным в такой же цилиндр с водой. При отборе для анализа проб частиц менее 0,05, менее 0,01 и менее 0,005мм температуру можно измерить однократно. При отборе же проб частиц менее 0,001мм температуру следует измерить трижды: после взбалтывания суспензии, в середине интервала отстаивания суспензии и перед пипетированием. Средняя из трех отсчетов температура воды и учитывается при определении интервалов времени падения механических частиц почвы в воде.

При выборе значений удельной массы почвенных частиц следует руководствоваться данными таблицы 2.

Таблица 2 - Усредненные значения удельной массы твердой фазы различных почв, г/см³

Глубина, см	Кварцевые легкие почвы всех типов	Суглинистые и глинистые	
		Подзолистые и серые лесные земли	Черноземы обыкновенные и тучные
0-20	2,60-2,65	2,60	2,40
20-40	2,65	2,65	2,50
40-100	2,65	2,70	2,65
более100	2,65	2,70	2,70

В таблице 3 приводятся сроки взятия проб почвенной суспензии с различных глубин в соответствии со скоростями падения почвенных частиц в воде, вычисленными по формуле Стокса для различных температур суспензии и для различных удельных масс почвенных частиц. При промежуточных значениях температуры суспензии и удельных масс почвенных частиц интервалы времени могут быть найдены интерполяцией.

Таблица 3 -Интервалы времени для взятия проб почвенной суспензии в зависимости от ее температуры и удельного веса почвенных частиц

Удель- ный вес твердой фазы почвы	Эффек- тивный диаметр частиц, мм	Глубина взятия пробы, см	10°	15°	20°	25°	30°
1	2	3	4	5	6	7	8
2,40	<0,05	25	171"	149"	132"	117"	105"
	<0,01	10	28'25"	24'51"	21' 59"	19'33"	17'28"
	<0,005	10	1 ч 54'	1 ч 39'	1 ч 28'	1 ч 18'	1 ч 10'
2,45	<0,001	7	33 ч 09'	29 ч 00'	25 ч 28'	22 ч 49'	20 ч 23'
	<0,05	25	165"	144"	127"	113"	101"
	<0,01	10	27'26"	24'00"	21'13"	18'53"	16'52"
2,50	<0,005	10	1 ч 50'	1 ч 36'	1 ч 25'	1 ч 16'	1 ч 08'
	<0,001	7	32 ч 01'	28 ч 00'	24 ч 45'	22 ч 01'	19ч41'
	<0,05	25	159"	139"	123"	109"	98"
2,55	<0,01	10	26'31"	23'12"	20'31"	18'15"	16'19"
	<0,005	10	1 ч 46'	1 ч 33'	1 ч 22'	1 ч 13'	1 ч 05'
	<0,001	7	30 ч 57'	27 ч 04'	23 ч 55'	21 ч 17'	19 ч 02'
2,60	<0,05	25	154"	135"	119"	106"	95"
	<0,01	10	25'40"	22'27"	19'51"	17'39"	15'47"
	<0,005	10	1 ч 43'	1 ч 30'	1 ч 19'	1 ч 11'	1 ч 03'
2,65	<0,001	7	29 ч 57'	26 ч 12'	23 ч 09'	20 ч 36'	18 ч 25'
	<0,05	25	149"	130"	115"	103"	92"
	<0,01	10	24'52"	21'45"	19'14"	17'06"	15'17"
2,70	<0,005	10	1 ч 39'	1 ч 27'	1 ч 17'	1 ч 08'	1 ч 01'
	<0,001	7	28 ч 0Г	25 ч 22'	22 ч 26'	20 ч 57'	17 ч 50'
	<0,05	25	145"	127"	112"	100"	89"
2,75	<0,01	10	24'07"	21'06"	18'39"	16'35"	14'50"
	<0,005	10	1 ч 36'	1 ч 24'	1 ч 15'	1 ч 06'	59"
	<0,001	7	28 ч 08'	24 ч 36'	21 ч 45'	19ч21'	17 ч 18'
2,80	<0,05	25	140"	123"	109"	97"	86"
	<0,01	10	23'24"	20'28"	18'06"	16'06"	14'23"
	<0,005	10	1 ч 34'	1 ч 22'	1 ч 12'	1 ч 04'	58'
	<0,001	7	27 ч 18'	23 ч 53'	21 ч 07'	18 ч 49'	16 ч 47'

1	2	3	4	5	6	7	8
2,75	<0,05	25	136"	119"	105"	94"	84"
	<0,01	10	22'44"	19'53"	17'35"	15'38"	13'59"
	<0,005	10	1 ч 31'	1 ч 20'	1 ч 10'	1 ч 03'	56'
	<0,001	7	26 ч 31'	23 ч 12'	20 ч 31'	18ч 15'	16 ч 18'
2,80	<0,05	25	133"	116"	103"	91"	82"
	<0,01	10	22'06"	19'20"	17'06"	15'12"	13'35"
	<0,005	10	1 ч 28'	1 ч 17'	1 ч 08'	1 ч 01'	54'
	<0,001	7	25 ч 47'	22 ч 33'	19 ч 56'	17 ч 44'	15 ч 51'

' - минуты, " - секунды.

Ниже дается формула Стокса в общепринятой форме:

$$V = \frac{2}{9} r^2 \frac{d_n - d_e}{\rho} \times g, \text{ где}$$

V - скорость падения частиц (см/сек),

r - радиус шарообразной падающей частицы (см),

d_n - удельный вес падающей частицы (г/см³),

d_e - удельный вес жидкости, в которой ведется анализ (г/см³),

g - ускорение силы тяжести (981 см/сек²);

ρ - вязкость жидкости (пуаз).

Засасывание пробы в пипетку длится около 20 сек (длительность засасывания необходимо определять для каждой установки опытным путем).

Так как длительность взятия пробы суспензии может сказаться на точности ее учета, особенно первой и второй проб, следует забор пробы начинать на пол-интервала раньше положенного срока.

По окончании засасывания пробы суспензия сливается в протарированный сушильный стаканчик, пипетку обмывают дистиллированной водой, которую собирают в тот же сушильный стакан. Проба выпаривается на песчаной или этернитовой бане, высушивается до постоянной массы в термостате при 105°C и взвешивается на аналитических весах. Зная массу стаканчика, находят массу учитываемой фракции. Доливание суспензии после взятия пробы не производится.

Вычисление процентного содержания фракций, взятых пипеткой, ведется по формуле:

$$x = \frac{a \times 10^5}{b \times c}, \text{ где}$$

x - содержание фракции в анализируемой почве (%),

a - вес этой фракции (г), найденный в пипеточной пробе,

b - фактический объем взятой суспензии (см),

c - вес абсолютно сухой навески, взятой для анализа (г).

Приложение 9
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Определение полной влагоемкости почвы

Для определения влагоемкости почвы стеклянную трубку диаметром 3см и высотой 15-20см обвязывают с нижнего конца марлей, на которую помещают кружок фильтровальной бумаги, заполняют воздушно-сухой почвой слоем 10см, уплотняя ее легким постукиванием, взвешивают и помещают в сосуд с тонким слоем воды.

Трубку с почвой взвешивают на 2-4 дни; когда разница в весе составит не более 0,1г в сутки, почва достигает полного насыщения (обычно на 3 сутки). Затем почву переносят в фарфоровую чашку, тщательно перемешивают и из разных мест отбирают навеску массой 10-15г для определения содержания влаги. Навеску помещают в предварительно взвешенный стеклянный бюкс и взвешивают с точностью до 0.01г, затем в открытом виде ставят в термостат при температуре 105°С с открытой дверцей до достижения постоянного веса. Перед взвешиванием бюкс с почвой охлаждают в эксикаторе в течение 40 минут. Полную влагоемкость рассчитывают по формуле:

$$ПВ = [(B-C) : (C-A)] \times 100, \text{ где}$$

В - вес почвы с бюксом до сушки;

С - вес почвы с бюксом после сушки;

А – вес пустого бюкса.

Затем находят 60% от полной влагоемкости (%), для чего ПВ умножают на 0,6. Количество воды (мл), которое необходимо добавить на 1кг сухой почвы для доведения ее до оптимальной влажности, рассчитывают путем умножения полученного значения на 10.

Определение количества гигроскопической влаги в почве проводится для пересчета данных с воздушно-сухой на сухую почву.

На аналитических весах отвешивают 5,0г воздушно-сухой почвы, помещают в предварительно взвешенный бюкс и ставят на 5 часов в сушильный шкаф при температуре 105°С, после чего охлаждают в эксикаторе в течение 40 минут и взвешивают на аналитических весах. Содержание гигроскопической влаги в почве рассчитывают по формуле:

$$P = 100 \times (b-c) / (c-a), \text{ где}$$

P - содержание гигроскопической влаги (%),

b - вес бюкса с почвой до сушки (г),
с - вес бюкса с почвой после сушки (г),
а- вес пустого бюкса (г).

Затем производят пересчет на сухую почву:

$m_0 = (m_1 \times 100) / (100 + P)$, где

m_0 - масса сухой почвы (г),

m_1 - масса воздушно-сухой почвы (г),

P- содержание гигроскопической влаги (%).

Приложение 10
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Метод определения обменной кислотности почвы

Сущность метода заключается в приготовлении хлоркалиевой почвенной суспензии и потенциометрическом измерении в ней величины рН.

Навеску почвы, отобранную из расчёта ($20,0 \pm 0,1$ г), пропущенную через сито с отверстиями диаметром в 1мм, отвешивают на технических весах, помещают в стеклянную колбу вместимостью 100 см^3 и добавляют 50 см^3 раствора хлористого калия концентрации $C(\text{КСИ}) = 1 \text{ моль/дм}^3$ и встряхивают 5 мин, оставляют колбу с суспензией стоять 18-24 ч.

По истечении срока отстаивания берут пипеткой часть раствора и определяют рН потенциометрическим методом. Окончательные результаты испытания пробы округляют до десятых долей.

Допускаемые расхождения между результатами двух параллельных определений в одной пробе при доверительной вероятности $P=0,95$ не должны превышать значения 0,1 рН.

Реактивы:

- натрия гидроокись х.ч. или ч.д.а. раствор с массовой долей 10%;
- калий хлористый х.ч. или ч.д.а. раствор концентрации с $\text{КСИ} = 1 \text{ моль/дм}^3$ (рН 5,5-6,0);
- кислота соляная х.ч. или ч.д.а. раствор с массовой долей 10%.
- стандарт-титры для приготовления образцовых буферных растворов.

Приложение 11
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Метод определения влаги в почве

Сущность метода заключается в высушивании почвы при температуре 100-105°C.

Сушильный шкаф должен быть предварительно нагрет до температуры 100-105°C. В предварительно высушенных и взвешенных стеклянных стаканчиках с притёртой пробкой на аналитических весах отвешивают 5-10г почвы, просеянной через сито с диаметром отверстий 3мм. Открытые стаканчики с почвой ставят на верхнюю полку сушильного шкафа и сушат до постоянного веса. Сначала почву сушат 3 ч, затем стаканчики с почвой вынимают из шкафа, прикрывают крышками, охлаждают в эксикаторе. После взвешивания навески проводят контрольное подсушивание в течение 30 мин и определяют потерю влаги. Если потеря не превышает 0,01г, испытание заканчивают и для вычисления принимают последнюю массу. При потере массы более 0,01г производят последующие контрольные взвешивания, каждое в течение 30 мин до тех пор, пока разность в массе при двух последующих взвешиваниях не будет превышать 0,01г.

Массовую долю влаги в лабораторной пробе (W) вычисляют по формуле:

$$W = \frac{m - m_1}{m} \times 100, \text{ где}$$

m - масса навески почвы до сушки (г);

m₁ - масса навески почвы после сушки (г).

Приложение 12
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Метод определения плотности почвы

Для характеристики сложения почвы (т.е. её плотности) используют величину объёмной массы. Объёмной массой почвы называют массу сухой, т.е. высушенной при 105-110°C почвы в единице объема почвы ненарушенного сложения. Объёмную массу выражают в граммах сухой почвы на 1 см³.

Метод определения объёмной массы заключается в том, что буриком, т.е. тонким заострённым снизу стальным цилиндром из почвы вырезают определённый объём без нарушения сложения, который затем тщательно без потерь переносят на бумагу. Определение проводят с трёхкратной повторностью. Образец почвы взвешивают с точностью до 0,1г. Затем, сразу после взвешивания берут в бюксы две пробы по 15-20г и определяют в них содержание влаги. Объёмную массу почвы рассчитывают по следующей формуле:

$$P = \frac{M \times 100}{V \times (100 \times W)}, \text{ где}$$

M - масса почвы (г),

V - объём бурика (см³),

W - содержание влаги почвы в весовых процентах.

Приложение 13
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Определение подвижного фосфора в почвах

Метод основан на извлечении подвижных форм фосфора из почвы 0,2 Моль/дм³ раствором HCl при отношении почвы к раствору 1:50 с последующим колориметрическим определением P₂O₅.

Выполнение определения: 5г воздушно-сухой почвы, пропущенной через сито с отверстиями диаметром в 1мм, помещают в коническую колбу ёмкостью 250 см³ и приливают 250 см³ 0,2 Моль/дм³ раствора HCl. Взбалтывают содержимое колбочки и настаивают в течение 18-20 часов. Затем суспензию отфильтровывают через беззольный фильтр. Берут пипеткой 2,5 см³ фильтрата, помещают в мерную колбу ёмкостью 50 см³ и приливают 47,5 см³ раствора молибденовокислого аммония с аскорбиновой кислотой и сурьмяно-виннокислым калием, содержимое колбы перемешивают. Через 30 мин определяют оптическую плотность на отокалориметре с красным светофильтром при длине волны 650 нм.

Содержимое P₂O₅ вычисляют в миллиграммах на 100г почвы по формуле:

$$X = \frac{m \cdot 250 \cdot K \cdot 100}{V \cdot m_1}, \text{ где}$$

m – масса фосфора, соответствующая на градуировочном графике отсчёту на фотоэлектрокалориметре, мг;

250 – объём раствора соляной кислоты концентрации 0,2 моль/дм³ приливаемый к навеске исследуемого материала, см³;

K – поправка на разбавление фильтрата

V – объём фильтрата, взятый на определение, см³;

m_1 – масса навески, г.

Реактивы:

Кислота соляная плотностью 1,19 г/см³, раствор концентрации с (HCl) 0,2 моль/дм³.

Кислота серная плотностью 1,84 г/см³ и раствор концентрации с (1/2 H₂SO₄) = 5 моль/дм³.

Аммоний молибденово-кислый перекристаллизованный.

Калий сурьмяно-виннокислый.

Кислота аскорбиновая.

Реактив 1.

Реактив 2.

Основной образцовый раствор А калия фосфорнокислого.

Приготовление реактива 1.

Навеску массой $(6,0 \pm 0,1)$ г молибденовокислого аммония растворяют в 200 см^3 дистиллированной воды.

Навеску массой $(0,1454 \pm 0,0002)$ г сурьмяновиннокислого калия К $(\text{SbO}) \text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 1/2\text{H}_2$ растворяют в 100 см^3 дистиллированной воды. Оба раствора готовят при слабом нагревании. Охлаждённые растворы добавляют к 500 см^3 раствора серной кислоты концентрации $c(1/2 \text{H}_2\text{SO}_4) = 5 \text{ моль/дм}^3$ (5 н). раствор перемешивают и доводят объём дистиллированной водой до 1 дм^3 . Реактив готовят заранее и хранят в тёмной склянке в холодильнике при температуре от 5 до 10°C .

Приготовление реактива 2.

Навеску массой $(0,8870 \pm 0,0002)$ г аскорбиновой кислоты $(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6)$ растворяют в 169 см^3 реактива 1 и доводят объём дистиллированной водой до 1 дм^3 . Реактив готовят ежедневно.

Приготовление основного образцового раствора А калия фосфорнокислого однозамещённого (KH_2PO_4) массовой концентрации $0,1 \text{ мг/см}^3$.

Навеску массой $(0,1917 \pm 0,0002)$ г однозамещённого фосфата калия растворяют в $500\text{-}600 \text{ см}^3$ дистиллированной воды с несколькими каплями серной кислоты концентрации $c(1/2\text{H}_2\text{SO}_4) = 5 \text{ моль/дм}^3$ и в мерной колбе вместимостью 1 дм^3 доводят объём раствора до метки водой. В 1 см^3 раствора А содержится $0,1 \text{ мг P}_2\text{O}_5$.

Приложение 14
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Определение подвижного калия в почве

Подвижные формы калия определяются в вытяжке приготовленной для определения P_2O_5 с дальнейшим определением K_2O на пламенном фотометре.

Массу калия в пересчёте на K_2O в миллиграммах на 100г почвы вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \cdot 250 \cdot K \cdot 100}{m \cdot 1000},$$

где: C – массовая концентрация K_2O , соответствующая на градуировочном графике отчёту на пламенном фотометре, мг/дм³;

250 – объём раствора соляной кислоты концентрации 0,2 моль/дм³, приливаемой к навеске, см³;

K – поправка на разбавление;

m – масса навески почвы, г.

Реактивы:

Кислота соляная плотностью 1,19 г/см³, раствор концентрации с (HCl) 0,2 моль/дм³.

Калий хлористый перекристаллизованный и высушенный до постоянной массы при температуре 105°C.

Основной образцовый раствор А калия хлористого.

Рабочий образцовый раствор Б калия хлористого.

Приготовление основного образцового раствора А калия хлористого (KCl).

Навеску массой (1,5828±0,0002) г хлористого калия растворяют в дистиллированной воде, переносят в мерную колбу 4 вместимостью 1 дм³ и доводят объём раствора до метки водой. В 1 см³ образцового раствора А содержится 1 мг K_2O .

Рабочие образцовые растворы Б готовятся из основного образцового раствора А калия хлористого и используются для построения градуировочного графика.

Приложение 15
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Определение стабильности ЭХВ в почве

В 3 конические колбы помещают навеску почвы, предварительно затравленной ЭХВ, с влажностью 60% от полной влагоемкости. Масса навески в одной колбе выбирается из расчета на одно определение и зависит от чувствительности метода анализа вещества. Исследуемая концентрация выбирается в соответствии с реально встречающимися уровнями загрязнения почвы, для пестицидов – исходя из максимальной нормы расхода препарата. Колбы с пробами содержатся в помещении на рассеянном свете при комнатной температуре 18-20°C в течение суток, затем производится определение содержания вещества в трех пробах, и рассчитывается средний процент его деструкции за 1 сутки.

Приложение 16
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Периодичность определений вещества в почве при изучении
стабильности

Деструкция за 1-е сутки, %	Периодичность определений, сутки
10 и менее	1 3 10 20 30 45 60 90
10-30	1 3 7 15 30 45 60
30 и более	Каждые сутки

Приложение 17
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Метод выбора растений (фитопретендентов) по всхожести семян в
почве

Тест проводят на проростках семян сельскохозяйственных растений. Для тестирования выбирают несколько сортов сельскохозяйственных культур: ячмень, столовая свекла, салат. Семена высевают по 30 штук в чашки Петри с почвой (по 50г в каждой) и без почвы (с тремя слоями фильтровальной бумаги). Добавляют дехлорированную воду. Количество воды должно насыщать почву до 60 % от полной ее влагоемкости. Объем воды составляет 16 мл. В вариантах опыта при проращивании семян без почвы, на фильтровальной бумаге, вода вносится в таких же объемах. Засеянные чашки Петри закрывают крышками и помещают на 7 суток в термостат с температурой 23 – 24° С. На 3 сутки визуально проверяют всхожесть семян, на 7 сутки измеряют длину проростков.

Выбирают те сорта и растения, у которых по всем показателям: скорость всхожести, процент прорастания, длина корешков и проростка на 3 и 7 сутки выше. Такие растения более других подходят для проведения исследований. Повторность опыта 4 кратная.

Приложение 18
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Биологический тест фитотоксичности ЭХВ на прорастание семян
в почве

Исследования выполняют на сортах растений отобранных по результатам опыта полученных на первом этапе исследований.

Семена проращивают в течение 3 суток в чашках Петри с почвой (по 50г в каждой) и без почвы (на трех слоях фильтровальной бумаги), при температуре 23 – 24 ° С. В каждую чашку Петри высеивают по 30 семян. Исследуемые препараты вносят в почву или на фильтровальную бумагу в виде водных растворов или суспензий. Количество вносимой жидкости должно насыщать почву водой до 60 % от полной ее влагоемкости. В вариантах опыта при проращивании семян без почвы, на фильтровальной бумаге, вода и растворы испытываемых веществ вносятся в таких же объемах. Варианты без почвы служат эталоном. В контрольном варианте используется только вода. Повторность опыта 4 кратная. На 3-й день определяют процент всхожести семян по отношению к контролю и длину корней проростков.

Приложение 19
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Биологический тест фитотоксичности экзогенных химических
веществ на проростках семян в почве

Семена высевают по 30 штук в чашки Петри с почвой (по 50г в каждой) и без почвы (с тремя слоями фильтровальной бумаги). Исследуемые препараты вносят в почву или на фильтровальную бумагу в виде водных растворов или суспензий (концентрация их была определена в предыдущих опытах по методу биологического теста фитотоксичности препаратов на прорастание семян). Количество вносимой жидкости должно насыщать почву водой до 60 % от полной ее влагоемкости. В вариантах опыта при проращивании семян без почвы, на фильтровальной бумаге, вода и испытываемые вещества вносятся в таких же объемах. Чашки Петри с семенами помещают на 7 суток в термостат с температурой 23 – 24° С. Повторность опыта 4 или 5 кратная. На 7 сутки измеряют длину проростков и определяют концентрацию испытываемого вещества, которая вызывает явное ингибирование развития растений (снижение роста проростков семян) на 20 %. Это максимальная доза внесения препарата при постановке полевого или вегетационного опытов по определению величины миграции вещества в растения. И является исходной для проведения полевых исследований.

Приложение 20
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Биологический тест проверки выбранных концентраций исследуемых веществ на проростках семян в почве

Семена высевают по 30 штук в чашки Петри с почвой, по 50г в каждой. Исследуемые вещества вносят в виде водных растворов или суспензий. Концентрация их должна быть равной 100, 75, 50 и 20% от среднего количества испытываемого вещества, которое вызывает ингибирование проростков семян на 20%. Количество вносимой жидкости должно насыщать почву водой до 60% от полной ее влагоемкости. Чашки Петри с семенами помещают на 7 суток в термостат с температурой 23 – 24° С. Повторность опыта 4 кратная.

Измеряют длину проростков на 7 сутки и определяют процент ингибирования роста по отношению к контролю.

Приложение 21
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Метод вегетационного опыта по изучению транслокационного
показателя вредности на почве

В качестве вегетационных сосудов могут быть использованы различные емкости (пластиковые, стеклянные, эмалированные или другие) на 5-10кг почвы с отверстиями в дне для стока излишней влаги в поддоны, из которых не происходит вымывания химических веществ (по методу сосудов Митчерлиха). Удобно использовать для опыта пластмассовые 7-литровые ведра.

Непосредственно перед постановкой опытов почва тщательно перемешивается. Из нее берется средний образец для определения влажности. Вся почва для опытов закрывается пленкой, чтобы не происходила потеря влаги. На основании определения исходной влажности проводится расчет количества воды, которую необходимо добавлять на каждый кг почвы, чтобы после наполнения сосудов влажность ее была равна 60% от полной влагоемкости. В каждое ведро высевают по 50 семян свеклы, салата или ячменя. После появления всходов проводят прореживание растений. Свеклы в каждом из сосудов оставляют по 4 растения. Ячменя в каждом ведре оставляют по 11, салата - по 30 штук. Исследуемые препараты вносят в почву в виде водных растворов или суспензий в день посева сельскохозяйственных культур (после высева семян). Для каждого препарата рассчитывается по 4 концентрации: 100, 75, 50 и 20 % от среднего количества испытываемого вещества, которое вызывает ингибирование проростков семян на 20 % (по результатам предварительных исследований - биологический тест фитотоксичности веществ загрязняющих почву на проростках семян). Нужную дозу внесения рассчитывают по препарату (веществу). Общее количество вносимой жидкости должно насыщать почву водой до 60 % от полной влагоемкости. Контролем служат сосуды с почвой без внесенного изучаемого вещества. Повторность опытов 4 кратная.

При необходимости можно провести досев сельскохозяйственных растений наклюнувшимися семенами. Для этого семена предварительно (в день посева в ведра) замачивают и проращивают на фильтровальной

бумаге. Семена салата прорастают очень быстро, поэтому их предварительно не проращивают.

Сосуды с растениями устанавливают в вегетационном доме под стеклом (или под защищающим от дождя навесом), чтобы во время дождей не нарушалась концентрация внесенных в почву веществ.

Образцы проб фитомассы отбирают при достижении фазы товарной спелости. Каждый фитообразец помещают в новый бумажный или полиэтиленовый пакет и разборчиво подписывают. Внутрь вкладывается заранее подготовленная бирка, с указанием номера варианта, испытываемого вещества и его концентрации. Учитывается урожайность растений впервые 1 - 2 суток с момента отбора проб. Отобранные образцы передаются для проведения химических анализов.

В течение опыта проводится полив растений, норму и сроки которого определяют визуально по состоянию почвы. Целесообразно вносить в каждый сосуд за один полив такое количество воды, чтобы она начала вытекать из отверстия в дне сосуда. Эту воду собирают в поддоны, установленные под сосудами, и затем по мере подсыхания почвы ее снова вносят в сосуды, чтобы не допускать вымывания из почвы растворимых веществ.

Приложение 22
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Метод полевого исследования транслокационного показателя
вредности на почве

Для выбора опытного поля необходимо удостовериться в том, что данная почва не содержит испытуемое вещество (если оно не присуще естественной почве), или содержит его в количестве, не превышающем региональный фон. При отсутствии возможности проведения исследований в полевых условиях опыты с растениями ставятся в вегетационных сосудах (Соколов М.С. и др.). Участок должен иметь относительно ровную поверхность, чтобы во время дождя не происходило вымывания препаратов с одного варианта на другой.

Непосредственно перед постановкой опытов берется средний образец для определения влажности. На основании определения исходной влажности проводится расчет количества воды, которую необходимо добавлять на каждый м² почвы, чтобы влажность ее была равна 60 % от полной влагоемкости.

Выбор рабочих концентраций проводится в соответствии с результатами предварительных этапов исследований и общей методикой. Для каждого препарата рассчитывается по 4 концентрации: 100, 75, 50 и 20 % от количества испытываемого вещества, которое вызывает ингибирование проростков семян на 20 %. Нужная доза внесения рассчитывалась по препарату (веществу).

В полевых опытах, определяя транслокационный показатель вредности токсикантов, исследования проводят на опытных делянках площадью 4 м кв. в 3-кратной повторности. Защитная полоса между повторностями опыта составляет 50 см, а между вариантами опыта – 2 м. Общая площадь участка около 20 соток. Исследуемые препараты вносят в почву в виде водных растворов или суспензий через 5 дней после посева сельскохозяйственных культур. Количество вносимой жидкости должно насыщать почву водой до 60% от полной влагоемкости.

Образцы проб фитомассы отбирают при достижении ими фазы товарной спелости. Каждый фитообразец помещают в новый бумажный или полиэтиленовый пакет и разборчиво подписывают. Внутри вкладывается заранее подготовленная бирка, с указанием номера

варианта, испытываемого вещества и его концентрации. Проводится биологическое тестирование образцов сельскохозяйственных культур и учитывается урожайность растений впервые 1 - 2 суток с момента отбора проб. Отобранные образцы передаются для проведения химических анализов.

В течение опыта выполняется уход за растениями и полив, норму и сроки которого определяют визуально по состоянию почвы.

Норму внесения испытываемых препаратов и веществ определяют по формуле:

$$P = \frac{C \times d \times 20}{K}, \text{ где}$$

P – норма внесения препарата (г/м²),

C – концентрация вещества, которую необходимо создать в почве (мг/кг),

d – плотность почвы (г/см³),

K – концентрация действующего вещества в препарате (%).

Исследуемые вещества, распределяющиеся в поверхностном слое почвы (тяжелые металлы, полиароматические углеводороды, пестициды и др.) вносят в виде водных растворов, эмульсий или суспензий через 1-2 дня после посева сельскохозяйственных культур, до появления всходов.

Концентрация ЭХВ, обнаруженная в растениях, сопоставляется с величиной ПДОК (МДУ) в соответствующих продуктах питания. При отсутствии ПДОК вещества в растительных продуктах, его определяют расчетным путем, исходя из ДСД. Для веществ, загрязняющих почву (тяжелые металлы, компоненты нефтепродуктов и др.) следует использовать следующую формулу:

$$МДУ = \frac{ДСД \times 0,8 \times 60}{1,45} = ДСД \times 33, \text{ где}$$

МДУ – максимально допустимый уровень накопления вещества в растительных продуктах (мг/кг),

0,8 – доля ЭХВ (в среднем), поступающая в организм человека с пищевым рационом,

ДСД – допустимая суточная доза (мг/кг),

60 – средняя масса человека (кг),

1,45 – рекомендуемое суммарное потребление пищевых продуктов растительного происхождения в сутки (кг).

В том случае, если ЭХВ может поступать в ограниченный перечень продуктов питания, следует вводить поправочный коэффициент, учитывающий удельный вес данного продукта в суточном рационе. При определении ПДОК средств защиты и

регуляторов роста растений подсчитывают возможное суммарное поступление остатков со всем комплексом продуктов питания, получаемых из сельскохозяйственных культур, подлежащих обработке препаратом исходя из рекомендованного среднесуточного набора пищевых продуктов.

Если отсутствует информация о ДСД вещества, расчет МДУ может быть проведен исходя из ПДК ЭХВ для питьевой воды, а при ее отсутствии проводится токсикологический эксперимент по сокращенной схеме.

Приложение 23
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Предварительное обоснование диапазона концентрации ЭХВ для последующих экспериментов по влиянию на микробоценоз и биохимическую активность почвы на *Tetrahymena pyriformis*

Tetrahymena pyriformis W (Т.Р.) – тест-объект исследований. Лабораторная культура одноклеточных (ресничные инфузории), произрастающая в среде известного состава и являющаяся изолированной популяцией организмов, рост которой подчиняется общим закономерностям роста популяций. Количество токсиканта, вносимого в культуру рассчитывается в мг/мл культуры

Этапы и сроки проведения исследований по эколого-гигиеническому нормированию экзогенных химических веществ в почве на *Tetrahymena pyriformis*:

Объекты исследования, далее объекты:

экзогенное химическое вещество;

почва без внесения ЭХВ, (ПК);

почва с внесенным ЭХВ, далее почва-опыт (ПО);

Первичная оценка осуществляется на популяции *Tetrahymena pyriformis* в стационарной фазе роста. Эффект токсического действия учитывается по реакции «жизнь-смерть». Токсикометрия в остром и подостром экспериментах осуществляется согласно Инструкции по гигиенической экспресс-оценке химических веществ, многокомпонентных смесей и полимерных материалов на *Tetrahymena pyriformis* №20-0102, утвержденной постановлением Главного санитарного врача Республики Беларусь от 11 июля 2002г.

В остром и подостром экспериментах определяются ЛД₁₆, ЛД₅₀, ЛД₈₄, Ккум. Длительность эксперимента – 1 неделя.

Изучение токсичности объектов в хроническом эксперименте осуществляется на протяжении жизненного цикла популяции Т.р. По результатам подсчета численности популяции в лаг-фазе, логарифмической фазе, фазе замедленного роста и стационарном состоянии рассчитывают показатели, характеризующие закономерности роста популяций: мгновенная скорость роста, время генерации, число поколений; рассчитывают ЕД₁₆, ЕД₅₀, ЕД₈₄, Ккум, Крез, Кад, Zchr. На

основании полученных данных определяют МНД и рассчитывают показатель ЛД₅₀/МНД.

По результатам оценки полученных результатов для каждой из исследуемых концентраций объекта устанавливают максимально недействующую концентрацию (дозу), которую учитывают при нормировании.

Основными показателями при установлении максимально недействующей дозы являются Кад, резистентность, мутагенная активность, определенные в хроническом эксперименте; учитывается также угнетение генеративной функции тест-объекта и летальность организмов в хроническом эксперименте. Летальность инфузорией по достижении популяцией стационарной фазы роста не должна превышать 5-10%. Коэффициенты адаптогенности и резистентности не должны иметь статистически значимых отклонений от контроля или отличаться от контрольного уровня более, чем на 10%. МНД устанавливают по лимитирующему показателю. Эта доза является исходной при подборе концентраций, рекомендуемых для внесения в почву с целью нормирования.

При расчете концентрации ЭХВ, рекомендуемой для внесения в почву с целью нормирования, следует МНД в мг/мл среды культивирования принять за безопасную концентрацию, в которой показатели Кад, Крез отличаются от контрольного уровня на 15-29%, где летальность инфузорий и угнетение генеративной функции достигают 20% - 25% считать умеренно опасной. Концентрация, в которой указанные ниже показатели отличаются от контрольного уровня на 30% и более, является опасной.

При пересчете концентрации ЭХВ в пробе на почву, следует концентрацию в пробе, выраженную в мг/мл, поделить на количество почвы, содержащееся в пробе (мг/мл) и умножить на 10⁶. Таким образом, мы получим концентрацию ЭХВ в почве в мг/кг.

Методика проведения исследований на *Tetrahymena pyriformis*:

Инокулят инфузорий – объем культуры Т.р. в мл, содержащий известное (подсчитанное) число особей.

Жизненный цикл популяции – в питательной среде стандартного состава Т.р. в течение 96 часов проходит лаг-фазу (0-24 часа), логарифмическую фазу (24-48 часов), фазу замедленного роста (48-72 часа) и к 96 часам вступает в стационарное состояние.

ЛД₁₆ – доза ЭХВ в мг/мл культуры, вызывающая в остром и подостром экспериментах гибель 16% организмов.

ЛД₅₀ – доза ЭХВ в мг/мл культуры, вызывающая в остром и подостром экспериментах гибель 50% организмов, средняя смертельная доза.

ЛД₈₄ – доза ЭХВ в мг/мл культуры, вызывающая в остром и подостром экспериментах гибель 84% организмов.

ЕД₁₆, ЕД₅₀, ЕД₈₄ – дозы ЭХВ, вызывающие в хроническом эксперименте угнетение генеративной функции Т.р. на 16%, 50%, 84% по отношению к контролю.

Ккум – коэффициент кумуляции. Определяется путем отношения средней смертельной дозы, определенной в подостром эксперименте к средней смертельной дозе, определенной в остром эксперименте; или путем отношения, ЕД₅₀, определенной в стационарной фазе роста хронического эксперимента к ЕД₅₀, определенной в логарифмической фазе роста хронического эксперимента.

Крез – коэффициент резистентности. Характеризует мембранотокические свойства.

Кад – коэффициент адаптогенности. Интегральный показатель, характеризующий адаптационный потенциал популяции. Рассчитывается в хроническом и пролонгированном экспериментах.

Рад – резерв адаптации. Показатель, характеризующий сохранение адаптационных возможностей популяции после длительного воздействия токсического агента.

МНД – максимально недействующая доза токсиканта, в мг/мл, определяемая в хроническом и пролонгированном экспериментах.

Zchr – зона хронического действия. Критерий опасности ЭХВ. Определяется путем отношения ЛД₅₀ к ЕД₅₀.

ЛД₅₀/МНД – показатель опасности ЭХВ, определяемый путем отношения средней смертельной дозы, определенной в остром эксперименте, к максимальной недействующей дозе, определенной в хроническом или пролонгированном экспериментах.

Аппаратура, лабораторная посуда, реактивы, материалы для исследований на *Tetrahymena pyriformis*:

Термостат, обеспечивающий температуру внутри камеры 25⁰С, холодильник, автоклав, биксы, шкаф для сухожаровой стерилизации, потенциометр, весы теххимические, весы аналитические, мельница лабораторная, сита, часы процедурные, микроскоп биологический, дозаторы пипеточные на 2-10 мл, 1-5 мл, 100-1000 мкл, 20-200 мкл, 5-50 мкл, ступки фарфоровые, набор сит, штативы лабораторные, ножницы, пинцеты анатомический и хирургический, скапель, счетная камера Фукса-Розенталя, спиртовка. Персональный компьютер, микрокалькулятор.

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, флакончики стеклянные из-под лекарств на 10 мл.

Пептон бактериологический, глюкоза кристаллическая и глюкоза 40% для инъекций, дрожжевой экстракт, натрий хлористый х.ч., 5% спиртовой раствор йода. Вата, марля, бинты, лейкопластырь, скотч, маркер.

Поскольку при работе с *Tetrahymena pyriformis* следует соблюдать стерильность, необходимы моечная, автоклавная, бокс с предбоксником, лабораторная комната. В боксе осуществляются работы, требующие строгого соблюдения стерильности: пересев маточной культуры, проведение хронического и пролонгированного экспериментов. Стерилизация бокса осуществляется бактерицидными лампами.

Культивирование *Tetrahymena pyriformis* W.

Инфузория *Tetrahymena pyriformis* W относится к типу Protozoa, классу Ciliata (ресничные инфузории). Свободноживущие инфузории этого класса характеризуются сложной организацией внутри одной клетки, имеют макро- и микроядро, обеспечивающее обмен генетической информацией в своеобразном половом процессе (конъюгация).

Инфузорий рода *Tetrahymena* можно выращивать на питательной среде с известным качественным и количественным составом, который можно варьировать в соответствии с задачами эксперимента. Исследования, проводимые в лабораториях мира по изучению ряда процессов и явлений с использованием этого тест-объекта, показывают, что эксперименты на *Tetrahymena* позволяют быстро и без больших материальных затрат получать данные, аналогичные явлениям у теплокровных животных и человека.

Tetrahymena pyriformis имеет удлиненную грушевидную форму с более плоским каудальным и слегка заостренным вентральным концом. Размер – 20x50 нм, вес – $1,5 \times 10^{-9}$ г. Клетка покрыта двухслойной мембраной с многочисленными порами: до 200 пор/мкм². Инфузория имеет ротовое отверстие с четырьмя мембранами, глотку, пищеварительные вакуоли, сократительную вакуоль. Штамм W в лабораторных условиях микроядра не имеет, но оно может появляться при неблагоприятных воздействиях. *Tetrahymena pyriformis* размножается делением через каждые 2-6 часов. Тип пищеварения – кислотно-щелочной. Оптимум pH для роста – 6,8-7,2. Температурные пределы жизни +13 +28⁰С. При температуре ниже 18⁰С рост инфузорий

резко замедляется, при температуре выше 30⁰С *Tetrahymena pyriformis* погибает.

Культура *Tetrahymena pyriformis* требует к себе большого внимания, ибо от сохранности ее и качества зависит исход всех последующих исследований. Наиболее надежный способ хранения культуры – систематический (1-2 раза в неделю) пересев ее на новую питательную среду.

Маточная культура инфузорий выращивается при температуре 25⁰С в питательной среде следующего состава:

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

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

РН среды А и Б доводят до 7,4. После этого среду разливают по 10 мл в стерильные конические колбочки на 50-100 мл с ватно-марлевыми пробками и автоклавируют при 1 атмосфере в течение 30 минут. В процессе стерилизации рН среды снижается до 7,1-7,2. После стерилизации колбочки со средой культивирования маточной культуры *Tetrahymena pyriformis* можно хранить в холодильнике при +4⁰С в течение месяца. *Tetrahymena pyriformis* является аэробом, поэтому желательно, чтобы слой среды культивирования в колбочке не превышал 1,5-2,0см.

В хроническом эксперименте используют питательную среду, приготовленную по прописи Б. Стерилизуют ее в 500-мл флаконах.

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. Такое чередование позволяет длительное время поддерживать жизнедеятельность инфузорий на оптимальном уровне.

Рабочую культуру Т.р., используемую в эксперименте, получают, проводя пересев в пятницу и понедельник. Изучение острой и подострой токсичности объектов в этом случае осуществляется в понедельник, вторник, четверг и пятницу.

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

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

В случае загрязнения культуры *Tetrahymena pyriformis* ее очищают антибиотиками, к которым загрязняющая культура микрофлора проявила чувствительность, или вытяжками из растительного сырья, обладающего бактерицидным действием.

Для подсчета инфузорий используют камеру Фукса-Розенталя. Считают под микроскопом при увеличении: объектив – 8, окуляр – 10. Инфузорий предварительно фиксируют 5% спиртовым раствором йода. Для этого 1 мл культуры вносят в 10-мл флакончик, добавляют каплю раствора йода. Флакончик закрывают пробкой и встряхивают. Фиксированную культуру вводят в камеру. 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. Если культура для удобства подсчета предварительно разводится, то при расчете числа инфузорий в 1 мл, учитывается разведение. Например, при добавлении к 1 мл культуры 3 мл воды для нахождения числа инфузорий в 1 мл культуры среднее число инфузорий в 1 квадрате камеры умножается на 20000.

Первичная токсикологическая оценка объектов на *Tetrahymena pyriformis*:

Исследование осуществляется на Т.р. в стационарной фазе роста, поддерживаемой в стандартной питательной среде при 25⁰С. Этот раздел исследований не требует строгого соблюдения стерильности. Стерильной должна быть только исходная культура *Tetrahymena pyriformis*.

Методика определения зависит от степени токсичности исследуемых объектов.

Первичная токсикологическая оценка ЭХВ осуществляется, как правило, в 30-минутном (острая токсичность) и 2-часовом (кумуляция) экспериментах.

Готовится водный раствор или суспензия исследуемого ЭХВ. В случае растворения препарата в органическом растворителе (спирт, ацетон) последний удаляется выпариванием после внесения раствора в воду или почву. Определяется смертельная и недействующая концентрация. Готовится 3-5 промежуточных концентраций. По 1 мл раствора каждой концентрации вносят в два десятимллитровых флакончика. В каждую пробу добавляют инокулят инфузорий в стационарной фазе роста (100000 организмов). При осуществлении острого эксперимента пробы инкубируют при 25⁰С в течение 30 минут; при проведении подострого эксперимента — в течение 2 часов. 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.

Важным этапом токсикологической оценки почвы является подготовка образца к анализу. Исследуемый образец почвы (ПК) высушивается до сухо-воздушного состояния, просеивается через сито с диаметром отверстий 0,225-0,315мм. Ph водной суспензии концентрации 500 мг/мл доводят до 7,2. При проведении острого и подострого экспериментов из основного раствора концентрации 500 мг/мл готовят серию разведений концентраций от 10 мг/мл до 400 мг/мл. Также как и при токсиметрии препарата по 1 мл раствора каждой концентрации вносят в два десятилитровых флакончика. В каждую пробу добавляют инокулят инфузорий в стационарной фазе роста (100000 организмов). При осуществлении острого эксперимента пробы инкубируют при 25⁰С в течение 3-6 часов; при проведении подострого эксперимента — в течение 24 часов. По истечении срока инкубации в нативном препарате под микроскопом наблюдают картину интоксикации. В счетной камере Фукса-Розенталя подсчитывают число погибших инфузорий до их фиксации и общее число инфузорий после фиксации раствором йода.

При осуществлении первичной токсикологической оценки почвы с внесенным ЭХВ необходимо соблюдать следующие условия:

Навески ПК подбирать таким образом, чтобы при конечном разведении почва содержалась в пробе в нетоксичной концентрации;

Концентрации вносимого в почву ЭХВ подбирать таким образом, чтобы при конечном разведении они были такими же, как и при осуществлении токсиметрии самого ЭХВ;

ПК вносится в мерные пробирки с притертыми пробками, в каждую пробирку одна и та же навеска. Пробы почвы увлажняют до исходной влажности. В опытные пробы вносят растворы ЭХВ, в контрольную – растворитель. Пробы выдерживают в течение 1-3 суток при комнатной температуре, затем разводят до необходимой концентрации и анализируют так, как и ЭХВ.

По результатам расчета % летальности тест-объекта при исследовании ЭХВ устанавливают основные параметры токсичности:

ЛД₁₆ – дозу, вызывающую гибель 16% особей;

ЛД₅₀ – дозу, вызывающую гибель 50% особей;

ЛД₈₄ – доза, вызывающую гибель 84% особей;

К_{кум} – коэффициент кумуляции как частное между средней смертельной дозой, полученной в подостром эксперименте и средней смертельной дозой, полученной в остром эксперименте.

Токсиколого-гигиеническая оценка объектов в хроническом эксперименте на *Tetrahymena pyriformis*

Исходными при постановке хронического эксперимента являются результаты первичной токсикологической оценки ЭХВ. Объекты исследуются в диапазоне концентраций, охватывающем токсичные, пороговые и малые дозы: 10^{-9} ; 10^{-8} ; 10^{-7} ; 10^{-6} ; 10^{-5} ; 10^{-4} ; 10^{-3} ; 10^{-2} ; 10^{-1} ; 10^0 ; 10^1 ; 5×10^1 ; 5×10^2 мг/мл. Исследование осуществляют в стерильных условиях. Растворы исследуемых объектов и стерильная среда культивирования разливаются в стерильные колбочки с ватно-марлевыми пробками. Каждая концентрация исследуется не в трех повторностях.

Колбочки с растворами дополнительно стерилизуются при 80-90⁰С в течение 15-20 минут. После охлаждения в пробы вносят по 20 000 инфузорий в стационарной фазе роста. Пробы в течение 96 часов выдерживают в термостате при 25⁰С. Регистрация состояния инфузорий и подсчет организмов осуществляют через 24 (лаг-фаза), 48 (логарифмическая фаза), 72 (фаза замедленного роста), 96 (стационарная фаза) часов. Для этого из каждой колбочки стерильно отбирают по 1 мл культуры.

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

Морфологические:

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, пириолоном.

Функциональные:

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.

После фиксации 1 каплей 5% раствора йода подсчитывают число организмов в счетной камере Фукса-Розенталя в 10 больших квадратах. Умножая среднее число организмов в 1 квадрате на 5000, получают число особей в 1 мл культуры.

Математическую обработку результатов подсчета инфузорий проводят по специально разработанной программе на персональном компьютере или используют следующие формулы:

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

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 увеличению дозы. Угнетение роста для каждой из доз в этом диапазоне рассчитывают по формуле:

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

N_o – число организмов в опыте

N_k – число организмов в контроле

ЕД₁₆, ЕД₅₀, ЕД₈₄ рассчитывают с использованием таблиц и формул, используемых для определения ЛД₁₆, ЛД₅₀, ЛД₈₄

По результатам, полученным в хроническом эксперименте, учитывают следующие показатели опасности:

ЕД₅₀ – дозу, вызывающую угнетение генеративной функции на 50% в логарифмической (24 или 48 часов) и стационарной (72 или 96 часов) фазе роста

Ккум при хроническом воздействии путем отношения ЕД₅₀, определенной через 96 часов (стационарная фаза) к ЕД₅₀, определенной через 24-48 часов (логарифмическая фаза)

Скорость роста, время генерации, число поколений, численность популяции

Коэффициент адаптогенности (Кад), характеризующий адаптационный потенциал популяции

МНД – максимально недействующую дозу

Zchronica – зону хронического действия отношением средней смертельной дозы, определенной в остром эксперименте к дозе, угнетающей рост популяции на 50% в стационарной фазе хронического эксперимента.

ЛД₅₀/МНД – показатель опасности почвы определяют путем отношения средней смертельной дозы, определенной в остром эксперименте, к максимальной недействующей дозе, определенной в хроническом эксперименте.

По результатам оценки полученных результатов для каждой из исследуемых концентраций объекта устанавливают максимально недействующую концентрацию (дозу).

Основными показателями при установлении максимально недействующей дозы являются Кад, резистентность, мутагенная активность, определенные в пролонгированном эксперименте. Эти показатели не должны иметь статистически значимые отклонения от контроля.

Приложение 24
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Определение активности целлюлазы в почве

Ход определения: 1г почвы в колбу ёмкостью 50 мл, добавляют 1,5 мл толуола, затем 5 мл ацетатного буфера (рН 5,5) и 5 мл 1%-ного раствора КМЦ. Реакционную смесь тщательно перемешивают, колбу закрывают пробкой и ставят в термостат при 35° на 48-72 часа. В контроле вместо субстрата добавляют 5 мл воды, вторым контролем являются реактивы без почвы.

После инкубации колбу нагревают на водяной бане до 100°С. Затем добавляют 0,3г алюмокалиевых квасцов для осаждения КМЦ. Содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр в мерные колбы ёмкостью 50 мл, и объём фильтрата доводят до метки дистиллированной водой. 2 мл фильтрата переносят в термостойкие пробирки ёмкостью 40-50 мл и добавляют 4 мл антронового реактива, выдерживают 30 минут. И колориметрируют против первого контроля с синим светофильтром (551 нм) в кюветах шириной 10мм. Количество образовавшейся глюкозы рассчитывают по предварительно составленной калибровочной кривой.

Целлюлазную активность выражают в миллиграммах глюкозы на 1г почвы.

Реактивы:

1%-ная карбоксилметилцеллюлоза (КМЦ); толуол; ацетатный буфер рН 5,5 (к 57,4 мл 1-н. раствора уксусной кислоты прибавляют 50 мл 1-н. раствора гидроксида натрия и разбавляют дистиллированной водой до 500 мл); алюмокалиевые квасцы; реактив антрона – 0,2%-ный раствор антрона в 95%-ном H_2SO_4 (по объёму). К 5 мл воды прибавляют 100 мл концентрированной серной кислоты и после охлаждения вносят 200 мг антрона и оставляют на 4 часа на льду. Используют только свежеприготовленный раствор;

стандартный раствор глюкозы для составления калибровочной кривой - к 2,5 мл раствора глюкозы (в концентрациях от 10 до 200 мкг в 1 мл) добавляют 5 мл антрона и колориметрируют.

Приложение 25
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Определение нитратного азота дисульфифеноловым методом в
почве

В основе метода лежит взаимодействие нитратов с дисульфифеноловой кислотой. В результате этой реакции образуется нитропродукт – соль пикриновой кислоты, окрашивающий раствор в жёлтый цвет.

Дисульфифеноловый метод позволяет определить только азот нитратов и даже при большом содержании нитритов он даёт правильные показания.

Ход определения: 5 ± 0,01г почвы помещают в колбу вместимостью 250 см³ и приливают 250 см³ дистиллированной воды. Взбалтывают в течение 3 минут, добавляют 3-4 капли толуола, взбалтывают 5 минут и фильтруют. При анализе почвы с массовой долей влаги менее 40% суспензию настаивают 18-20 часов и фильтруют через складчатый фильтр из плотной бумаги. Если прозрачный фильтрат сильно окрашен, его осветляют. Осветление темноокрашенных растворов производят следующим образом: к взятому на определение количеству фильтрата (10-15 см³) добавляют 1 см³ раствора NaOH или KOH массовой долей 10%, взбалтывают и добавляют по каплям насыщенный раствор алюмокалиевых квасцов или 1-2 см³ раствора алюминия сернокислого массовой долей 15%. При этом появляется муть, вначале исчезающая, а затем, собирающаяся в хлопья. Жидкость отфильтровывают в фарфоровую чашку и используют для определения нитратов. Мутные растворы перефильтровывают несколько раз.

В зависимости от ожидаемого содержания нитратов берут 5-50 мл подготовленной вытяжки, помещают в фарфоровую чашечку соответствующего объёма и выпаривают на водяной бане с электрическим обогревом.

После выпаривания чашки с сухим остатком снимают с горячей бани и дают им полностью охладиться. В каждую чашку приливают по 1 мл дисульфифеноловой кислоты. Сухой остаток тщательно растирают стеклянной палочкой не только на середине чашки, где сухой остаток заметен, но и по бокам чашки, где осадка не видно.

После обработки нитратов дисульфифеноловой кислотой чашки оставляют стоять 10 минут, затем в каждую из них приливают по 15 мл дистиллированной воды. После чего нейтрализуют кислый раствор 20%-ным раствором NaOH до щелочной реакции (по лакмусовой бумажке).

Окрашенные в жёлтый цвет растворы переносят в мерные колбочки ёмкостью 50 или 100 мл (в зависимости от содержания нитратов). Чашки вместе с палочкой 3-4 раза обмывают дистиллированной водой, прибавляя эту воду к основному раствору. Содержимое колбы доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

Измерение оптической плотности окрашенных растворов проводят на фотоэлектроколориметре с синим светофильтром при длине волны 400-450 нм в кюветах с толщиной поглощающего свет слоя 10мм.

Обработка результатов.

Массу нитратного азота (X) в миллиграммах на 100 г почвы при натуральной влаге вычисляют по формуле:

$$X = \frac{m \cdot 250 \cdot K \cdot 100}{V \cdot m_1}, \text{ где}$$

m – масса нитратного азота, соответствующая на градуировочном графике отчёту на фотоэлектроколориметре, мг;

250 – объём воды, приливаемой к навеске исследуемой почвы, см³;

V – объём фильтрата, взятый на определение, см³;

m_1 – масса навески почвы, г;

K – поправка на разбавление фильтрата.

Массу нитратного азота (X_1) в миллиграммах на 100 г сухого вещества вычисляют по формуле:

$$X_1 = \frac{x \cdot 100}{100 - W}$$

где: W – массовая доля влаги почвы, %.

Реактивы:

Кислота серная плотностью 1,84 г/см³.

Фенол.

Калия гидроксид или натрия гидроксид, растворы с массовой долей 10 и 20%.

Квасцы алюмокалиевые, насыщенный раствор или алюминий сернокислый по ТУ 6–09–2247, раствор с массовой долей 15%.

Калий азотнокислый по ГОСТ 4217, перекристаллизованный и высушенный до постоянной массы при температуре 105° С.

Дисульфифеноловая кислота.

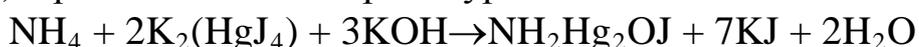
Основной образцовый раствор А калия азотнокислого (KNO_3) массовой концентрации $0,1 \text{ мг/см}^3$. Готовят из навески массой $0,7218 \pm 0,0002 \text{ г}$ калия азотнокислого в мерной колбе 1 дм^3 , доводя дистиллированной водой до метки.

Рабочий раствор Б получают путем разбавления раствора А дистиллированной водой в 10 раз, который затем применяют для приготовления шкалы образцовых растворов. В 1 см^3 рабочего раствора Б содержится $0,01 \text{ мг}$ азота. Рабочий раствор неустойчив, поэтому его готовят непосредственно перед определением.

Приложение 26
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Определение аммиачного азота

Метод основан на образовании окрашенного соединения йодистого меркураммония при взаимодействии аммиака (или иона NH_4^+) с реактивом Несслера по уравнению:



Для связывания Ca^{2+} и Mg^{2+} (мешающих определению) прибавляют сегнетову соль. Определение проводят в солевой вытяжке из свежей, только что отобранной почвы. Количественные показатели содержания аммиака в почве позволяют судить об обеспеченности почвы аммиачным азотом и о степени выраженности процесса аммонификации.

Ход определения: навеску массой $5,00 \pm 0,01$ г почвы помещают в колбу вместимостью 750 см^3 и приливают 500 см^3 раствора соляной кислоты концентрацией $0,1 \text{ Моль/дм}^3$, перемешивают и настаивают 18-20 часов. Затем суспензию переносят на бумажный фильтр и фильтруют. Пипеткой отбирают (в зависимости от содержания NH_4^+) $2-5 \text{ см}^3$ вытяжки, помещают в мерную колбу ёмкостью 50 см^3 , прибавляют 2 см^3 50%-ного раствора сегнетовой соли и дистиллированную воду до половины объёма, хорошо перемешивают. После этого прибавляют 2 см^3 реактива Несслера и доводят объём в колбе дистиллированной водой до метки. Тщательно перемешивают содержимое колбы после добавления каждого реактива.

Через 5-10 минут определяют оптическую плотность растворов на фотоэлектроколориметре, с синим светофильтром при длине волны 400-425 нм в кюветах с толщиной поглощающего светового слоя 10 или 20 мм, используя в качестве эталона сравнения кювету с контрольным раствором.

Контрольный раствор содержит все реактивы, кроме образцового раствора и проходит все стадии анализа.

Для приготовления рабочего образцового раствора хлористого аммония массовой концентрации $0,01 \text{ мг/см}^3$ брали основной образцовый раствор хлористого аммония (NH_4Cl) массовой концентрации $0,1 \text{ мг/см}^3$, который готовили путем растворения $0,3821 \text{ г}$

хлористого аммония дистиллированной водой в мерной колбе 1 дм³. Из рабочего образцового раствора готовили серию эталонных растворов.

Массу аммиачного азота (X) в мг на 100г почвы при натуральной влаге вычисляют по формуле:

$$X = \frac{m \cdot V \cdot K' \cdot 100}{V_1 \cdot m_1},$$

где: m – масса аммиачного азота, соответствующая на градуировочном графике отчёту на фотоэлектроколориметре, мг;

V – общий объём фильтрата, см³;

V_1 – объём фильтрата, взятый для определения, см³;

K' – поправка на разбавление фильтрата;

m_1 – масса навески, г.

Массу аммиачного азота (X), в миллиграммах на 100г сухой почвы вычисляют по формуле:

$$X_1 = \frac{X \cdot 100}{100 - W},$$

где: W – массовая доля влаги в почве, %.

Реактивы:

Кислота соляная по ГОСТ 3118 плотностью 1,19 г/см³, раствор концентрации $c(\text{HCL}) = 0,1$ Моль/дм³ (0,1 н).

Калий-натрий виннокислый (сегнетова соль) по ГОСТ 5845, перекристаллизованный.

Реактив Несслера по ТУ-6-09-2089.

Аммоний хлористый по ГОСТ 3773, перекристаллизованный и высушенный до постоянной массы при температуре 100-105°С.

Основной образцовый раствор А хлористого аммония.

Рабочий образцовый раствор Б хлористого аммония.

Приложение 27
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Интенсивность выделения CO_2 в почве

Метод основан на учёте количества выделившегося в процессе минерализации органического вещества почвы углекислого газа.

Ход определения: в сосуд с почвой ставят два стеклянных либо пластмассовых стаканчика – один для щёлочи, поглощающей выделившуюся углекислоту, другой – для воды. В первый стаканчик наливают 25 мл 0,2 н едкой щёлочи, в другой – 10-15 мл дистиллированной воды. Сосуд закрывают плотно крышкой, исключающей утечку углекислого газа.

Выделяющийся при разложении почвы углекислый газ поглощается щёлочью. Для его количественного учёта содержимое стаканчика без потерь переносят в колбу для титрования, дважды смывая стаканчик водой, добавляют 10 мл 10%-ного раствора хлористого бария для осаждения поглощенного углекислого газа в виде BaCO_3 , а затем три капли фенолфталеина и титруют 0,1 н соляной кислотой, приготовленной из фиксаля. Одновременно ставят контрольный опыт без почвы.

Количество выделившегося в процессе минерализации углекислого газа определяют по формуле:

$$\text{CO}_2 = (X_0 - O) \times 2,2, \text{ мг, где}$$

X_0 и O – количество соляной кислоты, которое пошло на титрование контрольного опыта и опыта с почвой соответственно, мл; 2,2 – количество CO_2 , соответствующее 1 мл соляной кислоты, мг.

Интенсивность выделения углекислого газа определяется по формуле:

$$\text{CO}_2 = \frac{(x_0 - O) \cdot 2,2}{M \cdot t} \cdot 100, \text{ где}$$

M – масса абсолютно-сухой почвы, г или объем образца почвы, см^3

t – время ведения опыта, час.

Приложение 28
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Определение миграционного воздушного показателя в почве

В 3 эксикатора с пришлифованными крышками и пробками с двумя отводами, вносят по 1кг почвы с содержанием ЭХВ в концентрациях равных $\frac{1}{2}$ и $\frac{1}{4}$ от исследуемых в пределах опыта, с влажностью 60%. Первый образец почвы используется в качестве контрольного, второй и третий содержат равномерно распределенное ЭХВ.

Эксикаторы плотно закрывают крышками, герметизируют отводы в пробке и помещают в термостат и выдерживают при температуре 50⁰С. С помощью электроасpirатора проводят отбор проб воздуха из эксикаторов через поглотители, выбор которых зависит от изучаемого вещества и метода анализа. Через эксикаторы прокачивают объем воздуха, равный 10 объемам каждого из них, со скоростью аспирации воздуха не более 1 дм³/мин. Отбор воздуха для анализа содержания вещества проводят через 24 часа от начала опыта.

Приложение 29
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Определение миграционного водного показателя в почве

Опыт проводится в стеклянных фильтрационных колонках (делительных воронках) длиной 25см, $d = 10$ см, заполненных почвой, увлажненной на 60% от полной влагоемкости, на 20см. Нижний конец колонки заполняется для дренажа битым стеклом, между почвой и стеклом помещается слой марли и кружок фильтровальной бумаги, под воронкой ставится колба для сбора фильтрата, который анализируется на содержание изучаемого вещества.

Количество колонок с исследуемым веществом - не менее трех, 4-я используется в качестве контроля. Почву, обработанную ЭХВ в соответствии с его физико-химическими свойствами, приводят к влажности 60% от полной влагоемкости и досыпают в фильтрационные колонки, доводя высоту слоя почвы до 25см. Продолжительность опыта 1 месяц. Исходя из среднегодовой нормы осадков (600 мм/год) и диаметра (площади) колонок, рассчитывается норма полива почвы в колонках, которая равна 3-месячной норме осадков. При диаметре колонки 8см она составляет 36 см^3 в сутки. Полив производится дистиллированной водой в течение 1 месяца по 5 дней в неделю. Фильтрат собирают порциями, объем которых обеспечивает определение вещества на уровне чувствительности метода.

Приложение 30
к Инструкции по определению
дифференцированных
гигиенических нормативов
загрязнения почв

Методы изучения генотоксичности

В случае, когда необходимо оценить потенциальное генотоксическое действие ЭХВ, следует провести серию тестов *in vitro* и *in vivo*. Эта серия должна включать, по крайней мере, три испытания. При этом, по меньшей мере два из них необходимо выполнить на клетках млекопитающих - клетках мишенях. Желательно, чтобы эти тесты распространялись на три уровня генотоксических эффектов: ДНК-воздействие, генные мутации и хромосомные aberrации.

Приготовление проб.

Перед приготовлением экстрактов и началом испытаний все материалы или изделия должны быть в готовом к употреблению виде (т.е. в виде конечной продукции). Тестированию подвергают либо экстракты, либо образцы в виде суспензий. Необходимо использовать два вида экстрагирующих сред: для гидрофильных и гидрофобных соединений, например дистиллированная вода и диметилсульфоксид, который вполне совместим с тест-системой.

Исследования *in vitro*.

В случае, когда условия эксперимента желательно приблизить к условиям организма человека или животных, целесообразно использовать свежую цельную кровь. Вытяжки и контрольные растворы желательно вносить в объеме не более 5% от общего объема. Инкубацию проводят в гепаринизированных пробирках в атмосфере с 5% CO₂, при 37°C.

Сроки инкубации не более 6 часов, далее из крови готовят мазки по стандартной схеме и окрашивают по Гимза. Учитывают лимфоциты и нейтрофилы с микроядрами и признаками фрагментации ядра. Число клеток на препарат: 200 на мазках крови человека и собак, не менее 50 на мазках крови крыс и мышей. Этот метод достаточно чувствителен и хорошо воспроизводим.

Исследования *in vivo*.

В экспериментах с применением цитогенетических тестов лучше использовать линейных животных одного возраста и пола. В случаях,

когда предполагается возможность метаболической активации, рекомендуется использовать половозрелых самцов мышей линии C57BL/6j массой около 20 г.

Выбор цитогенетических тестов определяется условиями введения в организм животных водных или иных вытяжек. При внутрибрюшинном введении необходимо проводить стерилизацию образцов, инъекции однократные. При введении образцов внутрижелудочно зондом необходимо провести не менее 3-х кормлений в течение 3-х суток. Следует учитывать, что метафазный метод наиболее информативен в течение 12-24 часов после воздействия и в сроки не более 3-х суток, так как клетки с цитогенетическими повреждениями очень быстро элиминируются из костного мозга. Учет микроядер в полихроматофильных эритроцитах костного мозга лучше начинать не ранее 18-24 часов и не позднее 72 часов после воздействия. На мазках костного мозга можно попутно учитывать признаки программированной клеточной гибели (апоптоза) и возможные отклонения в процессах дифференцировки. Однако в отдаленные сроки от начала воздействия, когда оно приобретает хронический характер, этот тест может оказаться неэффективным. Поэтому можно дополнить исследования микроядерными тестами с использованием клеток железистого кишечного эпителия (12-перстная кишка) и легочных тканей – альвеолоцитов II типа и тканевых макрофагов. Именно в тканевых макрофагах реализуются цитогенетические повреждения, возникшие из потенциальных повреждений ДНК, полученных в костном мозге при дифференцировке моноцитов. Дополнительную информацию дает учет микроядер и признаков апоптоза в тимоцитах. В первые часы после воздействия (4-8 час) цитогенетические повреждения в большей степени отражают повреждения ДНК. В более отдаленные сроки они отражают состояние клеточного иммунитета и сопутствующие изменению иммунологического состояния перестройки клеточных популяций в тимусе.

ДНК-повреждающее действие. Исследования проводят на ДНК фага λ . Контролями служат интактная ДНК и ДНК в присутствии системы метаболической активации и бензидина, вещества с доказанной генотоксичностью. Поврежденная продуктами окисления бензидина ДНК утрачивает электрофоретическую подвижность и остается на старте.

Условия проведения реакции: объем реакционной смеси 25 мкл; 0,1М цитратно-ацетатный буфер pH 5,5; пероксидаза хрена [ПХ] = 10⁻⁸М; [H₂O₂] = 10⁻³М; [ДНК фага λ] = 0,15 мкг; раствор возрастающей концентрации изучаемого вещества в диметилформамиде (ДМФ). В контрольную пробу вносят бензидин в повреждающей ДНК

концентрации [5×10^{-6} М]. Конечная концентрация ДМФ во всех пробах, включая контрольные, составляет 20%. В ячейках иммунологического планшета смешивают буфер, ДНК в физиологическом растворе, раствор пероксидазы и расчетное количество исследуемого вещества. Реакцию начинают добавлением перекиси водорода. Смесь инкубируют в течение часа, затем в ячейки приливают по 10 мкл смеси, состоящей из буфера, глицерина и лидирующего красителя бромфенолового синего, пробы вносят в гель (по 10 мкл на дорожку). Горизонтальный электрофорез проводят при силе тока 90 мА, напряжении 80 В в 0,8% агарозном геле с использованием 0,1 М трис-фосфатного буфера и 0,008 М ЭДТА. Интеркалирующий реагент – бромистый этидий (Sigma). ДНК в геле просматривают на трансиллюминаторе и сканируют в ультрафиолетовом свете на приборе типа IMFGE MASTER VDS – CL.

Метафазный метод. Мышам 0,1% раствор колхицина вводят внутрибрюшинно в объеме 0,1-0,2 мл. Через 1 час животных умерщвляют путем дислокации шейных позвонков, извлекают бедренные кости и, срезав эпифиз, вымывают костный мозг гипотоническим раствором, нагретым предварительно в термостате до 37⁰С. Затем пробирку с клеточной суспензией помещают в термостат при 37⁰С на 13-15 мин, далее центрифугируют (1000 оборотов, 5 мин) и добавляют фиксатор. Фиксатор меняют трижды, через 5, 15 и 40 минут. На следующий день готовят препараты путем нанесения клеточной суспензии на чистые охлажденные предметные стекла. После окраски стекла ополаскивают чистой водой, сушат при комнатной температуре и затем анализируют. На препаратах учитывают различные хромосомные aberrации хроматидного и хромосомного типов. В случае длительного хранения цитогенетических препаратов в суспензии объем фиксатора должен быть 5-10 мл. Пробирки надо держать в холодильнике при температуре 3-4⁰С.

Микроядерные тесты. Для приготовления мазков клетки костного мозга вымывают из бедренных костей мышей 50% эмбриональной телячьей сывороткой на фосфатном буфере (рН=7.0-7.2). Перед приготовлением мазков тимоцитов тимус взвешивают, перетирают и вымывают клетки через нейлоновую сетку в центрифужную пробирку фосфатным буфером с добавлением эмбриональной бычьей сыворотки (5-10%). После удаления надосадочной жидкости пипеткой переносят осадок на обезжиренное предметное стекло и делают мазок. Сразу после высыхания препаратов костного мозга и тимуса их фиксируют этиловым спиртом. Подсчитывают по 1000 полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) с микроядрами на одно животное, в тех же полях считают число эритроидных клеток с признаками апоптоза. Апоптоз можно учитывать и на клетках, не относящихся к эритроидному ряду.

Альвеолярные макрофаги извлекают путем бронхоальвеолярного лаважа. После забоя животных препарируют и через канюлю в разрез трахеи вводят 1 мл 0,9% NaCl комнатной температуры на 1-2 минуты. Затем отсасывают содержимое шприцем из легких и сливают в центрифужную пробирку. Процедуру повторяют 4-5 раз, суспензию клеток центрифугируют 10 мин при 1500 об/мин. Осадок ресуспендируют в 1-2 каплях оставшейся жидкости. Препараты готовят путем размазывания капли по обезжиренному стеклу, сушат и фиксируют в смеси этанола и уксусной кислоты (3:1). На таких препаратах присутствуют практически одни макрофаги.

Препараты альвеолоцитов II готовят из легочной ткани путем ее измельчения в капле 0,9% NaCl, после разведения фильтруют через капроновую ткань в пробирку. Суспензию центрифугируют (1500 об/мин, 10 мин). Осадок ресуспендируют и готовят мазки по вышеприведенной схеме. На таких препаратах фрагменты ткани, состоящие из нескольких клеток, сохраняют свойственную альвеолоцитам II прямоугольную форму, от альвеолоцитов I типа их отличает и больший объем цитоплазмы. Подсчитывают количество клеток с микроядрами на 1000 клеток от каждого животного.

Для приготовления цитогенетических препаратов клеток кишечного эпителия выделяют 12-перстную кишку, измельчают ее ножницами в капле инактивированной эмбриональной сыворотки. Суспензию фильтруют через капроновую ткань и центрифугируют 10 минут при 1500 об/мин. После удаления надосадочной жидкости материал ресуспендируют, наносят на обезжиренное стекло и делают мазки. Препарат фиксируют в смеси этанола и уксусной кислоты (3:1) 15 минут. Для удаления слизи проводят гидролиз в 1N HCl в течение 2-х минут при комнатной температуре, 5 минут - при 60⁰C, после чего препараты охлаждают в 1N HCl при комнатной температуре и промывают дистиллированной водой. Окраску препаратов производят красителем Гимза, разведенным (1:20) дистиллированной водой. В каждой группе было четыре-пять животных, у каждого из которых анализировали 1000 цилиндрических клеток. Учет микроядер можно проводить также и на гистологических препаратах в случае проведения подобных исследований.

Все цитогенетические препараты рекомендуется проводить через сутки после приготовления красителем Гимза, разведенным 1:20 дистиллированной водой в течение 3-5 мин в зависимости от качества красителя.

В метафазном и микроядерном тестах на клетках костного мозга для сравнительной оценки в качестве положительного контроля в

рекомендуются вещества с доказанной генотоксичностью, такие как митомицин С.

Статистическую обработку при небольших (3-5) группах линейных животных лучше проводить путем оценки по χ^2 в четырехклеточных таблицах. При большем числе животных, особенно при использовании нелинейных животных, предпочтительным является сравнение вариационных рядов. Критерием выявления отрицательного воздействия служит получение статистически достоверных различий между опытом и контролем.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Инструкция по определению дифференцированных
гигиенических нормативов загрязнения почв

	стр.
Глава 1 Область применения	2
ГЛАВА 2 Термины и определения	2
ГЛАВА 3 Порядок определения дифференцированных гигиенических нормативов ЭХВ в почве	4
ГЛАВА 4 Отбор проб и проведение исследования почвы	5
ГЛАВА 5 Определение регионального ландшафтно- геохимического фона	6
ГЛАВА 6 Определение основных показателей для обоснования гигиенических нормативов	7
ГЛАВА 7 Определение стабильности экзогенных химических веществ в почве и выбор их рабочих концентраций	9
ГЛАВА 8 Оценка фитотоксичности экзогенных химических веществ	11
ГЛАВА 9 Оценка транслокационного показателя экзогенных химических веществ	14
ГЛАВА 10 Изучение влияния ЭХВ на общесанитарный показатель почв	15
ГЛАВА 11 Изучение миграционного воздушного показателя экзогенных химических веществ	17
ГЛАВА 12 Изучение миграционного водного показателя ЭХВ в почве	19
ГЛАВА 13 Токсикологические исследования	20
Приложение 1 Функциональные зоны земель населенных пунктов	22
Приложение 2 Порядок определения дифференцированных гигиенических нормативов загрязнения почв	24
Приложение 3 Акт отбора проб почвы	25
Приложение 4 Оптимальное число проб в выборке для малых площадок в центральной части аномалии	27
Приложение 5 Оценочные показатели для обоснования ПДК ЭХВ в почве	28
Приложение 6 Предельно-допустимые концентрации некоторых химических веществ в почве и допустимые уровни их содержания по показателям вредности	29
Приложение 7 Определение гумуса почвы по методу В.Тюрина	34

Приложение 8 Определение гранулометрического состава почвы методом пипетирования	36
Приложение 9 Определение полной влагоемкости почвы	40
Приложение 10 Метод определения обменной кислотности почвы	42
Приложение 11 Метод определения влаги в почве	43
Приложение 12 Метод определения плотности почвы	44
Приложение 13 Определение подвижного фосфора в почвах	45
Приложение 14 Определение подвижного калия в почве	47
Приложение 15 Определение стабильности ЭХВ в почве	48
Приложение 16 Периодичность определений вещества в почве при изучении стабильности	49
Приложение 17 Метод выбора растений (фитопретендентов) по всхожести семян в почве	50
Приложение 18 Биологический тест фитотоксичности ЭХВ на проращивание семян в почве	51
Приложение 19 Биологический тест фитотоксичности экзогенных химических веществ на проростках семян в почве	52
Приложение 20 Биологический тест проверки выбранных концентраций исследуемых веществ на проростках семян в почве	53
Приложение 21 Метод вегетационного опыта по изучению транслокационного показателя вредности на почве	54
Приложение 22 Метод полевого исследования транслокационного показателя вредности на почве	56
Приложение 23 Предварительное обоснование диапазона концентрации ЭХВ для последующих экспериментов по влиянию на микробоценоз и биохимическую активность почвы	59
Приложение 24 Определение активности целлюлазы в почве	69
Приложение 25 Определение нитратного азота дисульфифеноловым методом в почве	70
Приложение 26 Определение аммиачного азота	73
Приложение 27 Интенсивность выделения CO ₂ в почве	75
Приложение 28 Определение миграционного воздушного показателя в почве	76
Приложение 29 Определение миграционного водного показателя в почве	77
Приложение 30 Методы изучения генотоксичности	78

ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ
Инструкция по определению дифференцированных
гигиенических нормативов загрязнения почв

1. Настоящая Инструкция разработана ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены» Министерства здравоохранения Республики Беларусь (С.М. Соколов, А.И. Котеленец, И.И.Ильюкова, С.Ю. Петрова, А.М.Войтович);
ИПИПРЭ НАН РБ (В.С.Хомич)
«БелНИИЦзем» (Г.В.Дудко)
БГУ (О.В.Лукашев)
РУП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»
(Зенькевич В.В.)
2. Утверждена Заместителем Министра здравоохранения –
Главным государственным санитарным врачом Республики Беларусь
от 27 апреля 2007 г. Регистрационный № 021-0407
3. Введена впервые.