УДК 619:611-013.11:620.193.8[083.74] Группа Р39

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

СПЕРМА БЫКОВ НЕРАЗБАВЛЕННАЯ
Методы биологических исследований

Non-diluted sperm of bulls.
Methods of biological tests

ГОСТ 20909.4—75

Постановлением Государственного комитета стандартов Совета Министров СССР от 19 сентября 1975 г. № 2440 срок действия установлен

с 01.07.76
до 01.07.81

Несоблюдение стандарта преследуется по закону

Настоящий стандарт распространяется на неразбавленную свежеполученную сперму быков и устанавливает методы испытаний биологических свойств спермы — подвижности спермиев, абсолютной выживаемости и выживаемости спермиев в часах, осмотической (физиологической) резистентности, активности дегидрогеназ и резистентности спермиев к холодовому шоку.

1. МЕТОД ОТБОРА ПРОБ

1.1. Отбор проб — по ГОСТ 20909.1—75.

1.2. Для проведения испытаний используют сперму, хранившуюся при температуре 30—35°С не более 30 мин с момента ее получения.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОДВИЖНОСТИ СПЕРМИЕВ

Сущность метода заключается в определении количества спермиев с прямолинейным поступательным движением.

2.1. Оборудование и реактивы

2.1.1. Для проведения испытания применяют:

микроскоп биологический марки МБИ или МБР по ГОСТ 8284—67;

термостат ТМ-1 или другой конструкции, снабженный стандартным контактным или нестандартным однотемпературным термометром;

Издание официальное Перепечатка воспрещена

gost.e-ecolog.ru

стекла покровные по ГОСТ 6672—59;
стекла предметные по ГОСТ 9284—59;
стекла предметные с углублением;
палочки стеклянные или пипетки пастеровские;
натрий лимоннокислый трехзамещенный по ГОСТ 5.1314—72, 3%-ный раствор;
натрий хлористый по ГОСТ 4233—66, 1%-ный раствор.

2.2. Подготовка к испытанию

2.2.1. Подготовка и стерилизация лабораторной посуды — по ГОСТ 20909.2—75.

2.2.2. Термостат включают за 20—30 мин до начала работы. Температура в термостате должна быть 40—42°С.

2.2.3. Предметные и покровные стекла, стеклянные палочки, пипетки и растворы подогревают до 35—40°С.

2.3. Проведение испытания

2.3.1. Подвижность спермиев определяют в раздавленной капле спермы под микроскопом в проходящем свете при увеличении 100—180×. Более точно количество живых и мертвых спермиев определяют в счетной камере по ГОСТ 20909.3—75.

2.3.2. При определении подвижности спермиев под микроскопом наносят на предметное стекло теплой стерильной стеклянной палочкой или пастеровской пипеткой небольшую каплю спермы, к которой добавляют двух-четырехкратное количество 3%-ного раствора лимоннокислого натрия. Сперму с раствором лимоннокислого натрия тщательно перемешивают и накрывают покровным стеклом. Просматривают под микроскопом весь препарат. Подсчет спермиев производят не менее чем в трех полях зрения микроскопа с наибольшей подвижностью спермиев. Подсчитывают количество спермиев с прямолинейным поступательным движением и отдельно — количество спермиев с неправильным движением — манежным (перемещение по кругу), колебательным (спермии не перемещаются, но производят движение головкой или хвостиком) и мертвых спермиев.

2.4. Обработка результатов

2.4.1. Подвижность спермиев ($П_с$) в баллах вычисляют по формуле

$$П_с = \frac{n_1 \cdot 10}{n},$$

где n — общее число подсчитанных спермиев;

n_1 — число подсчитанных спермиев с прямолинейным поступательным движением;

10 — постоянный коэффициент.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений. Минимальной подвижностью спермиев принято считать подвижность, равную 0,5 балла.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АБСОЛЮТНОЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ И ВРЕМЕНИ ВЫЖИВАЕМОСТИ СПЕРМИЕВ

Сущность метода заключается в установлении подвижности спермиев за каждый последовательный интервал времени в процессе хранения спермы после ее разбавления.

Выживаемость спермиев в часах определяют по количеству времени, прошедшего от начала хранения спермы до ее гибели.

3.1. Оборудование и реактивы

3.1.1. Оборудование и реактивы — по п. 2.1;

глюкозо-цитратно-желточная среда — по ГОСТ 14746—69.

3.2. Проведение испытания

3.2.1. Отбирают из одного эякулята или серии спермы не менее двух проб для анализа, которые разбавляют глюкозо-цитратно-желточной средой, приготавливая одно из разведений от 1:8 до 1:32, и сохраняют при 2—5°С.

Подвижность спермиев определяют через каждые 24 ч (в начале хранения можно через 48 ч) по п. 2.3. Последним днем испытания считают день, когда наблюдается единичная подвижность спермиев и нельзя установить минимальную подвижность спермиев в баллах.

3.3. Обработка результатов

3.3.1. Абсолютную выживаемость спермиев (S) вычисляют по формуле

$$S = a_1 t_1 + a_2 t_2 + a_3 t_3 + \ldots + a_n t_n,$$

где $a_1, a_2, a_3 \ldots a_n$ — подвижность спермиев за интервалы времени, баллы;

$t_1, t_2, t_3 \ldots t_n$ — последовательные интервалы времени, в течение которых подвижность спермиев соответственно равна $a_1, a_2, a_3 \ldots a_n$, ч, вычисляемые по п. 3.3.2;

$a_1 t_1, a_2 t_2, a_3 t_3 \ldots a_n t_n$ — выживаемость спермиев за последовательные интервалы времени.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух или более параллельных определений. Допускаемые расхождения между двумя параллельными определениями не должны превышать ±10%. Если из трех или четырех определений одно имеет расхождение более чем на ±10%, то среднее арифметическое вычисляют соответственно по двум или трем определениям. Если из трех или четырех определений два имеют расхождение более чем на ±10%, то испытание повторяют.

При проведении пяти определений среднее арифметическое вычисляют по трем определениям, при шести или семи определениях — по четырем, при восьми и девяти определениях — по пяти определениям, имеющим расхождение не более ±10%.

3.3.2. Интервалы времени (t_1, t_2, t_3...) в часах вычисляют по формуле

$$t_{1,2,3...}=\frac{T_{n+1}-T_{n-1}}{2},$$

где T — время, прошедшее от начала испытания до дня следующего испытания, ч;

n — порядковый номер дня испытания.

При определении выживаемости спермиев в день испытания, когда нельзя установить минимальную подвижность спермиев, интервал времени (t_n) в часах вычисляют по формуле

$$t_n=\frac{T_{нс}-T_{n-1}}{2},$$

где $T_{нс}$ — время выживаемости спермиев, ч, вычисляемое по п. 3.3.3;

T_{n-1} — время, прошедшее от начала испытания до предпоследнего дня испытания, когда была установлена минимальная подвижность спермиев в баллах, ч.

3.3.3. Время выживаемости спермиев ($T_{нс}$) в часах вычисляют по формуле

$$T_{нс}=\frac{T_n-T_{n-1}}{2}+T_{n-1},$$

где T_n — время, прошедшее от начала испытания до последнего дня испытания, ч.

Результаты испытаний по определению подвижности спермиев при вычислении абсолютной выживаемости и выживаемости спермиев в часах записывают в журнале испытаний. Форма журнала для записи результатов испытаний, а также примеры вычислений абсолютной выживаемости спермиев, интервала времени и выживаемости спермиев в часах приведены в приложениях 1 и 2.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСМОТИЧЕСКОЙ (ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ) РЕЗИСТЕНТНОСТИ СПЕРМИЕВ

Сущность метода заключается в определении устойчивости спермиев к действию гипотонического раствора хлористого натрия.

4.1. Оборудование и реактивы

4.1.1. Для проведения испытания применяют:

микроскоп биологический марки МБИ или МБР по ГОСТ 8284—67;

термостат ТМ-1 для микроскопа;

флаконы вместимостью 10—15 мл или пробирки;

микропипетки стеклянные по ГОСТ 12487—67;

колбы стеклянные вместимостью 100—500 мл по ГОСТ 12487—67;

стекла предметные по ГОСТ 9284—59;

стекла покровные по ГОСТ 6672—59;

натрий хлористый по ГОСТ 4233—66, 0,1—0,6%-ный раствор; воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72.

4.2. Подготовка к испытанию

4.2.1. При определении осмотической резистентности неразбавленной спермы должны строго соблюдаться правила, предупреждающие холодовый шок спермиев. Растворы и лабораторная посуда, применяемые для проведения испытания, должны быть стерильными и подогретыми до температуры 30—35°С.

4.2.2. Перед испытанием готовят пробирки с концентрацией раствора хлористого натрия от 0,6 до 0,1%. Для этого вначале готовят на дистиллированной воде 1%-ный раствор хлористого натрия, который разливают в девять пробирок в объеме от 0,5 до 3,0 мл в соответствии с таблицей и добавляют дистиллированную воду до объема 5 мл.

Номера пробирок	Количество 1%-ного раствора хлористого натрия, мл	Количество дистиллированной воды, мл	Концентрация раствора хлористого натрия, %	Номера пробирок	Количество 1%-ного раствора хлористого натрия, мл	Количество дистиллированной воды, мл	Концентрация раствора хлористого натрия, %
1	3,00	2,00	0,60	6	1,25	3,75	0,25
2	2,50	2,50	0,50	7	1,00	4,00	0,20
3	2,00	3,00	0,40	8	0,75	4,25	0,15
4	1,75	3,25	0,35	9	0,50	4,50	0,10
5	1,50	3,50	0,30				

При исследовании большого количества проб спермы раствор хлористого натрия в концентрациях от 0,6 до 0,1% готовят в девяти колбах, затем из каждой колбы переносят мерной стеклянной пипеткой по 5 мл раствора в заранее приготовленные флаконы или пробирки.

4.2.3. Приготавливают по две пробирки с раствором хлористого натрия каждой из указанных в таблице концентраций. Пробирки закрывают резиновыми пробками, обернутыми пергаментной бумагой, и ставят в термостат при температуре 30—35°С на 10—15 мин.

4.3. Проведение испытания

4.3.1. В каждую пробирку с раствором хлористого натрия теплой микропипеткой вносят по 0,025 или 0,05 мл испытуемой спермы. Получают разбавление от 1:100 до 1:200.

Пробирки с разбавленной спермой выдерживают 3 ч при температуре 18—22°С.

Подвижность спермиев в раздавленной капле определяют по п. 2.3 без добавления раствора лимоннокислого натрия.

4.4. Обработка результатов

4.4.1. Осмотическую резистентность спермы (R_0) выражают

значением концентрации раствора хлористого натрия, при которой подвижность спермиев составляет не менее 0,5 балла. Чем ниже концентрация раствора хлористого натрия, в котором спермии остаются живыми, тем выше осмотическая резистентность спермы.

Пример. В пробирке № 8 (0,15%-ный раствор хлористого натрия) определена единичная подвижность спермиев, а в пробирке № 7 (0,2%-ный раствор хлористого натрия) подвижность спермиев 0,5 балла. Следовательно, значение осмотической резистентности спермы равно 0,2. Или, если в пробирке № 8 мертвые спермии, в пробирках № 7 и 6 единичная подвижность спермиев, а в пробирке № 5 (0,3%-ный раствор хлористого натрия) подвижность — 0,5 балла. Следовательно, осмотическая резистентность спермы равна 0,3.

4.4.2. Коэффициент резистентности ($R_к$) вычисляют по формуле

$$R_к = \frac{0.1}{R_o},$$

где 0,1 — постоянный коэффициент;

R_o — осмотическая резистентность (концентрация раствора хлористого натрия, %).

5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ СПЕРМЫ

Сущность метода заключается в определении скорости обесцвечивания метиленовой сини, добавленной к сперме.

Скорость обесцвечивания метиленовой сини зависит от активности дегидрогеназ-ферментов дыхания спермиев.

Дегидрогеназную активность спермы определяют в капиллярах или в пробирках.

5.1. Метод определения дегидрогеназной активности спермы в капиллярах

5.1.1. *Оборудование и реактивы*

Для проведения испытания применяют:

термостат ТМ-1 для микроскопа;

термометр по ГОСТ 215—73;

термостат или ультратермостат, или баню водяную;

секундомер по ГОСТ 5072—72;

стекла предметные по ГОСТ 9284—59;

пипетки глазные и пастеровские;

трубочки стеклянные длиной 5—6 см с внутренним диаметром 0,8—1,0 мм или катетеры от шприцов для искусственного осеменения коров;

натрий хлористый по ГОСТ 4233—66;

синь метиленовую 0,01%-ный раствор;

воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72.

5.1.2. *Подготовка к испытанию*

5.1.2.1. Концентрацию спермиев в сперме определяют по ГОСТ 20909.5—75.

5.1.2.2. Подвижность спермиев определяют по п. 2.3.

Раствор метиленовой сини готовят, растворяя 0,01 г метиленовой сини и 0,9 г хлористого натрия в 100 мл дистиллированной воды.

5.1.3. *Проведение испытания*

На чистое предметное стекло, подогретое до 30—37°С, наносят 0,05 мл (каплю) спермы и добавляют теплой пипеткой такое же количество (каплю) 0,01%-ного раствора метиленовой сини, подогретой до 30°С. Смесь спермы с краской тщательно смешивают и набирают ее в теплую (30—37°С) стеклянную трубку, рассчитывая, чтобы высота столбика смеси составляла 2—3 см. Столбик смеси, не содержащий пузырьков воздуха, располагают в центре трубки.

Трубочку, заполненную смесью спермы с метиленовой синью, помещают в термостат при температуре 37±0,5°С на лист белой бумаги в горизонтальном положении. Записывают время начала испытания и окончания обесцвечивания метиленовой сини. При этом учитывают, что концы столбика (1—2 мм) обычно не обесцвечиваются.

5.1.4. *Обработка результатов*

5.1.4.1. Дегидрогеназную активность спермы выражают в условных единицах.

За единицу активности принимают такую активность, когда 1 млрд. спермиев обесцвечивает за 1 мин 0,05 мл 0,01%-ного раствора метиленовой сини (0,000005 г порошка метиленовой сини).

5.1.4.2. Дегидрогеназную активность спермы ($Д_а$) в условных единицах вычисляют по формуле

$$Д_а = \frac{П_с \cdot t \cdot С}{10},$$

где $П_с$ — подвижность спермиев, баллы;

t — время обесцвечивания метиленовой сини в опыте, мин;

$С$ — концентрация спермы, млрд/мл;

10 — постоянный коэффициент.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений.

Допускаемые расхождения между результатами двух параллельных определений не должны превышать ±10%.

5.2. Метод определения дегидрогеназной активности спермы в пробирках

5.2.1. *Оборудование и реактивы*

Для проведения испытания применяют:

термостат ТМ-1 для микроскопа;

термометр по ГОСТ 215—73;

термостат или ультратермостат, или баню водяную;

секундомер по ГОСТ 5072—72;
стекла предметные по ГОСТ 9284—59;
пипетки стеклянные вместимостью 1 мл по ГОСТ 12487—67;
колбы стеклянные по ГОСТ 12487—67;
пробирки стеклянные вместимостью 5 мл и диаметром 1 см;
синь метиленовую, 0,05%-ный раствор;
натрий лимоннокислый по ГОСТ 5.1314—72;
масло вазелиновое по ГОСТ 3164—52, х.ч.;
глюкозу по ГОСТ 4233—66;
воду дистиллированную по ГОСТ 6709—72.

5.2.2. *Подготовка к испытанию*

5.2.2.1. Приготовляют глюкозо-цитратный раствор на прокипяченной дистиллированной воде, для чего растворяют в колбе вместимостью 100 мл 3 г глюкозы и 1,4 г лимоннокислого натрия.

Раствор доводят до метки водой.

5.2.2.2. Раствор метиленовой сини готовят на прокипяченной дистиллированной воде, растворяя в мерной колбе вместимостью 100 мл 3 г глюкозы, 1,4 г цитрата натрия и 0,05 г метиленовой сини. Объем раствора доводят до метки.

5.2.2.3. Концентрацию спермиев определяют по ГОСТ 20909.5—75.

5.2.3. *Проведение испытания*

В чистую, подогретую до 30—37°С стеклянную пробирку вносят 0,8 мл теплого (37—45°С) глюкозо-цитратного раствора, добавляют 0,1 мл 0,05%-ного раствора метиленовой сини и 0,2 мл спермы. Содержимое тщательно перемешивают и наслаивают очищенное вазелиновое масло в таком количестве, чтобы получился столбик масла высотой 0,5—1,0 см.

Пробирки со смесью ставят в термостат или в водяную баню при температуре 45°С и учитывают время обесцвечивания метиленовой сини.

Допускается одновременно определять показатель выживаемости спермиев при температуре 45°С. Для этого через каждые 10—15 мин из пробирок берут пробу стеклянной палочкой и оценивают подвижность спермиев по п. 2.3.

5.2.4. *Обработка результатов*

Дегидрогеназную активность спермы и коэффициент дегидрогеназной активности вычисляют по пп. 5.1.4 и 5.1.5.

6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ СПЕРМИЕВ К ХОЛОДОВОМУ ШОКУ

Сущность метода заключается в определении выживаемости спермиев после быстрого их охлаждения до температуры 1—3°С.

6.1. Оборудование и реактивы

6.1.1. Для проведения испытания применяют:

микроскоп биологический марки МБИ или МБР по ГОСТ 8284—67;

термостат ТМ-1 для микроскопа;

стекла предметные по ГОСТ 9284—59;

стекла покровные размером 18×18 или 24×24 мм по ГОСТ 6672—59;

палочки стеклянные или пипетки пастеровские;

флаконы вместимостью 2 мл;

глюкозу по ГОСТ 6038—74, 6%-ный раствор.

6.2. Подготовка к испытанию

6.2.1. Перед началом работы готовят на прокипяченной дистиллированной воде 6%-ный раствор глюкозы, растворяя 6 г глюкозы в мерной колбе вместимостью 100 мл. Объем раствора доводят водой до метки. Приготовленный раствор разливают по 1—2 мл в пробирки или флаконы из расчета на каждую пробу спермы не менее трех пробирок.

Готовят ванну со льдом с температурой 2±1°С, в которую не менее чем за 5 мин до начала исследования ставят для охлаждения по две из трех пробирок. Третью пробу с 6%-ным раствором глюкозы ставят в термостат при температуре 37—40°С.

Подвижность спермиев определяют по п. 2.3.

6.3. Проведение испытания

6.3.1. Одну-две капли неразбавленной спермы, выдержанной при комнатной температуре не менее 10 и не более 30 мин, вносят стеклянной пипеткой в пробирки или флаконы с 6%-ным раствором глюкозы, охлажденной до 2±1°С, и в пробирку с раствором, подогретым до 37—40°С. Выдерживают 5 мин. Подвижность спермиев определяют под микроскопом по п. 2.3.

6.4. Обработка результатов

6.4.1. Резистентность спермиев к холодовому шоку (R_x) вычисляют по формуле

$$R_x = \frac{a_1}{a_2},$$

где a_1 — подвижность спермиев через 5 мин после внесения спермы в 6%-ный раствор глюкозы при температуре 2±1°С, баллы;

a_2 — подвижность спермиев через 5 мин после внесения спермы в 6%-ный раствор глюкозы при температуре 37—40°С, баллы.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений. Допускаемые расхождения между результатами параллельных определений не должны превышать ±10%.

Пример. Подвижность спермиев в 6%-ном растворе глюкозы при температуре 37—40°С — 8,0 баллов, а в растворе с температурой 2±1°С — 1,5 балла.

Следовательно, резистентность к холодовому шоку

$$R_x = \frac{1,5}{8,0} = 0,18.$$

Форма журнала для записи результатов испытаний

Материал испытания	Повторности	Дни проведения испытаний												Абсолютная выживаемость спермиев	Выживаемость спермиев, ч
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
		Время, прошедшее от начала испытания до дня следующего испытания, T, ч													
		0	24	48	—	96	120	—	168	192	216	240	264		
		Последовательные интервалы времени, t, ч													
		12	24	26	—	36	36	—	36	24	24	18	—		
		a / at	a / at	a / at	a / at	a / at	a / at	a / at	a / at	a / at	a / at	a / at	a / at		
Сперма быка	1	9,0 / 108	9,0 / 216	8,0 / 288	— / —	7,0 / 252	6,0 / 216	— / —	5,0 / 180	3,0 / 72	2,0 / 48	1,0 / 18	- / —	1398	252
	2	9,0 / 108	9,0 / 216	7,0 / 252	— / —	6,0 / 216	6,0 / 216	— / —	6,0 / 216	5,0 / 216	2,0 / 48	1,0 / 18	— / —	1410	252
	3	9,0 / 108	9,0 / 216	8,0 / 288	— / —	8,0 / 288	6,0 / 216	— / —	5,0 / 180	4,0 / 96	2,0 / 48	1,0 / 18	— / —	1458	252
											Среднее			1422	252

ПРИМЕР ВЫЧИСЛЕНИЙ ИНТЕРВАЛА ВРЕМЕНИ, ВЫЖИВАЕМОСТИ СПЕРМИЕВ В ЧАСАХ И АБСОЛЮТНОЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ СПЕРМИЕВ

(данные для расчетов взяты из журнала для записи результатов испытаний, приведенном в приложении 1)

1. Интервал времени на четвертый день испытания

$$t_4=\frac{T_5-T_3}{2}=\frac{120-48}{2}=36 \text{ ч};$$

выживаемость спермиев за этот интервал времени

$$a_z t_4=7\cdot 36=252.$$

2. Выживаемость спермиев в часах

$$T_{\text{вс}}=\frac{T_n-T_{n-1}}{2}+T_{n-1}=\frac{264-240}{2}+240=252 \text{ ч}.$$

3. Интервал времени на девятый день испытания, когда установлена минимальная подвижность спермиев в баллах

$$t_9=\frac{T_{\text{вс}}-T_{n-1}}{2}=\frac{252-216}{2}=18 \text{ ч}.$$

4. Абсолютная выживаемость спермиев в трех повторностях составляет

$$S_1=\Sigma_{at}=108+216+288+252+216+180+72+48+18=1398;$$

$$S_2=\Sigma_{at}=108+216+216+216+216+120+48+18=1410;$$

$$S_3=\Sigma_{at}=108+216+288+288+288+216+180+56+48+18=1458.$$

Расхождение между минимальным (1398) и максимальным (1458) показателями абсолютной вживаемости спермиев составляет 60 или 4,3%.

Следовательно, абсолютная выживаемость спермиев

$$S_{\text{ср}}=\frac{S_1+S_2+S_3}{3}=\frac{1398+1410+1458}{3}=1422.$$

Контр. экз.

Изменение № 1 ГОСТ 20909.4—75 Сперма быков неразбавленная. Методы биологических исследований

Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 08.06.81 № 2857 срок введения установлен

с 01.07.81

Пункты 2.1.1, 4.1.1. Заменить ссылки: ГОСТ 8284—67 на ГОСТ 8284—78, ГОСТ 6672—59 на ГОСТ 6672—75, ГОСТ 9284—59 на ГОСТ 9284—75, ГОСТ 4233—66 на ГОСТ 4233—77.

Пункты 2.1.1, 5.2.1. Заменить ссылку: ГОСТ 5.1314—72 на ГОСТ 22280—76.

Пункт 4.1.1. Заменить слова: «микропипетки стеклянные по ГОСТ 12487—67» на «микропипетки стеклянные».

Пункты 5.1.1, 5.2.1. Заменить ссылки: ГОСТ 5072—72 на ГОСТ 5072—79, ГОСТ 9284—50 на ГОСТ 9284—75, ГОСТ 4233—66 на ГОСТ 4233—77.

Раздел 5 дополнить новым пунктом — 5.1.4.3:

«5.1.4.3. Коэффициент дегидрогеназной активности ($КД_а$) вычисляют по формуле

(Продолжение см. стр. 236)

$$КД_а = \frac{1}{Д_а},$$

где $Д_а$ — дегидрогеназная активность».

Пункт 5.2.1. Заменить слова и ссылки: «пипетки стеклянные вместимостью 1 мл по ГОСТ 12487—67» на «пипетки стеклянные вместимостью 1 мл по ГОСТ 20292—74», ГОСТ 12487—67 на ГОСТ 1770—74, ГОСТ 3164—52 на ГОСТ 3164—78.

Пункт 5.2.4. Исключить слова: «и 5.1.5».

Пункт 6.1.1. Заменить ссылки: ГОСТ 8284—67 на ГОСТ 8284—78, ГОСТ 9284—59 на ГОСТ 9284—75, ГОСТ 6672—59 на ГОСТ 6672—75, ГОСТ 6038—74 на ГОСТ 6038—79.

Приложение 1. Графа «Последовательные интервалы времени, t, ч». Заменить значение: 26 на 36;

графа a. Для 12-го дня проведения испытаний заменить знак: — на ЕП (3 раза).

(ИУС № 8 1981 г.)

gost.e-ecolog.ru