ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 53910— 2010 (ИСО 10253:2006)

ВОДА

Методы определения токсичности по замедлению роста морских одноклеточных водорослей Phaeodactylum tricornutum Bohlin и Sceletonema costatum (Greville) Cleve

ISO 10253:2006
Water quality — Marine algal growth inhibition test with *Sceletonema costatum and Phaeodactylum tricornutum*

(MOD)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2011

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели и принципы стандартизации в Российской Федерации установлены Федеральным законом от 27 декабря 2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании», а правила применения национальных стандартов Российской Федерации — ГОСТ Р 1.0—2004 «Стандартизация в Российской Федерации. Основные положения»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН ООО «Протектор» и Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии» на основе собственного аутентичного перевода на русский язык, указанного в пункте 4 международного стандарта, находящегося в Федеральном информационном фонде

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 343 «Качество воды»

3 УТВЕРЖДЕН и ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 9 ноября 2010 г. № 360-ст

4 Настоящий стандарт является модифицированным по отношению к международному стандарту ИСО 10253:2006 «Качество воды. Испытание на замедление роста морских водорослей *Sceletonema costatum* и *Phaeodactylum tricornutum*» (ISO 10253:2006 «Water quality — Marine algal growth inhibition test with *Sceletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*», MOD) путем:

- изменения структуры. Сравнение структуры настоящего стандарта со структурой указанного международного стандарта приведено в дополнительном приложении ДЕ;
- введения дополнительных положений, фраз и слов в текст настоящего стандарта для учета потребностей национальной экономики Российской Федерации и особенностей российской национальной стандартизации, выделенных в тексте настоящего стандарта курсивом, за исключением наименований тест-организмов;
- исключения отдельных пунктов указанного международного стандарта. Полный текст исключенных пунктов с обоснованиями исключения приведен в дополнительном приложении ДЖ.

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного стандарта для приведения в соответствие с ГОСТ Р 1.5—2004 (подраздел 3.5).

Сведения о соответствии ссылочных национальных и межгосударственных стандартов международным стандартам, использованным в качестве ссылочных в примененном международном стандарте, приведены в дополнительном приложении ДИ

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок — в ежемесячно издаваемых информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартинформ, 2011

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 2
3 Термины и определения . . . 3
4 Отбор проб . . . 3
5 *Метод А* . . . 4
6 *Метод Б* . . . 14
Приложение А (обязательное) Приготовление питательных сред . . . 17
Приложение ДА (обязательное) Методы культивирования водорослей . . . 19
Приложение ДБ (обязательное) Примеры определения эффективной кратности разбавления (концентрации) . . . 21
Приложение ДВ (обязательное) Методы подсчета численности клеток водорослей . . . 27
Приложение ДГ (справочное) Приготовление *анализируемых* проб сточных вод *для метода Б* . . . 30
Приложение ДД (справочное) Информация о результатах проведенных межлабораторных испытаний *для метода Б* . . . 31
Приложение ДЕ (справочное) Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного стандарта . . . 32
Приложение ДЖ (справочное) Требования международного стандарта, не вошедшие в настоящий стандарт . . . 34
Приложение ДИ (справочное) Сведения о соответствии ссылочных национальных и межгосударственных стандартов международным стандартам, использованным в качестве ссылочных в примененном международном стандарте . . . 35
Библиография . . . 38

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ВОДА

Методы определения токсичности по замедлению роста морских одноклеточных водорослей Phaeodactylum tricornutum Bohlin и Sceletonema costatum (Greville) Cleve

Water. Methods of toxicity determination by growth inhibition of marine unicellular algae Phaeodactylum tricornutum Bohlin and Sceletonema costatum (Greville) Cleve

Дата введения — 2012 — 01 — 01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на природные морские воды и воды эстуариев, а также сточные воды *с минерализацией от 6 до 33 г/дм*^{3} и устанавливает определение их токсичности по замедлению роста морских одноклеточных водорослей *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin или *Sceletonema costatum* (Greville) Cleve после лабораторного *биологического тестирования (далее* — тестирование) *следующими* методами:

– при переменном воздействии света и темноты и постоянной температуре *(метод А)*;

– при постоянном воздействии света и температуры *(метод Б)*.

Примечание — *Метод Б* применим для оценки токсичности сточных вод, не содержащих тяжелых металлов, так как комплексообразование с тяжелыми металлами из-за относительно высокой концентрации трилона Б в питательной среде может сделать невозможным тестирование сточных вод, содержащих тяжелые металлы.

Методы применяют также для определения токсичности растворимых веществ, водных вытяжек *морских донных отложений, отработанных буровых растворов и твердых промышленных отходов*.

Методы позволяют определять *токсичность исследуемых объектов и следующие их* токсикологические показатели:

– эффективную кратность разбавления ($ЭКР_{50}$) пробы, вызывающую замедление роста [снижение плотности (численности)] клеток водорослей на 50 %, и безвредную кратность разбавления пробы ($ЭКР_{10}$), вызывающую замедление роста [снижение плотности (численности)] клеток водорослей не более 10 % за 72 ч (96 ч) тестирования (метод А); за 72 ч тестирования (метод Б);

– эффективную концентрацию ($ЭК_{50}$) растворов веществ, вызывающую замедление роста [снижение плотности (*численности*)] клеток водорослей на 50 %, и безвредную концентрацию ($ЭК_{10}$) растворов веществ, вызывающую замедление роста [снижение плотности (*численности*)] клеток водорослей не более 10 % за 72 ч (*методы А и Б*).

Примечания

1 Продолжительность тестирования 96 ч, указанную для метода А, используют при определении токсичности и токсикологических показателей анализируемых проб отработанных буровых растворов, твердых промышленных отходов и донных отложений.

2 Полученные в лабораторных условиях значения *ЭКР*, ЭК являются токсикологическими показателями и говорят о потенциальной опасности исследуемых объектов, но не могут быть использованы непосредственно для прогнозирования их воздействия на природную окружающую среду. *Однако* определенные свойства *водорослей, установленные на основе тестирования* (например, замедление начала роста клеток; хороший начальный рост, который не сохраняется) могут помочь определить *степень* воздействия конкретного вещества.

Издание официальное

3 *Эффективную кратность разбавления ($ЭКР_{50}$) за 72 ч тестирования обозначают как 72 ч $ЭКР_{50}$, за 96 ч тестирования — соответственно 96 ч $ЭКР_{50}$;* эффективную концентрацию ($ЭК_{50}$) *за 72 ч тестирования — как 72 ч $ЭК_{50}$.*

4 Тестирование выполняет обученный персонал.

5 Настоящий стандарт не предусматривает ознакомление персонала со всеми проблемами безопасности, связанными с его использованием. Пользователь стандарта несет ответственность за обеспечение соответствующих требований стандарта при проведении тестирования.

В помещении лаборатории, где проводят тестирование:

- окружающая среда не должна содержать пара или пыли, токсичной для водорослей;

- температура окружающего воздуха должна быть (20 ± 2) °С (только для помещения с регулируемой температурой *по методу Б*);

- относительная влажность воздуха должна быть не более 80 %;

- атмосферное давление должно быть 84 — 106 кПа (630 — 800 мм рт. ст.);

- должно быть обеспечено постоянное равномерное белое освещение в диапазоне от 6000 до 10000 лк (только для помещения с регулируемой температурой *по методу Б*).

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025—2006 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ Р 51592—2000 Вода. Общие требования к отбору проб

ГОСТ Р 53228—2008 Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

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

ГОСТ 245—76 Реактивы. Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный. Технические условия

ГОСТ 612—75 Реактивы. Марганец (II) хлористый 4-водный. Технические условия

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4788—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4147—74 Реактивы. Железо (III) хлорид 6-водный. Технические условия

ГОСТ 4165—78 Реактивы. Медь (II) сернокислая 5-водная. Технические условия

ГОСТ 4166—76 Реактивы. Натрий сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4168—79 Реактивы. Натрий азотнокислый. Технические условия

ГОСТ 4174—77 Реактивы. Цинк сернокислый 7-водный. Технические условия

ГОСТ 4201—79 Реактивы. Натрий углекислый кислый. Технические условия

ГОСТ 4209—77 Реактивы. Магний хлористый 6-водный. Технические условия

ГОСТ 4217—77 Реактивы. Калий азотнокислый. Технические условия

ГОСТ 4220—75 Реактивы. Калий двухромовокислый. Технические условия

ГОСТ 4233—77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4234—77 Реактивы. Калий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4461—77 Реактивы. Кислота азотная. Технические условия

ГОСТ 4525—77 Реактивы. Кобальт хлористый 6-водный. Технические условия

ГОСТ 4529—78 Реактивы. Цинк хлористый. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9147—80 Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия

ГОСТ 9656—75 Реактивы. Кислота борная. Технические условия

ГОСТ 10652—73 Реактивы. Соль динатриевая этилендиамин-N,N,N',N'- тетрауксусной кислоты 2-водная (трилон Б). Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 19126—2007 Инструменты медицинские металлические. Общие технические условия

ГОСТ 25336—82 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 27065—86 Качество вод. Термины и определения

ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году. Если ссылочный стандарт заменен (изменен), то при пользовании настоящим стандартом следует руководствоваться заменяющим (измененным) стандартом. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены *термины по ГОСТ 27065, а также* следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **плотность (численность) клеток** (cell density): Количество клеток в единице объема *питательной* среды *или в анализируемой пробе.*

Примечание — Плотность (численность) клеток выражается количеством клеток на кубический сантиметр (клеток/см^3).

3.2 **скорость роста** (specific growth rate): Пропорциональное увеличение плотности *(численности)* клеток в единицу времени.

Примечания

1 Для термина «скорость роста» в *[1]* приведена следующая формула:

$$\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx(1/day)}{dt}, \qquad (1)$$

где x — плотность клеток, клеток/см^3 ;

t — время, выраженное в сутках.

2 *Удельная скорость роста выражается в обратных сутках (сут$^{-1}$).*

3.3 **питательная среда** (growth medium): Смесь морской воды и питательных веществ, которая используется для культивирования водорослей и *приготовления* контрольной *пробы.*

3.4 ***анализируемая*** **проба** (sample analyzed): Смесь морской воды, питательной среды и тестируемого вещества, в которой культивируются водоросли.

Примечание — В [1] термин приведен как «тестирование среды» («test medium»).

3.5 **контрольная проба** (control): Смесь морской воды, питательной среды и клеток водорослей без анализируемой *пробы.*

3.6 **эффективная концентрация;** ЭК [effective concentration ($EC(r)_x$)]: Концентрация вещества в анализируемой пробе, которая приводит к x %-ному снижению *плотности (численности) клеток водорослей (замедлению* скорости роста *клеток водорослей)* относительно контрольной пробы.

3.7 ***эффективная кратность разбавления;*** ЭКР (effective multiplicity of dilution): *Степень разбавления пробы (например, сточной воды) питательной средой при подготовке анализируемой пробы, которое приводит к x %-ному снижению плотности (численности) клеток водорослей (замедлению скорости роста клеток водорослей) относительно контрольной пробы.*

4 Отбор проб

4.1 Отбор проб воды и донных отложений проводят в соответствии с требованиями ГОСТ Р 51592, ГОСТ 17.1.5.05, [2], [3] и [4]. При этом объем пробы воды должен быть не менее 500 см^3; масса пробы донных отложений — не менее 2 кг.

Примечание — Отбор проб сточных вод проводят до этапа хлорирования.

Рекомендуемый срок хранения проб природной морской воды, воды эстуариев, сточных вод и донных отложений при комнатной температуре — не более 12 ч после их отбора до проведения тестирования. Допускается хранение проб до проведения их тестирования:

- не более 48 ч при температуре от 0 °С до 4 °С;

- не более 2 мес при температуре минус 18 °С.

Примечание — Если отобранную пробу воды перед тестированием требуется отстаивать или фильтровать, то отстаивание и фильтрование должны предшествовать ее замораживанию.

4.2 Отбор проб отработанных буровых растворов проводят в соответствии с требованиями технической документации предприятия, на котором образуются отработанные буровые растворы, массой не менее 5,0 кг, при этом под крышкой емкости, в которую отобрана проба, должен оставаться слой воздуха высотой 2 см.

Отобранные пробы отработанных буровых растворов хранят в емкостях-холодильниках при температуре от 0 °С до 4 °С не более 3 мес.

После вскрытия емкостей-холодильников для подготовки проб отработанных буровых растворов к тестированию срок хранения не должен превышать 14 сут.

4.3 Отбор проб твердых промышленных отходов проводят в соответствии с требованиями технической документации предприятия, на котором образуется отход, массой не менее 2 кг.

Срок хранения отобранных проб твердых промышленных отходов в емкостях с притертой или плотно закрытой крышкой при температуре от 0 °С до 4 °С — не более 7 сут.

4.4 Отбор проб веществ, условия и сроки их хранения должны соответствовать требованиям стандартов и другой документации на конкретную продукцию (группу однородной продукции).

4.5 Для отбора проб природной морской воды, воды эстуариев, отработанных буровых растворов, донных отложений используют емкости из полиэтилена, полиэтилентерефлата или политетрафторэтилена, а при наличии в воде нефтепродуктов, поверхностно-активных веществ (ПАВ) и пестицидов — емкости из темного стекла.

Для отбора проб сточных вод, твердых промышленных отходов используют емкости из темного стекла или нержавеющей стали, при этом не допускается использовать емкости с хромовым покрытием.

Для отбора проб веществ используют емкости из полиэтилена, полиэтилентерефлата, политетрафторэтилена или темного стекла.

4.6 Сроки и условия хранения отобранной пробы указывают в протоколе испытаний.

4.7 Консервацию отобранных проб не проводят.

5 Метод А

5.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в регистрации снижения плотности (численности) клеток морских одноклеточных водорослей Phaeodactylum tricornutum Bohlin *в анализируемой пробе исследуемого объекта относительно контрольной пробы, определении ее токсичности и токсикологических показателей при тестировании в течение 72 ч (96 ч) при переменном воздействии света и темноты и постоянной температуры.*

Продолжительность тестирования 72 ч указана для определения токсичности и токсикологических показателей анализируемых проб природной морской воды, воды эстуариев и сточной воды, а также анализируемых проб веществ.

Примечание — Допускается проводить определение эффективной кратности разбавления проб сточной воды (концентрации вещества), вызывающей снижение плотности (численности) клеток водорослей на 50 %, при увеличенной продолжительности тестирования до 96 ч [96 ч $ЭКР_{50}$ (96 ч $ЭК_{50}$)].

Продолжительность тестирования 96 ч указана для определения токсичности и токсикологических показателей анализируемых проб отработанных буровых растворов, твердых промышленных отходов и донных отложений.

5.2 *Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы,* материалы

Климатостат, обеспечивающий поддержание температуры (20 ± 2) °С и освещенность 3000 — 6000 лк.

Весы лабораторные по ГОСТ Р 53228, высокого класса точности с ценой деления (дискретностью отсчета) не более 0,01 г, пределом взвешивания не более 210 г.

pH-метр *любого типа, обеспечивающий измерения pH в диапазоне от 3 до 10 единиц pH с допускаемой погрешностью ± 0,05 единиц pH.*

Термометр лабораторный с диапазоном измерения от 0 °С до 50 °С, с ценой деления шкалы 0,5 °С.

Оксиметр любого типа, с допускаемой погрешностью измерения не более 0,5 мг O_2/дм^3.

Прибор для измерения минерализации (солености) любого типа (например, карманный рефрактометр-солемер с автотермокомпенсацией) с допускаемой погрешностью измерения общей минерализации (солености) ± 3,0 г/дм^3 [± 3 · 10^{-3} (± 3 ‰)].

Пипетки автоматические (дозаторы) любого типа вместимостью 0,1; 0,2 см^3 с допускаемой погрешностью аттестованного значения ± 1,0 %.

Пипетки по ГОСТ 29227, вместимостью 1, 2, 5, 10 см^3, с ценой деления 0,1 см^3.

Микропипетки по ГОСТ 29227, вместимостью 0,1; 0,2 см^3, с ценой деления 0,01 см^3.

Колбы мерные по ГОСТ 1770, 2–25–2, 2–50–2, 2–100–2.

Колбы *стеклянные* (конические) *лабораторные по ГОСТ 25336*, вместимостью 0,25; *1 и 2 дм^3.*

Счетная камера *(камера Горяева).*

Микроскоп *биологический типа МБР или МБИ, обеспечивающий увеличение в 100 — 200 раз.*

Примечание — Допускается определять состояние роста культур водорослей, используя *фотоэлектроколориметр*, спектрофотометр, флуориметр (далее — приборы), *обеспечивающие возбуждение флуоресценции водорослей в диапазоне 400 — 500 нм; регистрацию флуоресценции в диапазоне 650 — 750 нм.*

Мешалка магнитная.

Устройство для встряхивания любого типа (например, орбитальный шейкер, качалка-мешалка).

Центрифуга лабораторная медицинская.

Сушильный электрический шкаф общелабораторного назначения.

Аквариумный микрокомпрессор любого типа, например АЭН-4.

Шпатели металлические по ГОСТ 19126.

Холодильник бытовой, обеспечивающий поддержание температуры минус (20 ± 1) °С и от 2 °С до 4 °С.

Ступки и пестики фарфоровые по ГОСТ 9147.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Фильтры обеззоленные «белая лента».

Фильтры мембранные с диаметром пор 0,45; 3,5 мкм.

Установка для фильтрования любого типа.

Пробирки стеклянные по ГОСТ 25336, вместимостью 10 см^3.

Цилиндры по ГОСТ 1770, вместимостью 25, 50, 100, 1000 см^3, второго класса точности.

Стаканы стеклянные лабораторные по ГОСТ 25336, вместимостью 50, 100, 500, 1000 см^3.

Вода *дистиллированная по ГОСТ 6709 или* деионизированная.

Примечание — Для получения *дистиллированной* воды *используют только аппараты из стекла или кварца.*

Природная или искусственная морская вода минерализацией 33 г/дм^3 (соленостью 33 ‰) (далее — вода для разбавления).

Примечание — Если в качестве воды для разбавления используют природную морскую воду, то ее отбирают вдали от берега с глубины 3 — 5 м и транспортируют в лабораторию в стеклянных или полиэтиленовых емкостях. При этом допускается для приготовления питательной среды и водных вытяжек использовать природную морскую воду, отобранную в условно чистом месте района исследования.

В лаборатории природную морскую воду фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, чтобы удалить взвешенные вещества и организмы, *и хранят в темном месте при комнатной температуре не более одного года.*

Питательная среда *(среда Гольдберга), приготовленная в соответствии с требованиями* приложения А.

Примечания

1 Емкости, используемые для приготовления питательной среды, должны быть изготовлены из стекла.

2 *Питательную среду используют для культивирования водорослей, приготовления контрольной пробы и анализируемых проб разбавлением.*

Тест-организмы: морские одноклеточные водоросли *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin.

Примечания

1 Методы культивирования водорослей Phaeodactylum tricornutum Bohlin *приведены в приложении ДА.*

2 Допускается хранение водорослей *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin *на агаризованной питательной среде Гольдберга при температуре от 2 °С до 4 °С не более 12 мес* без потери их жизнеспособности.

Модельный токсикант: калий двухромовокислый по ГОСТ 4220, ч. д. а.

Калий хлористый по ГОСТ 4234, х. ч.

Калий азотнокислый по ГОСТ 4217, х. ч.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233, х. ч.

Натрий сернокислый по ГОСТ 4166, х. ч.

Натрий углекислый кислый по ГОСТ 4201, х. ч.

Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный по ГОСТ 245, х. ч.

Кобальт хлористый 6-водный по ГОСТ 4525, х. ч.

Кальций хлористый, безводный, х. ч.

Магний хлористый 6-водный, по ГОСТ 4209, х. ч.

Марганец (II) хлористый 4-водный по ГОСТ 612, х. ч.

Натрий кремниевокислый 5-водный, х. ч.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, х. ч.

Натрий азотнокислый по ГОСТ 4168, х. ч.

Железо (III) хлорид 6-водный по ГОСТ 4147, х. ч.

Цинк сернокислый 7-водный по ГОСТ 4174, х. ч.

Медь (II) сернокислая 5-водная по ГОСТ 4165, х. ч.

Кислота азотная по ГОСТ 4461, х. ч.

Кислота борная по ГОСТ 9656, х. ч.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, х. ч.

Тиамин гидрохлорид.

Биотин.

Витамин B_{12} (цианокобаламин).

5.3 Подготовка к тестированию

5.3.1 Подготовка посуды

5.3.1.1 Емкости, используемые для тестирования, должны быть химически чистыми.

Для проведения тестирования используют только стеклянную посуду.

5.3.1.2 Стеклянную посуду для тестирования осторожно промывают 10 %-ным раствором азотной кислоты и выдерживают 2 — 3 ч при комнатной температуре, затем тщательно промывают водопроводной водой, обрабатывают раствором натрия углекислого кислого, промывают водопроводной водой, после чего не менее трех раз ополаскивают дистиллированной водой.

При сильном загрязнении посуды, а также новую посуду промывают водопроводной водой, заполняют 10 %-ным раствором азотной кислоты и выдерживают в течение суток, после чего обрабатывают раствором натрия углекислого кислого, затем тщательно промывают водопроводной водой и не менее трех-четырех раз ополаскивают дистиллированной водой.

5.3.1.3 Емкости и посуду для тестирования сушат на воздухе при комнатной температуре, затем стеклянную посуду, за исключением мерной, помещают в сушильный шкаф и выдерживают в течение одного часа при температуре 150 °С.

Чистую посуду (емкости) закрывают стеклянными притертыми пробками или крышками и хранят в шкафах или на полках.

5.3.2 Приготовление искусственной морской воды

Искусственную морскую воду готовят *на дистиллированной воде* из реактивов, вносимых в количествах, приведенных в таблице 1.

Таблица 1

Наименование реактива	Масса реактива, вносимая *на 1 дм³ дистиллированной* воды, г
Натрий хлористый *по ГОСТ 4233 (NaCl)*	22,00
Магний хлористый 6-водный *по ГОСТ 4209 ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)*	9,70
Натрий сернокислый *по ГОСТ 4166 (Na_2SO_4), безводный*	3,70
Кальций хлористый *($CaCl_2$), безводный*	1,00
Калий хлористый *по ГОСТ 4234 (KCl)*	0,65
Натрий углекислый кислый *по ГОСТ 4201 ($NaHCO_3$)*	0,20
Борная кислота *по ГОСТ 9656 (H_3BO_3)*	0,023

Минерализация (соленость) приготовленной из указанных реактивов искусственной морской воды составляет 33 г/дм³ (33 ‰). *При необходимости, для уменьшения минерализации* (солености) *искусственную морскую воду разбавляют дистиллированной водой.*

Допускается готовить искусственную морскую воду, используя готовую морскую соль (например, марки «Wiegandt»).

Приготовленную искусственную морскую воду аэрируют в течение 1 — 2 сут при помощи микрокомпрессора, затем дают отстояться в течение 10 — 14 сут.

Искусственная морская вода должна соответствовать следующим требованиям:

- значение pH в пределах 8,0 — 8,3;

- содержание растворенного кислорода не менее 7 мг O_2/дм³;

- температура (20 ± 2) °С.

Искусственную морскую воду хранят в емкости из темного стекла с притертой крышкой (используют емкости до 10 дм³) при комнатной температуре не более года.

5.3.3 Подготовка проб

Перед тестированием предварительно охлажденные или замороженные пробы доводят до комнатной температуры (от 19 °С до 24 °С).

5.3.3.1 Подготовка исходных проб природной морской воды *и воды эстуариев*

Отобранные пробы природной морской воды и воды эстуариев фильтруют через мембранные фильтры с порами диаметром 3,5 мкм или через обеззоленные фильтры «белая лента», после чего измеряют минерализацию (соленость), pH *и концентрацию растворенного кислорода отфильтрованной пробы.*

Примечание — Мембранные фильтры перед применением должны быть промыты и простерилизованы кипячением в дистиллированной воде не менее 10 мин.

Не допускается для фильтрования использовать фильтр «синяя лента».

Примечание — Фильтр «синяя лента» задерживает коллоидные вещества, что занижает результаты тестирования.

Пробы природной морской воды и воды эстуариев тестируют без разбавлений (в случаях, когда пробы проявляют высокую токсичность — допускается их разбавление непосредственно перед тестированием).

5.3.3.2 Подготовка исходных проб сточной воды

Отобранные пробы сточной воды непосредственно перед тестированием фильтруют через мембранный фильтр с порами диаметром 3,5 мкм или через обеззоленный фильтр «белая лента», после чего измеряют *минерализацию (соленость),* pH *и концентрацию растворенного кислорода отфильтрованных проб.*

5.3.3.3 Подготовка исходных проб отработанных буровых растворов, твердых промышленных отходов и донных отложений

Из проб донных отложений, отработанных буровых растворов, твердых промышленных отходов готовят водные вытяжки, затем измеряют *минерализацию (соленость),* pH *и концентрацию растворенного кислорода подготовленных водных вытяжек.*

Подготовка водных вытяжек из проб отработанных буровых растворов

Перед приготовлением водной вытяжки из пробы отработанных буровых растворов отобранную пробу тщательно перемешивают в смесителе со скоростью вращения 17 $с^{-1}$ (1000 об/мин) в течение 5 мин и определяют pH отработанного бурового раствора. Пробу отработанного бурового раствора считают не пригодной для тестирования, если:

- pH пробы отработанного бурового раствора более 9,0;

- на стенках сосуда с пробой отработанного бурового раствора появились черные пятна;

- проба отработанного бурового раствора имеет неприятный запах.

После перемешивания пробу отработанного бурового раствора смешивают с морской водой (см. 5.2) в соотношении соответственно 1 : 9 по объему и снова перемешивают с применением смесителя со скоростью вращения 17 $с^{-1}$ (1000 об/мин) в течение 5 мин.

После окончания перемешивания смесь отстаивают при температуре (20 ± 5) °С в течение 1 ч, затем водную вытяжку над осадком осторожно переливают за один прием в стеклянную емкость и перемешивают в течение 5 мин, после чего используют ее для подготовки анализируемой пробы.

Если отстоявшаяся смесь не имеет четкого раздела фаз, то весь объем подготовленной пробы используют для приготовления анализируемой пробы.

Не допускаются консервация и хранение подготовленных водных вытяжек проб отработанных буровых растворов.

Подготовка водных вытяжек из проб твердых промышленных отходов

Перед приготовлением водной вытяжки из твердых промышленных отходов отобранную пробу твердых промышленных отходов разрыхляют и тщательно осматривают. В случае обнаружения частиц размером более 10 мм их измельчают с помощью металлического шпателя до размера менее 10 мм. Не допускается измельчать смесь с помощью механизированных устройств.

Измельченную пробу отходов высушивают при комнатной температуре до воздушно-сухого состояния в вытяжном шкафу или в хорошо проветриваемом помещении.

Водную вытяжку из высушенной пробы твердых промышленных отходов готовят в соотношении: твердые промышленные отходы / морская вода соответственно 1 : 10 следующим способом:

В стеклянную емкость вместимостью 1500 $см^3$ вносят 100 г сухой массы пробы твердых промышленных отходов, добавляют 1000 $см^3$ морской воды (см. 5.2) и перемешивают в течение 6 — 7 ч с использованием магнитной мешалки (или орбитального шейкера) с минимальной скоростью перемешивания, при которой проба твердых промышленных отходов поддерживается во взвешенном состоянии.

Примечание — Для приготовления 900 $см^3$ водной вытяжки обычно требуется 100 г сухой массы пробы твердых промышленных отходов.

Не допускается использовать для приготовления водной вытяжки менее 20 г сухой массы пробы твердых промышленных отходов и менее 200 $см^3$ морской воды.

После окончания перемешивания емкость с полученной смесью ставят в холодильник, где ее выдерживают при температуре от 2 °С до 4 °С в течение 12 — 14 ч, затем жидкость над осадком осторожно переливают в другую емкость, после чего используют ее для подготовки анализируемой пробы.

Примечание — Жидкие промышленные отходы тестируют без разбавления, а также при разбавлениях в 10, 100, 1000 и 10000 раз.

Допускается хранение подготовленных водных вытяжек из твердых промышленных отходов при температуре от 2 °С до 4 °С не более 48 ч.

Подготовка водных вытяжек из проб донных отложений

Перед приготовлением водной вытяжки из донных отложений отобранную пробу донных отложений высушивают при температуре (20 ± 5) °С до воздушно-сухого состояния, удаляют остатки растений, камешки и т. п., затем измельчают в ступке и просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм.

После просеивания навеску пробы донных отложений вносят в стеклянную емкость и заливают морской водой (см. 5.2) в соотношении соответственно 1 : 4 по объему, перемешивают с использованием орбитального шейкера (или качалки-мешалки) в течение 2 ч. После окончания перемешивания смесь выдерживают в течение 1 ч при температуре (20 ± 5) °С, ставят в холодильник и выдерживают при температуре от 2 °С до 4 °С в течение 12 — 14 ч, затем водную вытяжку над осадком осторожно

переливают в стеклянную емкость и фильтруют, после чего используют ее для подготовки анализируемой пробы.

Допускается хранение подготовленных водных вытяжек донных отложений при температуре от 2 °С до 4 °С не более 72 ч.

5.3.3.4 Подготовка исходных растворов веществ

Исходные растворы веществ, в зависимости от заданной концентрации, готовят в стеклянной мерной колбе путем растворения определенного количества пробы вещества в определенном объеме морской воды *(см. 5.2).*

Исходные растворы веществ готовят непосредственно перед их тестированием, при этом, если известно, что вещества стабильны в растворе, исходные растворы допускается готовить заранее, но не более чем за 2 сут до начала тестирования.

Примечания

1 Для веществ, трудно растворимых в воде, при приготовлении их исходных растворов могут быть использованы ультразвуковые или другие устройства (шейкеры) для облегчения растворимости или диспергирования веществ.

2 Допускается использовать органические растворители, обладающие малой токсичностью в отношении тест-организмов (например, ацетон), при условии, что концентрация растворителя в анализируемой пробе раствора не превышает 0,1 см^3/дм^3, при этом параллельно с основным тестированием проводят два контрольных тестирования, одно без растворителя и другое с максимальной концентрацией растворителя.

Для приготовления исходного раствора вещества заданной концентрации невозможно рекомендовать какую-либо единую методику. *Например, используют следующую процедуру: в стеклянную мерную колбу вместимостью 1000 см^3 (или 100, 50, 25 см^3) вносят 1 г вещества (или другое его количество, в зависимости от заданной концентрации раствора), затем осторожно добавляют в колбу небольшое количество морской воды (см. 5.2), перемешивают до полного растворения вещества, доводят объем до метки этой же морской водой и снова перемешивают. Приготовленный раствор выдерживают перед тестированием при комнатной температуре не менее 2 ч.*

Измеряют *минерализацию (соленость)*, pH *и концентрацию растворенного кислорода* в исходном растворе вещества.

5.3.3.5 Исходные пробы (см. 5.3.3.1 — 5.3.3.3) и исходные растворы веществ (см. 5.3.3.4) должны иметь следующие характеристики:

а) Минерализация от 6 до 33 г/дм^3 (соленость *от 6 до* 33 ‰)

Примечание — Приведен диапазон минерализации (солености) в зависимости от исследуемого объекта; минерализация (соленость) исходных проб (растворов) должна входить в указанный диапазон.

b) Значение pH 8,0 — 8,3

Если значение pH исходной пробы (раствора) выходит за указанные пределы, то в пробу (раствор) добавляют *10 %-ный* раствор соляной кислоты или *10 %-ный* раствор гидроокиси натрия, после чего *аэрируют пробу (раствор) при помощи аквариумного компрессора в течение 10 — 20 мин для стабилизации pH.*

Для исходных проб водных вытяжек из твердых промышленных отходов регулирование pH не допускается.

с) Концентрация растворенного кислорода не ниже 7 мг O_2/дм^3

Если концентрация растворенного кислорода исходной пробы (раствора) ниже указанного значения, пробу (раствор) аэрируют при помощи аквариумного компрессора.

5.3.3.6 Подготовка анализируемых проб

Анализируемые пробы природной морской воды и воды эстуариев готовят следующим способом: в три *конические* колбы *вместимостью 150 см^3 вносят по 100 см^3 отфильтрованной исходной пробы (см. 5.3.3.1) и добавляют исходные растворы питательной среды Гольдберга (см. приложение А) в следующих объемах: раствор № 1 — 0,2 см^3; раствор № 2 — 0,05 см^3; раствор № 3 — 0,1 см^3; раствор № 4 — 0,1 см^3.*

Примечание — При необходимости, если анализируемая проба природной морской воды при тестировании по 5.4. показала высокую токсичность, то проводят разбавление исходной пробы природной морской воды (см. 5.3.3.1) в два, пять, 10 и более раз искусственной морской водой (см. 5.3.2), которая соответствует солености исходной пробы.

Анализируемые пробы сточной воды готовят *в следующей последовательности:*

а) проводят разбавление исходной пробы сточной воды следующим способом: в три конические колбы вместимостью 250 см³ вносят исходную пробу сточной воды *(см. 5.3.3.2)* и питательную среду *Гольдберга (см. приложение А) в объемах:*

- 100 см³ исходной пробы сточной воды (проба без разбавления);

- 50 см³ исходной пробы сточной воды и 50 см³ питательной среды (кратность разбавления: 50 %, в два раза);

- 10 см³ исходной пробы сточной воды и 90 см³ питательной среды (кратность разбавления: 10 %, в 10 раз);

- 1 см³ исходной пробы сточной воды и 99 см³ питательной среды (кратность разбавления: 1 %, в 100 раз);

- 0,1 см³ исходной пробы сточной воды и 99,9 см³ питательной среды (кратность разбавления: 0.1 %, в 1000 раз).

b) затем в колбы с разбавленными пробами сточной воды добавляют исходные растворы питательной среды Гольдберга (см. приложение А), как указано ниже:

в колбы без разбавления исходной пробы последовательно добавляют исходные растворы питательной среды в следующих объемах: раствор № 1 — 0,2 см³; раствор № 2 — 0,05 см³; раствор № 3 — 0,1 см³; раствор № 4 — 0.1 см³;

в колбы с разбавлением исходной пробы сточной воды в два раза добавляют в той же последовательности (но в два раза меньше) исходные растворы питательной среды соответственно: 0,1; 0,025; 0,05; 0,05 см³;

в колбы с разбавлением исходной пробы в 10 раз — соответственно: 0,02; 0,005; 0,01; 0,01 см³;

в колбы с разбавлениями исходной пробы в 100 и 1000 раз исходные растворы питательной среды не добавляют.

Анализируемые пробы отработанных буровых растворов, донных отложений и твердых промышленных отходов готовят из их водных вытяжек (см. 5.3.3.3) путем разбавления водных вытяжек и добавления исходных растворов питательной среды аналогично указанным в а) и b) для анализируемой пробы сточной воды.

Анализируемую пробу вещества готовят *следующим способом: в конические колбы вместимостью 250 см³* вносят *по 100 см³* питательной среды *Гольдберга (см. приложение А), затем* добавляют рассчитанные объемы исходного раствора вещества *(см. 5.3.3.4)* для получения заданных концентраций, *отвечающих требованиям,* установленным в 5.4.1.

5.3.3.7 Измеряют и регистрируют *минерализацию* (соленость), pH *и концентрацию растворенного кислорода в каждой колбе* с анализируемой пробой.

Примечание — Минерализация (соленость) анализируемой пробы и питательной среды для культивирования водорослей должна быть одна и та же; *если минерализация (соленость) разная, то проводят адаптацию водорослей к минерализации (солености) анализируемой пробы (см. приложение А). Если минерализация (соленость) анализируемой пробы отличается от минерализации (солености) среды для культивирования водорослей не более чем на 5 ‰, адаптацию не проводят.*

5.3.3.8 Подготовку тест-организмов к тестированию проводят в соответствии с требованиями приложения ДА с учетом требований 5.3.4.

5.3.4 Проверка физиологической чувствительности тест-организмов

Периодически *(не реже одного раза в месяц), а также непосредственно перед тестированием анализируемых проб и в случае проведения адаптации водорослей к минерализации (солености) анализируемых проб* культуру водорослей *в экспоненциальной фазе роста* проверяют на физиологическую чувствительность. *Для этого определяют эффективную концентрацию модельного токсиканта (72 ч $ЭК_{50}$), как указано ниже.*

5.3.4.1 Готовят исходный раствор модельного токсиканта массовой концентрацией 1 г/дм³ следующим способом: в мерную колбу вместимостью 1000 см³ вносят 1 г двухромовокислого калия и растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, затем доводят содержимое колбы до метки дистиллированной водой, тщательно перемешивают.

Срок хранения исходного раствора модельного токсиканта — не более 7 сут.

5.3.4.2 Готовят анализируемые растворы модельного токсиканта двухромовокислого калия с массовой концентрацией от 1,0 до 10 мг/дм³ следующим способом: в пять мерных колб вместимостью 500 см³ вносят исходный раствор двухромовокислого калия массовой концентрацией 1 г/дм³ (см. 5.3.3.1)

соответственно в первую колбу — 0,5 см^3, во вторую колбу — 1,0 см^3, в третью колбу — 2,0 см^3, в четвертую колбу — 4,0 см^3, в пятую колбу — 5,0 см^3, доводят содержимое каждой колбы до метки питательной средой Гольдберга (см. приложение А) и перемешивают. При этом в каждой колбе массовая концентрация раствора двухромовокислого калия составляет соответственно: 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 и 10,0 мг/дм^3.

Анализируемые растворы двухромовокислого калия каждой концентрации готовят непосредственно перед определением физиологической чувствительности водорослей.

Для приготовления контрольной пробы используют среду Гольдберга (приложение А).

Измеряют минерализацию (соленость) и pH в каждой колбе с анализируемым раствором модельного токсиканта и контрольной пробе.

5.3.4.3 Проводят тестирование анализируемых растворов модельного токсиканта аналогично процедуре тестирования анализируемой пробы по 5.4.3 в течение 72 ч.

5.3.4.4 Подсчитывают плотность (численность) клеток водорослей в соответствии с требованиями приложения ДВ и на основании полученных результатов определяют по 5.5 значение 72 ч $ЭК_{50}$ модельного токсиканта (двухромовокислого калия).

При этом:

- если значение 72 ч $ЭК_{50}$ указанного модельного токсиканта находится в диапазоне от 5,8 до 10,0 мг/дм^3, то считают, что подготовленные водоросли пригодны для тестирования;

- если значение 72 ч $ЭК_{50}$ указанного модельного токсиканта не входит в указанный диапазон, то считают, что подготовленные водоросли не пригодны для тестирования. Проверяют соблюдение правильности процедуры тестирования, условия подготовки водорослей к тестированию и, при необходимости, повторяют тестирование с использованием обновленной культуры водорослей.

5.3.4.5 Если в результате тестирования не удалось получить конкретное значение 72 ч $ЭК_{50}$, то для определения 72 ч $ЭК_{50}$ модельного токсиканта используют пробит-анализ. Пример приведен в приложении ДБ.

5.4 *Проведение тестирования*

Тестирование проводят в два этапа: предварительное и окончательное.

5.4.1 Предварительное тестирование

Предварительное тестирование проводят для установления диапазона *разбавлений* (концентраций) *проб,* в пределах которого необходимо провести окончательное тестирование *для определения значения 72 ч $ЭКР_{50}$ (96 ч $ЭКР_{50}$) или 72 ч $ЭК_{50}$ в зависимости от анализируемых проб.*

При предварительном тестировании исследуют широкую область *разбавлений (не менее пяти) сточных вод, водных вытяжек и* концентрации растворов вещества, *выбираемых в геометрической прогрессии, при этом, как правило, используют коэффициент 10 между разбавлениями* (концентрациями).

При предварительном тестировании применяют не менее двух колб на каждое анализируемое разбавление (концентрацию) *пробы.*

Процедура предварительного тестирования — по 5.4.3.

Пример проведения предварительного тестирования и установления диапазона концентраций вещества, в пределах которого необходимо проводить окончательное тестирование, приведен в приложение ДБ.

5.4.2 Окончательное тестирование

По результатам предварительного тестирования (см. 5.4.1) для установленного диапазона разбавлений (концентраций) *подготавливают анализируемые пробы для окончательного тестирования. При этом* используют *коэффициент между разбавлениями* (концентрациями), *как правило, 2,0 или 2,5.*

Разбавления (концентрации) *проб* необходимо, по возможности, подбирать таким образом, чтобы обеспечить два уровня снижения *плотности* (численности) клеток водорослей: ниже и выше предполагаемого значения $ЭК_{50}$ (*$ЭКР_{50}$*).

Процедура окончательного тестирования *— по 5.4.3. При этом используют не менее пяти разбавлений* (концентраций) *анализируемых проб,* применяют не менее трех колб для каждого *разбавления* (концентрации).

Пример проведения окончательного тестирования и установление значений эффективной концентрации 72 ч $ЭК_{50}$ для вещества приведен в приложение ДБ.

Примечание — Если имеется достаточное количество статистических данных, схема тестирования может быть изменена, например увеличено количество тестируемых *разбавлений* (концентраций) пробы или уменьшено количество колб с анализируемыми пробами для каждого *разбавления* (концентрации).

5.4.3 Процедура тестирования

5.4.3.1 В каждую колбу *(см. 5.4.1 и 5.4.2) вместимостью 250 см³* вносят *по 100 см³* анализируемой пробы *(см. 5.3.3.6), затем в каждую колбу* добавляют *рассчитанный* объем суспензии водорослей *в экспоненциальной фазе роста (см.5.3.3.8),* перемешивают, *выдерживают 30 мин на свету* и определяют плотность *(численность)* клеток водорослей, *соответствующую началу тестирования, по приложению ДВ.*

Плотность *(численность)* клеток водорослей в начале тестирования должна находиться в пределах $2{,}0 \cdot 10^4$ — $2{,}5 \cdot 10^4$ клеток/см³.

5.4.3.2 Для каждой серии анализируемых *разбавлений* (концентраций) проб подготавливают контрольную пробу *следующим способом:* в три конические колбы *вместимостью 250 см³* вносят *по 100 см³* питательной среды *Гольдберга [см. А.1.2 (приложение А)], добавляют по 1,0 см³* суспензии водорослей в экспоненциальной фазе роста *(см. 5.3.3.8), перемешивают, выдерживают 30 мин на свету и* определяют плотность *(численность)* клеток водорослей, соответствующую началу тестирования, *по приложению ДВ. При этом плотность (численность) клеток водорослей в контрольной пробе должна находиться в пределах* $2{,}0 \cdot 10^4$ — $2{,}5 \cdot 10^4$ *клеток/см³.*

Примечание — Чтобы получить в начале тестирования плотность (численность) клеток водорослей в пределах от $2 \cdot 10^4$ *до* $2{,}5 \cdot 10^4$ *клеток/см³ , достаточно в каждую колбу внести 1,0 см³ суспензии водорослей из культуры, плотность (численность) которой находится в пределах от* $2 \cdot 10^6$ *до* $2{,}5 \cdot 10^6$ *клеток/см³.*

Минерализация (соленость) контрольной пробы должна соответствовать минерализации (солености) анализируемой пробы.

5.4.3.3 Колбы с пробами, подготовленными по 5.4.3.1, 5.4.3.2, закрывают *ватно-марлевыми* пробками, встряхивают *и помещают в климатостат.*

Примечания

1 Колбы *с водорослями* должны быть закрытыми для предотвращения снижения испарения раствора; однако колбы не следует закрывать герметично, чтобы обеспечить воздухообмен, *рекомендуется применять ватно-марлевые пробки.*

2 Клетки водорослей необходимо поддерживать во взвешенном состоянии, путем легкого встряхивания *колбы (например, вручную),* чтобы обеспечить единый уровень pH и *газовый режим* в различных слоях анализируемой пробы.

3 Значение pH контрольной пробы при тестировании не должно меняться более чем на ± 1,0 ед. pH.

Тестирование проводят в течение 72 ч или 96 ч (в зависимости от анализируемой пробы) в климатостате при температуре (20 ± 2) °С, имитируя светлый период суток — 16 ч и темный период — 8 ч. Содержимое каждой колбы перемешивают (встряхивают вручную) один-два раза в сутки.

Климатостат должен обеспечивать равномерное и белое освещение в диапазоне от 3000 до 6000 лк на расстоянии 0,35 м от поверхности анализируемых проб в колбах.

5.4.3.4 Через каждые 24 ч *тестирования* определяют плотность *(численность)* клеток *водорослей* в каждой колбе (включая контрольную) *в соответствии с требованиями приложения ДВ.*

5.5 Обработка результатов

5.5.1 По результатам подсчета плотности (численности) клеток водорослей для каждого заданного разбавления (концентрации) анализируемой пробы по трем емкостям, в том числе контрольной, рассчитывают среднеарифметическое значение плотности (численности) клеток водорослей.

5.5.2 Степень токсичности А, %, для каждого заданного разбавления (концентрации) анализируемой пробы после 72 ч (96 ч) тестирования рассчитывают по формуле

$$A = \frac{\bar{x}_к - \bar{x}_{ан}}{\bar{x}_к} 100, \qquad (2)$$

где $\bar{x}_к$ *— среднеарифметическое значение плотности (численности) клеток водорослей в контрольной пробе, клеток/см³;*

$\bar{x}_{ан}$ *— среднеарифметическое значение плотности (численности) клеток водорослей для каждого заданного разбавления (концентрации) в анализируемой пробе, клеток/см³.*

5.5.3 Характеристику токсичности проб природной морской воды и воды эстуариев устанавливают в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1

Характеристика токсичности проб природной морской воды и воды эстуариев	*Степень токсичности А, %*
Нетоксичная	*До 10 включ.*
Слаботоксичная	*Св. 10 » 25 »*
Среднетоксичная	*» 25 » 35 »*
Токсичная	*» 35 » 50 »*
Высокотоксичная	*» 50 » 100 »*

5.5.4 Характеристику токсичности проб сточной воды, водных вытяжек отработанных буровых растворов, твердых промышленных отходов, донных отложений, а также веществ устанавливают следующим способом:

- если А менее 10 % включительно, то считают, что анализируемая проба не оказывает токсического действия (безвредная кратность разбавления или безвредная концентрация);

- если А свыше 10 % до 50 % включительно, то считают, что анализируемая проба оказывает токсическое действие;

- если А свыше 50 %, то считают, что анализируемая проба является высокотоксичной.

***5.5.5* Определение эффективной *кратности разбавления* (концентрации)**

5.5.5.1 Для каждого заданного разбавления (концентрации) анализируемой пробы рассчитывают процент снижения плотности (численности) клеток водорослей после 72 ч (96 ч) тестирования по отношению к плотности (численности) клеток водорослей в контрольной пробе, используя полученные по 5.5.1 среднеарифметические значения и формулу (2).

По полученным значениям процентов снижения плотности (численности) клеток водорослей определяют конкретное значение эффективной кратности разбавления (концентрации) пробы, вызывающее 50 %-ное снижение плотности (численности) клеток водорослей 72 ч $ЭКР_{50}$ (96 ч $ЭКР_{50}$) или 72 ч $ЭК_{50}$ в зависимости от анализируемой пробы.

При необходимости определяют:

- минимальную кратность разбавления (концентрацию) пробы, соответствующую 100 %-ному снижению плотности (численности) клеток водорослей;

- максимальную кратность разбавления (концентрацию) пробы, соответствующую 0 %-ному снижению плотности (численности) клеток водорослей за 72 ч (96 ч).

5.5.5.2 Допускается определять значение эффективной кратности разбавления (концентрации) по замедлению скорости роста клеток водорослей как указано в 6.5.1 — 6.5.3. Пример приведен в приложении ДБ.

5.5.5.3 Если по результатам, *полученным по 5.5.5.1 (5.5.5.2),* не удалось определить *конкретное* значение *эффективной кратности разбавления* (концентрации) *пробы,* вызывающей 50 %-ное *снижение* плотности *(численности) клеток водорослей* за 72 ч (96 ч), то для определения этого значения используют пробит-анализ. *Пример приведен в приложении ДБ.*

5.5.6 Результаты тестирования считают достоверными, если соблюдаются следующие условия:

а) плотность *(численность)* клеток водорослей в контрольной пробе в конце тестирования увеличилась не менее чем в *три* раза по сравнению с плотностью *(численностью)* клеток водорослей в начале тестирования;

b) коэффициент колебаний темпов роста клеток водорослей в контрольных пробах в каждой из трех колб тестируемой серии анализируемых проб в течение тестирования должен быть не более 7 % относительно среднеарифметического значения плотности (численности) клеток водорослей;

c) уровень pH в контрольной пробе изменился не более чем на 1,0 ед. pH в конце тестирования;

d) токсичность модельного токсиканта находится в пределах, указанных в 5.3.4.4.

5.6 Оформление результатов *тестирования*

5.6.1 Результаты тестирования регистрируют в протоколе испытаний *в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025, при этом указывают* следующую информацию:

а) ссылку на настоящий стандарт *с указанием метода определения;*

b) данные, необходимые для идентификации пробы или анализируемого вещества, прошедшего испытания;

c) тест-организмы: вид, происхождение, метод культивирования;

d) подробное описание тестирования:

- дата начала тестирования и продолжительность;

- *для природной морской воды, воды эстуариев, сточных вод, водных вытяжек отработанных буровых растворов, твердых промышленных отходов, донных отложений — кратность разбавления, способ и продолжительность хранения проб и, при необходимости, условия, в которых проводились отстаивание, фильтрование, а также размораживание пробы;*

- *для веществ — анализируемые концентрации, способ их приготовления;*

- наименование и состав питательной среды для культивирования водорослей;

- источник и *минерализацию* (соленость) морской воды;

- значение pH анализируемых проб перед тестированием и после его окончания;

e) *значение степени токсичности исследуемого объекта с указанием, при необходимости, эффективной кратности разбавления (концентрации) анализируемой пробы, ей соответствующей, а также* результаты окончательного определения *эффективной кратности разбавления 72 ч $ЭКР_{50}$ (96 ч $ЭКР_{50}$),* эффективной концентрации 72 ч $ЭК_{50}$ *в зависимости от анализируемой пробы,* метод расчета (при необходимости);

f) обстоятельства и условия, не предусмотренные настоящим стандартом, способные повлиять на результат тестирования.

Примечание — Допускается в протокол *дополнительно* включать следующую информацию:

- метод определения плотности *(численности)* клеток водорослей;

- плотность *(численность)* клеток водорослей в каждой колбе после окончания любой заданной продолжительности тестирования;

- среднеарифметическое *значение* плотности *(численности)* клеток водорослей для каждой кратности *разбавления* (концентрации) *в анализируемых и контрольных пробах после окончания любой заданной продолжительности тестирования;*

- зависимость между кратностью *разбавления* (концентрации) пробы и значениями плотности *(численности)* клеток водорослей в процентах в табличной или графической форме.

5.6.2 Значения 72 ч $ЭКР_{50}$ (96 ч $ЭКР_{50}$), 72 ч $ЭК_{50}$ выражают:

- в процентах (%) или в кратности разбавления (разы) — для природной морской воды, воды эстуариев, сточных вод и водных вытяжек;

- в миллиграммах на кубический дециметр (мг/дм^3) — для растворов веществ.

6 *Метод Б*

6.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в регистрации замедления скорости роста клеток *морских одноклеточных водорослей Phaeodactylum tricornutum* Bohlin *или Sceletonema* costatum (Greville) Cleve в анализируемой пробе *исследуемого объекта* относительно контрольной пробы, определении ее *токсичности и* токсикологических показателей при тестировании в течение 72 ч при постоянном воздействии света и температуры.

6.2 *Средства измерений, вспомогательное* оборудование, *реактивы,* материалы — по 5.2 со следующими дополнениями:

Фильтры мембранные с порами диаметром 0,2 мкм.

Автоклав, *обеспечивающий рабочее давление (0,11 ± 0,02) МПа и температуру (120 ± 2) °С.*

Тест-организмы: морские одноклеточные водоросли по 5.2 или *Sceletonema costatum* (Greville) Cleve (CCAP 1077/1 C, NIVA BAC 1).

Примечание — Методы культивирования водорослей приведены в *приложении ДА.*

Питательная среда, приготовленная в соответствии с требованиями приложения А.

Примечание — Для длительного содержания водорослей *Sceletonema costatum* (Greville) Cleve и приготовления *питательной среды* для культивирования необходимо применение природной морской воды (см. 5.2), поскольку *питательная* среда, *приготовленная на* искусственной морской воде (см. 5.3.2), не всегда обеспечивает достаточный рост *этих* водорослей для тестирования.

Модельный токсикант по 4.2 или 3,5-дихлорфенол, *ч. д. а.*

Соль динатриевая этилендиамин-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты 2-водная (трилон Б) по ГОСТ 10652, х. ч.

Цинк сернокислый 7-водный по ГОСТ 4174, х. ч.

Медь (II) сернокислая 5-водная по ГОСТ 4165, х. ч.

Тиамина гидрохлорид, х. ч.

Биотин.

Калий фосфорнокислый, х. ч.

Натрий азотнокислый по ГОСТ 4168, х. ч.

Натрий кремниевокислый 5-водный, х. ч.

6.3 Подготовка к тестированию — *аналогично 5.3, при этом* подготовку анализируемых проб сточных вод проводят в соответствии с требованиями *приложения ДГ.*

Примечание — При необходимости определения физиологической чувствительности тест-организмов [в т. ч. водорослей Scheletonema costatum (Greville) Cleve (CCAP 1077/1 C, NIVA BAC 1)] по отношению к *модельному токсиканту 3,5-дихлорфенолу ее проводят аналогично модельному токсиканту калию двухромовокислому (см. 5.3.4), но с использованием данных, приведенных в таблице ДД.1 (приложение ДД).*

6.4 Проведение тестирования — *аналогично* 5.4 со следующими уточнениями:

6.4.1 Тестирование проводят в течение (72 ± 2) ч в помещении с регулируемой температурой (20 ± 2) °С при постоянном *воздействии* равномерного белого освещения в диапазоне от 6000 до 10000 лк на расстоянии 0,35 м от поверхности анализируемых проб в колбах при непрерывном и легком взбалтывании *анализируемых проб.*

Примечание — Требуемая освещенность может быть достигнута с использованием люминесцентных ламп мощностью 300 Вт универсального белого (естественного) света, то есть номинальный цвет эталона цвета 2 (цветовая температура 4300 К).

6.4.2 При предварительном тестировании анализируемой пробы используют по одной колбе *для каждого разбавления (концентрации) пробы.*

6.4.3 Окончательное тестирование проводят с анализируемыми пробами, которые приготовлены с использованием коэффициента между *разбавлениями* (концентрациями) не более 3,2 (например, 1,0; 1,8; 3,2; 5,6 и 10,0 мг/дм^3).

6.4.4 Количество добавленной во все колбы (включая контрольную пробу) суспензии водорослей в экспоненциальной фазе роста должно обеспечить начальную плотность *(численность)* клеток водорослей в пробе не более 10^4 клеток/см^3; для *Scheletonema costatum* (Greville) Cleve рекомендуется более низкая начальная плотность *(численность)* клеток (в три—пять раз менее), так как клетки этих *водорослей* большего объема.

Примечание — Исходная плотность *(численность)* клеток *водорослей* в начале тестирования должна быть достаточно низкой, чтобы обеспечить экспоненциальный рост в контрольной пробе за период проведения всего тестирования.

Для приготовления контрольной пробы используют питательную среду по А.2.2 (приложение А).

6.4.5 *Если* для определения плотности *(численности)* клеток *водорослей используют спектрофотометр или флюорат [см. ДВ.2 (приложение ДВ)], то* для каждого анализируемого *разбавления* (концентрации) *пробы* готовят в отдельных емкостях *фоновые* растворы *без разбавлений* и без водорослей (например, исследуемые пробы воды прозрачные, окрашенные или мутные), которые будут служить фоном *при проведении измерений.*

Примечание — При тестировании окрашенных или мутных проб с использованием водорослей может возникнуть интерференция, ослабляя свет, необходимый для роста клеток водорослей. В таком случае измеряют интенсивность флуоресценции пробы без водорослей (фоновые растворы) и полученное значение вычитают из значения интенсивности флуоресценции полученного при измерении пробы с водорослями.

6.5 Обработка результатов тестирования — по 5.5 с учетом расчетов *эффективной кратности разбавления* (концентрации), как указано ниже.

6.5.1 Построение графической зависимости скорости роста клеток водорослей от продолжительности тестирования

Для каждой кратности *разбавления* (концентрации) *анализируемой пробы* (в том числе и контрольной) строят график скорости роста клеток водорослей в виде зависимости логарифма среднеарифметических значений плотности *(численности)* клеток *водорослей* от продолжительности тестирования.

6.5.2 Определение *скорости* роста клеток водорослей

Для каждой кратности *разбавления* (концентрации) *анализируемой пробы* рассчитывают скорость роста *клеток водорослей* μ_i, *клеток/ч*, по формуле

$$\mu_i = \frac{\lg N_t - \lg N_0}{t}, \quad (3)$$

где N_t — *среднеарифметическое значение* плотности *(численности)* клеток водорослей в анализируемой пробе в *конце тестирования, клеток/см*^{3};

N_0 — *среднеарифметическое значение* плотности *(численности)* клеток водорослей в анализируемой пробе в *начале тестирования клеток/см*^{3};

t — продолжительность тестирования, ч.

Аналогично по формуле (3) рассчитывают *среднеарифметическое* значение скорости роста *клеток водорослей* в контрольной пробе ($\overline{\mu}_c$).

6.5.3 Замедление скорости роста клеток водорослей I_μ, %, для каждой заданной кратности *разбавления* (концентрации) *анализируемой пробы* рассчитывают по формуле

$$I_\mu = \frac{\overline{\mu}_c - \overline{\mu}_i}{\overline{\mu}_c} 100, \quad (4)$$

где $\overline{\mu}_c$ — среднеарифметическое значение скорости роста *клеток водорослей в контрольной пробе, клеток/ч;*

$\overline{\mu}_i$ — *среднеарифметическое значение* скорости роста *клеток водорослей в анализируемой пробе, клеток/ч.*

6.5.4 Определение *эффективной кратности разбавления* (концентрации)

Для каждой заданной кратности *разбавления* (концентрации) анализируемой пробы рассчитывают по формуле (4) значение замедления скорости роста клеток водорослей и, используя график (см. 6.5.2) или формулу (3), определяют значение 72 ч *ЭКР*$_{50}$ или 72 ч ЭК$_{50}$ в зависимости от анализируемой пробы.

Пример определения эффективной кратности разбавления (концентрации) по замедлению скорости роста клеток водорослей приведен в ДБ.4 (приложение ДБ).

Если не удалось точно определить конкретное значение 72 ч *ЭКР*$_{50}$ (72 ч ЭК$_{50}$), то эти значения получают с использованием пробит-анализа. Пример приведен в *ДБ.3 (приложение ДБ).*

6.5.5 Результаты тестирования считают достоверными, если соблюдаются следующие условия:

а) плотность *(численность)* клеток водорослей в контрольной пробе в конце тестирования увеличилась не менее чем в 16 раз по сравнению с плотностью *(численностью)* клеток водорослей в начале тестирования.

Примечание — Такое увеличение плотности *(численности)* клеток водорослей соответствует скорости роста клеток 0,9 сут$^{-1}$;

b) коэффициент колебаний темпов роста клеток водорослей в контрольных пробах в каждой из трех колб тестируемой серии анализируемых проб в течение тестирования должен быть не более 7 % относительно среднеарифметического значения плотности *(численности)* клеток водорослей;

c) уровень pH в контрольной пробе изменился не более чем на 1.0 ед. pH в конце тестирования;

d) *токсичность модельного токсиканта находится в пределах, указанных в приложении ДД.*

6.6 Информация о проведенных межлабораторных испытаниях приведена в *приложении ДД.*

6.7 Оформление результатов тестирования — по 5.6.

Приложение А
(обязательное)

Приготовление питательных сред

А.1 Приготовление питательной среды для метода А

А.1.1 Приготовление исходных растворов для питательной среды Гольдберга

Исходные растворы № 1 — № 4 для приготовления питательной среды Гольдберга готовят в мерных колбах вместимостью 100 см^3, куда вносят реактивы в количествах, указанных в таблице А.1, и затем содержимое колб доводят до метки дистиллированной водой (см. 5.2).

Таблица А.1

Номер исходного раствора	*Состав раствора*	*Масса (навеска) реактива на 100 см^3 дистиллированной воды, г*	*Объем раствора, используемый для приготовления питательной среды по А.1.2, см^3*
1	*Калий азотнокислый по ГОСТ 4217 (KNO_3)*	*10,1*	*2,0*
2	*Натрий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 245 (NaH_2PO_4)*	*1,421*	*0,5*
3	*Марганец хлористый 4-водный по ГОСТ 612 ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)*	*0,01979*	*1,0*
	Кобальт хлористый 6-водный по ГОСТ 4525 ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	*0,02379*	
4	*Хлорид железа 6-водный по ГОСТ 4147 ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)*	*0,02703*	*1,0*

Исходные растворы № 1 — № 4 хранят при температуре от 2 °С до 4 °С не более одного года, при помутнении растворов их заменяют.

А.1.2 Приготовление питательной среды Гольдберга

В колбу вместимостью 2000 см^3 вносят 1000 см^3 отфильтрованной природной (см. 5.2) или искусственной (см. 5.3.2) морской воды и стерилизуют на водяной бане в течение 20 мин при температуре 75 °С — 80 °С, затем содержимое охлаждают, выдерживают при комнатной температуре в течение 24 ч и снова стерилизуют на водяной бане. После охлаждения в колбу добавляют исходные растворы № 1 — № 3 в количествах и последовательности, как указано в таблице А.1.

Полученный раствор стерилизуют на водяной бане в течение 20 мин при температуре 75 °С — 80 °С и охлаждают, затем добавляют раствор № 4 (см. таблицу А.1).

Если для приготовления питательной среды для культивирования водорослей используют искусственную морскую воду (см. 5.3.2), то ее допускается разбавлять дистиллированной водой до минерализации (солености), соответствующей минерализации (солености) анализируемой пробы.

Питательную среду Гольдберга хранят в условиях, исключающих воздействие света при комнатной температуре не более одного года.

А.2 Приготовление питательной среды *для метода Б*

А.2.1 Приготовление исходных растворов

Исходные растворы № 1 — № 3 *для приготовления* питательной среды готовят *в мерных колбах вместимостью 100 см^3, куда вносят* реактивы в количествах, указанных в таблице А.2, *и затем содержимое колб доводят до метки деионизированной* водой *(см. 5.2).*

Приготовленные исходные растворы фильтруют через мембранный фильтр с *диаметром пор* 0,2 мкм. Исходные растворы № 1 и № 3 допускается стерилизовать в автоклаве при температуре 120 °С *в течение 15 мин.*

Исходные растворы хранят при температуре от 2 °С до 4 °С *не более одного года.*

Таблица А.2

Номер исходного раствора	*Состав раствора*	*Массовая концентрация реактива в исходном растворе, мг/дм³*	*Массовая концентрация реактива в питательной среде по А.2.2, мкг/дм³*
1	*Хлорид железа 6-водный по ГОСТ 4147* ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	48	149 (Fe)
	Марганец хлористый 4-водный по ГОСТ 612 ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	144	605 (Mn)
	Цинк сернокислый 7-водный по ГОСТ 4174 ($ZnSO_4 \cdot 5H_2O$)	45	150 (Zn)
	Медь (II) сернокислая 5-водная по ГОСТ 4165 ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0,157	0,6 (Cu)
	Кобальт хлористый 6-водный по ГОСТ 4525 ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	0,404	1,5 (Co)
2	*Борная кислота по ГОСТ 9656* (H_3BO_3)	1140	3,0 (B)
	Биотин	0,01	0,005
	Витамин B_{12} (цианокобаламин)	0,10	0,05
	Фосфорнокислый калий (K_3PO_4)	3,0 г/дм³	3,0 мг/дм³; 0,438 мг/дм³ P
3	*Азотнокислый натрий по ГОСТ 4168* ($NaNO_3$)	50,0 г/дм³	50,0 мг/дм³; 8,24 мг/дм³ N
	Кремниевокислый натрий 5-водный ($Na_2SiO_3 \cdot 5H_2O$)	14,9 г/дм³	14,9 мг/дм³; 1,97 мг/дм³ Si

А.2.2 Приготовление питательной среды

В мерную колбу вместимостью 1000 см³ вносят примерно 900 см³ природной (см. 5.2) или искусственной (см. 5.3.2) морской воды, добавляют исходные растворы (см. таблицу А.2) в следующей последовательности и количествах: 15 см³ раствора № 1; 0,5 см³ раствора № 2; 1,0 см³ раствора № 3, *затем доводят содержимое колбы* до метки той же морской водой.

При необходимости доводят pH питательной среды до значения (8,0 ± 0,2) путем добавления *10 %-ного* раствора соляной кислоты или *10 %-ного* раствора гидроокиси натрия.

Примечание — При приготовлении питательной среды для *Sceletonema costatum* (Greville) Cleve используют только природную морскую воду.

А.2.3 Приготовление концентрированной питательной среды для разбавлений сточных вод

В мерную колбу вместимостью 1000 см³ вносят 700 см³ природной (см. 5.2) или искусственной (см. 5.3.2) морской воды, добавляют исходные растворы (см. таблицу А.2) в следующей последовательности и количествах: 135 см³ исходного раствора № 1; 4,5 см³ раствора № 2; 9 см³ раствора № 3, *затем доводят содержимое колбы* до метки той же морской водой.

Измеряют значение pH полученной концентрированной питательной среды и доводят до *значения* (8,0 ± 0,2) путем добавления или *10 %-ного* раствора соляной кислоты, или *10 %-ного* раствора гидроокиси натрия.

Примечание — При подготовке анализируемой пробы сточной воды разбавлением исходной пробы сточной воды природной (см. 5.2) или искусственной (см. 5.3.2) морской водой рекомендуется использовать концентрированную питательную среду, так как при тестировании пробы необходимо обеспечить постоянство соотношений концентраций компонентов питательной среды для водорослей на уровне массовых концентраций реактивов, приведенных в таблице А.2.

Приложение ДА
(обязательное)

Методы культивирования водорослей

ДА.1 Культивирование водорослей для метода А

ДА.1.1 Культивирование водорослей проводят в конических колбах вместимостью 250 см^3 на питательной среде Гольдберга в условиях, соответствующих условиям проведения тестирования проб по 5.4.3.3.

ДА.1.2 Культивируя водоросли, периодически обновляют маточную культуру, пересевая ее на свежеприготовленную питательную среду [см. А.1.2 (приложение А)] не реже одного раза в 10 сут. Обновление культуры проводят следующим способом: в стерильную колбу вместимостью 250 см^3 со свежей питательной средой объемом 150 см^3 над пламенем спиртовки вносят 15 — 20 см^3 верхнего ростового слоя маточной культуры (содержимое исходной культуры при этом не перемешивают). После пересева колбу закрывают стерильной ватно-марлевой пробкой и бумажным колпачком, перемешивают и выдерживают в условиях по 5.4.3.3. При этом плотность (численность) клеток водорослей в колбе должна составлять около 1,0 · 10^5 — 1,5 · 10^5 клеток/см^3. В течение 10 сут водоросли периодически перемешивают, встряхивая колбы вручную один-два раза в сутки.

В случае замедления роста клеток водорослей к питательной среде добавляют витамин B_{12} (одну или две капли на 1 дм^3 среды).

ДА.1.3 Для тестирования используют культуру водорослей в экспоненциальной фазе роста и заданной плотности (численности) клеток водорослей. Для этого за 3 сут до начала тестирования в колбу вместимостью 250 см^3 со свежей питательной средой объемом 100 см^3 над пламенем спиртовки вносят 20 см^3 суспензии водорослей из маточной культуры (см. ДА.1.2). Затем колбу закрывают стерильной ватно-марлевой пробкой и бумажным колпачком, перемешивают вручную и выдерживают в условиях по 5.4.3.3 в течение 3 сут. При этом плотность (численность) клеток водорослей в подготовленной к тестированию культуре должна находиться в пределах от 2,0 · 10^6 до 2,5 · 10^6 клеток/см^3.

ДА.1.4 Непосредственно перед тестированием в подготовленной по ДА.1.3 трехсуточной культуре водорослей определяют в соответствии с требованиями ДВ.1 (приложение ДВ) плотность (численность) клеток в 1 см^3 суспензии водорослей, используя для этого не менее двух аликвот суспензии. Полученное значение плотности (численности) клеток водорослей должно находиться в пределах от 2 · 10^5 до 2,5 · 10^6 клеток/см^3. Если полученное значение менее 2,0 · 10^6 клеток/см^3, то увеличивают продолжительность культивирования водорослей (см. ДА.1.3) еще на сутки. Затем рассчитывают необходимый объем суспензии для внесения в каждую колбу с контрольной и анализируемой пробой при тестировании.

Примечание — Чтобы получить в начале тестирования плотность (численность) клеток водорослей в пределах от 2 · 10^4 до 2,5 · 10^4 клеток/см^3, достаточно в каждую емкость внести 1,0 см^3 суспензии водорослей из культуры, плотность (численность) которой находится в пределах от 2 · 10^6 до 2,5 · 10^6 клеток/см^3.

ДА.2 Культивирование водорослей *для метода Б*

ДА.2.1 Культивирование водорослей проводят в конических колбах вместимостью 250 см^3 на питательной среде [см. А.2.2 (приложение А)] в условиях тестирования по 6.4.1.

ДА.2.2 Необходим регулярный пересев культур водорослей, для *Sceletonema costatum* (Greville) Cleve *его осуществляют один раз в 7 сут*; для *Phaeodactylum tricomutum* Bohlin — один раз в 14 или 21 сут. При этом пересев культур водорослей проводят аналогично *ДА.1.2* в условиях по 6.4.1 *с использованием питательной среды* по А.2.2 (приложение А).

ДА.2.3 Для тестирования культуру водорослей готовят следующим способом: в питательную среду [см. А.2.2 (приложение А)] добавляют такой объем суспензии водорослей из маточной культуры водорослей (*см. ДА.2.2*), чтобы получить начальную плотность *(численность)* клеток, соответствующую диапазону от 2,0 · 10^3 до 10^4 клеток/см^3, и выдерживают в условиях тестирования по 6.4.1 в течение 3 сут.

ДА.2.4 Культура водорослей, подготовленная по *ДА.2.3*, в течение тестирования должна обеспечить экспоненциальный рост водорослей. Непосредственно перед тестированием определяют плотность (*численность*) клеток в подготовленной культуре водорослей *в соответствии с требованиями ДВ.1 (приложение ДВ)* и рассчитывают необходимый объем *суспензии водорослей для внесения в каждую колбу с контрольной и анализируемой пробой для тестирования.*

ДА.3 Адаптация водорослей к воде различной минерализации (солености)

ДА.3.1 Природная морская вода в разных морях и отдельных акваториях моря имеет различную минерализацию (соленость), поэтому необходимо иметь культуру водорослей, заранее адаптированную к разной минерализации (солености) анализируемой пробы воды (водной вытяжки), подлежащей тестированию, и содержать ее в заданных условиях для культивирования.

Если минерализация (соленость) морской воды (см. 5.2), на которой готовили питательную среду для культуры водорослей, выше, чем минерализация (соленость) анализируемой пробы, то морскую воду разбавляют дистиллированной водой до минерализации (солености) анализируемой пробы и используют ее для приготовления новой питательной среды.

ДА.3.2 Адаптацию водорослей к среде необходимой минерализации (солености) проводят, меняя постепенно минерализацию (соленость) питательной среды. Для этого в стерильную колбу вместимостью 250 см^3 над пламенем спиртовки вносят 80 см^3 суспензии водорослей в экспоненциальной фазе роста (в возрасте 3 сут) и добавляют 20 см^3 питательной среды необходимой минерализации (солености). Культивируют водоросли в условиях, аналогичных тестированию анализируемых и контрольных проб: для метода А — по 5.4.3.3; для метода Б — по 6.4.1. При этом общий объем адаптируемой культуры водорослей должен составлять 100 см^3.

Через каждые 5 сут меняют соотношение адаптируемой культуры и питательной среды необходимой минерализации (солености) следующим способом: 60 см^3 адаптируемой культуры и 40 см^3 питательной среды; 40 см^3 адаптируемой культуры и 60 см^3 питательной среды; 20 см^3 адаптируемой культуры и 80 см^3 питательной среды.

При адаптации каждый раз культуру водорослей пересевают в новую стерильную колбу со свежеприготовленной питательной средой той минерализации (солености), к которой проводят адаптацию. Через 20 сут адаптацию заканчивают.

ДА.3.3 Адаптированную культуру водорослей пересевают на свежеприготовленную питательную среду и культивируют в течение 5 сут в условиях по 5.4.3.3 — для метода А, по 6.4.1 — для метода Б, после чего проверяют физиологическую чувствительность адаптированной культуры водорослей в соответствии с требованиями 5.3.4.

Приложение ДБ
(обязательное)

Примеры определения эффективной кратности разбавления (концентрации)

ДБ.1 Пример определения 72 ч $ЭК_{50}$ модельного токсиканта

ДБ.1.1 Результаты определения физиологической чувствительности одноклеточных водорослей Phaeodactylum tricornutum Bohlin *в растворе модельного токсиканта (калий двухромовокислый) приведены в таблице ДБ.1.*

Таблица ДБ.1

Продолжительность тестирования, ч	Массовая концентрация модельного токсиканта мг/дм^3	Плотность (численность) клеток водорослей, $n \cdot 10^4$ клеток/см^3, в колбах			Средневрифметическое значение плотности (численности) клеток водорослей $n \cdot 10^4$ клеток/см^3	Процент снижения плотности (численности) клеток водорослей, %
		№ 1	№ 2	№ 3		
72	0 (контрольная проба)	13,0	13,1	13,2	13,1	—
	1,0	11,8	11,9	12,0	11,9	9
	2,0	10,7	10,8	10,6	10,7	18
	4,0	8,0	8,2	8,1	8,1	38
	8,0	5,8	5,9	5,7	5,8	56
	10,0	4,4	4,6	4,5	4,5	66

Примечания

1 Знак «—», проставленный для контрольной пробы, означает, что снижение плотности (численности) клеток водорослей не допустимо. В контрольной пробе установлено увеличение плотности (численности) клеток водорослей по сравнению с плотностью (численностью) клеток водорослей, соответствующей началу тестирования, в пять раз (см. 5.5.6 настоящего стандарта).

2 Процент снижения плотности (численности) клеток водорослей рассчитан по 5.5.5.1.

ДБ.1.2 По результатам тестирования, приведенным в таблице ДБ.1, 50 %-ное снижение плотности (численности) клеток водорослей за 72 ч не зарегистрировано.

В этом случае для обработки результатов тестирования применяют пробит-анализ аналогично примеру, приведенному в ДБ.3. Получают значение 72 ч $ЭК_{50}$ для указанного модельного токсиканта, равное 6,31 мг/дм^3, которое входит в диапазон концентраций, указанный в 5.3.4.4. Следовательно, водоросли пригодны для тестирования.

ДБ.2 Примеры определения эффективной концентрации вещества по методу А

ДБ.2.1 Пример проведения предварительного тестирования

Пример проведения предварительного тестирования по 5.4.1 для выбора диапазона концентраций вещества, в пределах которого необходимо провести окончательное тестирование, приведен в таблице ДБ.2.

Таблица ДБ.2

Продолжительность тестирования, ч	Массовая концентрация вещества, мг/дм^3	Плотность (численность) клеток водорослей, $n \cdot 10^4$ клеток/см^3, в колбах		Средневрифметическое значение плотности (численности) клеток водорослей. $n \cdot 10^4$ клеток/см^3	Процент снижения плотности (численности) клеток водорослей, %
		№ 1	№ 2		
72	0 (контрольная)	8,9	8,7	8,8	—
	0,1	8,7	8,9	8,8	0
	1,0	8,5	8,7	8,6	2
	10,0	7,8	7,6	7,7	13

Окончание таблицы ДБ.2

Продолжительность тестирования, ч	Массовая концентрация вещества, мг/дм^3	Плотность (численность) клеток водорослей, $n \cdot 10^4$ клеток/см^3, в колбах		Среднеарифметическое значение плотности (численности) клеток водорослей, $n \cdot 10^4$ клеток/см^3	Процент снижения плотности (численности) клеток водорослей, %
		№ 1	№ 2		
72	100,0	0	0	0	100
	1000,0	0	0	0	100

Примечания

1 Знак «–», проставленный для контрольной пробы, означает, что снижение плотности (численности) клеток водорослей не допустимо. В контрольной пробе установлено увеличение плотности (численности) клеток водорослей по сравнению с плотностью (численностью) клеток водорослей, соответствующей началу тестирования, в четыре раза (см. 5.5.6).

2 Процент снижения плотности (численности) клеток водорослей рассчитан по 5.5.5.1.

Из данных таблицы ДБ.2 следует, что диапазон концентраций вещества, в пределах которого необходимо проводить окончательное тестирование, составляет от 10,0 до 100 мг/дм^3.

ДБ.2.2 Пример проведения окончательного тестирования

Пример проведения окончательного тестирования по 5.4.2 приведен в таблице ДБ.3.

Таблица ДБ.3

Продолжительность тестирования, ч	Массовая концентрация вещества, мг/дм^3	Плотность (численность) клеток водорослей, $n \cdot 10^4$ клеток/см^3, в колбах			Среднеарифметическое значение плотности (численности) клеток водорослей, $n \cdot 10^4$ клеток/см^3	Процент снижения плотности (численности) клеток водорослей, %
		№ 1	№ 2	№ 3		
72	0 (контрольная проба)	9,0	8,8	9,2	9,0	—
	1,0	8,7	9,3	9,0	9,0	0
	2,5	8,7	8,9	8,5	8,7	3
	5,0	8,1	8,7	8,4	8,4	7
	10,0	7,5	7,8	7,8	7,7	14
	25,0	5,9	6,3	6,1	6,1	32
	50,0	3,3	3,4	3,8	3,5	61
	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100

Примечания

1 Знак «–», проставленный для контрольной пробы, означает, что снижение плотности (численности) клеток водорослей не допустимо. В контрольной пробе установлено увеличение плотности (численности) клеток водорослей по сравнению с плотностью (численностью) клеток водорослей, соответствующей началу тестирования, в четыре раза (см. 5.5.6).

2 Процент снижения плотности (численности) клеток водорослей рассчитан по 5.5.5.1.

Из данных таблицы ДБ.3 видно, что не зарегистрированы значения массовой концентрации вещества, которые соответствуют 50 %-ному снижению плотности (численности) клеток водорослей при тестировании в течение 72 ч, поэтому 72 ч $ЭК_{50}$ определяют, используя пробит-анализ аналогично примеру, приведенному в ДБ.3, и находят значение 72 ч $ЭК_{50}$, равно 39,81 мг/дм^3.

ДБ.3 Пример обработки результатов тестирования с использованием пробит-анализа

ДБ.3.1 Если по результатам тестирования не зарегистрировано конкретное значение эффективной кратности разбавления (концентрации) пробы, то результаты тестирования обрабатывают с применением метода математической статистики — пробит-анализа. Значения пробитов, соответствующие

снижению плотности (численности) клеток водорослей в диапазоне от 0 % до 99 %, приведены в таблице ДБ.4.

Таблица ДБ.4

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

ДБ.3.2 Результаты тестирования по определению эффективной кратности разбавления пробы методом пробит-анализа на примере сточной воды приведены в таблице ДБ.5.

Таблица ДБ.5

Кратность разбавления сточных вод С, %	Десятичный логарифм кратности разбавления (lg С)	Процент снижения плотности (численности) клеток водорослей, %	Значения пробитов по таблице ДБ.4
3,12	0,494	0	—
6,25	0,796	0	—
12,50	1,097	19	4,12
25,00	1,398	43	4,82
50,00	1,699	85	6,04
100,00	2,000	97	6,88

Примечание — Данные, приведенные в таблице ДБ.5, получены в результате тестирования сточной воды по методу А в течение 72 ч.

ДБ.3.3 По значениям пробитов и десятичных логарифмов кратности разбавлений (см. таблицу ДБ.5) строят график линейной зависимости, откладывая по оси ординат значения пробитов, по оси абсцисс — значения десятичных логарифмов кратности разбавлений (lg С) анализируемой пробы.

Пример построения графика линейной зависимости на примере анализируемой пробы сточной воды приведен на рисунке ДБ.1.

ДБ.3.4 На графике (см. рисунок ДБ.1) на оси ординат из точки, соответствующей значению пробита пять, что соответствует 50 %-ному снижению плотности (численности) клеток водорослей, проводят прямую параллельно оси абсцисс до пересечения с графиком. Из точки пересечения прямой с графиком (М) опускают перпендикуляр на ось абсцисс и получают значение lg С (равно 1,46), соответствующее 72 ч $ЭКР_{50}$.

Используя таблицу антилогарифмов, определяют соответствующее значению lg С (1,46), значение процентной концентрации (равно 28,84 %). Затем устанавливают значение кратности разбавления 72 ч $ЭКР_{50}$, соответствующее 50 %-ному снижению плотности (численности) клеток водорослей, которое равно 3,47 раза.

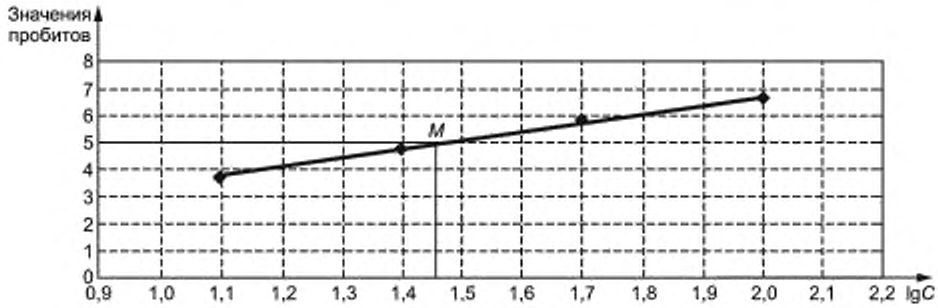


Рисунок ДБ.1 — График линейной зависимости значений пробитов от lg C анализируемой пробы сточной воды

Аналогично устанавливают значение $ЭКР_{10}$ (безвредную кратность разбавления), при этом получают значение lg C (равно 1,09) и, используя таблицу антилогарифмов, определяют соответствующее значению lg C (1,09) значение процентной концентрации (равно 12,30 %), что соответствует кратности разбавления 8,13 раз.

***ДБ.4 Пример определения эффективной кратности разбавления (концентрации) по замедлению скорости роста клеток водорослей Phaeodactylum tricornutum* Bohlin**

ДБ.4.1 По результатам тестирования и подсчета плотности (численности) клеток водорослей в каждой колбе за каждые 24 ч на протяжении 72 ч тестирования (см. приложение ДВ) для каждой анализируемой пробы заданной кратности разбавления (концентрации) и контрольной пробы рассчитывают среднеарифметические значения плотности (численности) клеток водорослей N_L, клеток/см^3, и определяют соответствующие им значения логарифма ($lg N_L$).

Пример обработки результатов тестирования анализируемой пробы вещества приведен в таблице ДБ.6.

Таблица ДБ.6

Массовая концентрация вещества Y, мг/дм^3	Среднеарифметическое значение плотности (численности) клеток водорослей после тестирования анализируемой пробы вещества в течение					
	24 ч		48 ч		72 ч	
	N_L, клеток/см^3	$lg N_L$	N_L клеток/см^3	$lg N_L$	N_L, клеток/см^3	$lg N_L$
0 (контрольная проба)	$4,4 \cdot 10^4$	4,62	$8,4 \cdot 10^4$	4,92	$16,8 \cdot 10^4$	5,23
10,0	$3,4 \cdot 10^4$	4,53	$6,6 \cdot 10^4$	4,82	$13,2 \cdot 10^4$	5,12
25,0	$2,6 \cdot 10^4$	4,42	$4,4 \cdot 10^4$	4,64	$8,8 \cdot 0^4$	4,95
50,0	$1,7 \cdot 10^4$	4,23	$2,5 \cdot 10^4$	4,40	$4,2 \cdot 10^4$	4,62
Примечание — Начальная плотность (численность) клеток водорослей в начале тестирования (N_0) составляет 10^4 клеток/см^3, $lg N_0$ равен 4,00.						

ДБ.4.2 Замедление скорости роста клеток водорослей в процентах определяют одним из способов:

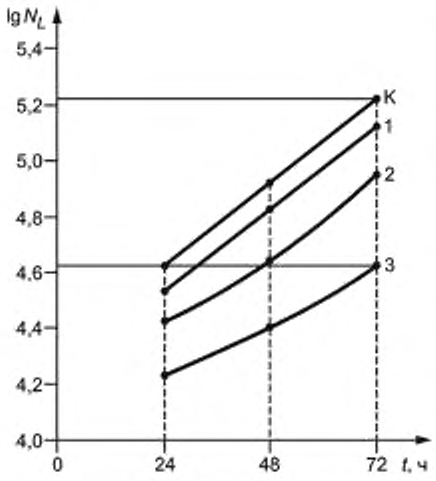
- графическим методом (см. ДБ.4.2.1);

- расчетным методом (см. ДБ.4.2.2).

ДБ.4.2.1 Графический метод определения замедления скорости роста клеток водорослей

На основании полученных результатов (см. таблицу ДБ.6) строят график скорости роста клеток водорослей для контрольной пробы и каждой заданной кратности разбавления (концентрации) анализируемой пробы в виде зависимости логарифма плотности (численности) клеток ($lg N_L$) от продолжительности тестирования, откладывая на оси ординат значение $lg N_L$, а на оси абсцисс — продолжительность тестирования (t, ч).

Пример графика скорости роста клеток водорослей Phaeodactylum tricornutum Bohlin *для контрольной пробы и каждой заданной концентрации анализируемой пробы вещества по результатам тестирования в течение 72 ч (см. таблицу ДБ.6) приведен на рисунке ДБ.2.*



K — скорость роста клеток водорослей в контрольной пробе; 1 — скорость роста клеток водорослей в анализируемой пробе при Y = 10 мг/дм³; 2 — скорость роста клеток водорослей в анализируемой пробе при Y = 25 мг/дм³, 3 — скорость роста клеток водорослей в анализируемой пробе при Y = 50 мг/дм³.

Рисунок ДБ.2 — Пример графика скорости роста клеток водорослей Phaeodactylum tricornutum Bohlin *в течение тестирования*

Замедление скорости роста клеток водорослей $I_{\mu i}$, %, после 72 ч тестирования определяют для каждой заданной кратности разбавления (концентрации) анализируемой пробы относительно контрольной пробы следующим образом:

a) на ось ординат из точки, соответствующей значению 72 ч, для графика скорости роста клеток водорослей в контрольной и скорости роста клеток водорослей в анализируемой пробе каждой кратности разбавления (концентрации) проводят прямые линии параллельные оси абсцисс до пересечения с осью ординат (например, см. рисунок ДБ.2 для линии K и линии 3);

b) рассчитывают значение разности между значениями логарифмов для контрольной пробы и каждым полученным, как указано в a), значением логарифмов кратности разбавления (концентрации) анализируемой пробы. Например, за 72 ч (см. рисунок ДБ.2) для контрольной пробы (линия K) значение lg N_K равно 5,23, для анализируемой пробы концентрацией Y = 50 мг/дм³ (линия 3) значение lg N_{L3} равно 4,62; разность этих логарифмов составляет 0,61;

c) рассчитывают скорость роста клеток водорослей в контрольной пробе за 72 ч по разности между значениями логарифмов плотности (численности) клеток водорослей в конце тестирования и плотности (численности) клеток водорослей в начале тестирования. Например, значение lg N_K (см. рисунок ДБ.2) равно 5,23, что соответствует плотности (численности) клеток водорослей в контрольной пробе в конце тестирования, значение lg N_0 равно 4,0 (см. таблицу ДБ.6) и соответствует плотности (численности) клеток водорослей в контрольной пробе в начале тестирования; разность этих логарифмов составляет 1,23, что соответствует скорости роста клеток водорослей в контрольной пробе;

d) рассчитывают замедление скорости роста клеток водорослей $I_{\mu i}$, %, для каждой заданной кратности разбавления (концентрации) относительно контрольной пробы по формуле

$$I_{\mu i} = \frac{\lg N_{L_i}}{\lg N_{L_{K_i}}} 100, \qquad (ДБ.1)$$

где $\lg N_{L_i}$ *— значение разности логарифмов контрольной пробы и анализируемой пробы, полученное по b);*

$\lg N_{L_{K_i}}$ *— значение разности логарифмов для контрольной пробы, полученное по c).*

Например, используя формулу (ДБ.1) для линии 3, замедление скорости роста клеток водорослей в процентах относительно контрольной пробы (линия K) составляет

$$I_{\mu 3} = \frac{0{,}61}{1{,}23} 100 = 50\ \%, \qquad (ДБ.2)$$

таким образом получаем, что замедление скорости роста клеток водорослей на 50 % за 72 ч тестирования соответствует концентрации вещества Y = 50 мг/дм³ анализируемой пробы.

Примечание — Если тест-организмы в контрольной пробе показывают снижение скорости роста клеток водорослей в конце тестирования, то тест-организмы с замедленной скоростью роста клеток водорослей в одной из заданных концентраций анализируемой пробы могут догнать контрольные и ошибочно указать на отсутствие воздействия по замедлению скорости роста клеток водорослей. В этом случае проводят расчет скорости роста и замедления скорости роста клеток водорослей на основе последних измерений с учетом периода экспоненциального роста клеток водорослей в контрольных пробах (например, через 24 ч).

На графике скорости роста также отмечают увеличение скорости роста клеток водорослей в анализируемой пробе заданной кратности разбавления (концентрации относительно контрольной пробы — стимулирующий эффект) и указывают в протоколе испытаний.

ДБ.4.2.2 Расчетный метод определения замедления скорости роста клеток водорослей

По полученным результатам тестирования (например, см. таблицу ДБ.6) замедление скорости роста клеток водорослей $I_{\mu i}$, %, рассчитывают по формуле (4) с учетом использования формулы (3) для каждого заданного разбавления (концентрации) анализируемой пробы и контрольной пробы. При этом учитывают начальную плотность (численность) клеток водорослей в начале тестирования N_0.

ДБ.4.2.3 Пример результатов определения скорости роста и замедления скорости роста клеток водорослей по ДБ.4.2.1 или ДБ.4.2.2 приведен в таблице ДБ.7.

Таблица ДБ.7

Массовая концентрация вещества Y, мг/дм^3	*Скорость роста клеток водорослей в конце тестирования μ_i, клеток/ч*	*Замедление скорости роста клеток водорослей в конце тестирования $I_{\mu i}$, %*
0 (контрольная проба)	*0,0171*	—
10,0	*0,0155*	*9*
25,0	*0,0132*	*23*
50,0	*0,0086*	*50*
Примечание — Начальная плотность (численность) клеток водорослей в начале тестирования (N_0) составляет 10^4 клеток/см^3, $lg\ N_0$ равен 4,0.		

ДБ.4.3 Определение эффективной кратности разбавления (концентрации)

По результатам полученным по ДБ.4.2.1 или ДБ.4.2.2 по значению замедления скорости роста клеток водорослей определяют значение эффективной кратности разбавления (концентрации), соответствующее 50 %-ному замедлению скорости роста клеток водорослей 72 ч $ЭКР_{50}$ (72 ч $ЭК_{50}$). Пример приведен в таблице ДБ.7.

Из примера, приведенного в таблице ДБ.7, видно, что значение концентрации, которое соответствует 50 %-ному замедлению скорости роста клеток водорослей при тестировании в течение 72 ч $ЭК_{50}$, равно 50,0 мг/дм^3.

Приложение ДВ
(обязательное)

Методы подсчета численности клеток водорослей

ДВ.1 Определение плотности (численности) клеток водорослей методом прямого счета в камере Горяева

Подсчет плотности (численности) клеток водорослей в камере Горяева (см. рисунок ДВ.1) проводят следующим способом:

Содержимое колбы с водорослями перемешивают вручную, затем пипеткой отбирают суспензию водорослей (аликвоту) и наносят по одной капле на верхнюю и нижнюю части сетки счетной камеры Горяева. Затем камеру накрывают покровным стеклом, которое притирают по бокам до появления колец интерференции.

Примечания

1 Взятую в пипетку каплю суспензии водорослей необходимо очень быстро нанести на поверхность сетки, пока клетки водорослей не успели осесть в нижней части пипетки.

2 Нанесенную на поверхность сетки каплю суспензии водорослей следует быстро накрыть покровным стеклом и притереть его во избежание оседания клеток водорослей из капли.

3 После притирания покровного стекла и при подсчете клеток водорослей под микроскопом необходимо следить за тем, чтобы жидкость под покровным стеклом была распределена равномерно.

4 Камеры Горяева обычно имеют две сетки, разделенные желобком. В таких камерах наносят параллельно две капли суспензии водорослей.

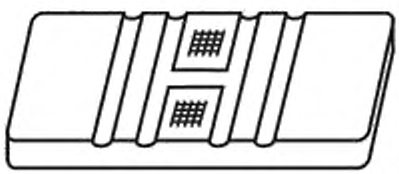
Капли суспензии водорослей наносят не подряд из одной пипетки, а при двукратном взятии суспензии в пипетку из одной и той же колбы.

Через 1 — 2 мин после оседания клеток водорослей камеру Горяева помещают под объектив микроскопа и подсчитывают количество клеток водорослей во всех 25 больших квадратах сетки.

Примечания

1 После подсчета клеток водорослей камеру Горяева сразу же тщательно моют водопроводной водой и протирают мягкой тканью (например, фланелью).

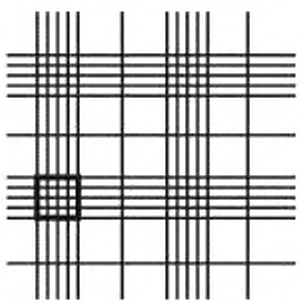
2 Подсчет числа клеток водорослей в камере Горяева рекомендуется проводить при плотности (численности) клеток (1,0 — 2,5) · 10^6 клеток/$см^3$, так как при большей плотности (численности) клеток водорослей в суспензиях подсчет трудоемок и менее точен.



a – общий вид камеры Горяева



b – вид сбоку камеры Горяева



c – увеличенный фрагмент сетки для подсчета клеток водорослей. Выделен один большой квадрат

Рисунок ДВ.1 — Счетная камера Горяева

Плотность (численность) клеток водорослей X в 1 $см^3$ суспензии водорослей рассчитывают по формуле

$$X = m \cdot 10^4, \qquad (ДВ.1)$$

где m — суммарное количество клеток водорослей в учтенных больших квадратах сетки;

10^4 — коэффициент пересчета кубических миллиметров в кубические сантиметры.

Плотность (численность) клеток водорослей подсчитывают в каждой колбе, отбирая по две аликвоты.

За результат подсчета плотности (численности) клеток водорослей принимают среднеарифметическое значение не менее двух определений для каждой заданной кратности разбавления (концентрации) анализируемой пробы, в том числе и контрольной пробы, которое вычисляют с допускаемым отклонением не более ± 7 %.

ДВ.2 Определение плотности (численности) клеток водорослей с использованием метода флуориметрии

ДВ.2.1 Подготовка прибора к измерениям

Прибор готовят к работе в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации.

Устанавливают следующие параметры работы прибора:

- температура 20 °С;

- интенсивность флуоресценции клеток водорослей в области длин волн 400 — 500 нм при возбуждении флуоресценции и в области длин волн 650 — 750 нм при регистрации флуоресценции.

ДВ.2.2 Градуировка прибора

Градуировку прибора выполняют с использованием средств программного обеспечения прибора с применением градуировочных растворов по ДВ.2.3. При этом коэффициент линейной корреляции полученных градуировочных характеристик должен быть не менее 0,99.

ДВ.2.3 Приготовление градуировочных растворов

Градуировочные растворы готовят следующим способом: подготовленную культуру водорослей (см. приложение ДА) вносят в колбы вместимостью 250 $см^3$ и последовательно разбавляют питательной средой (например, для метода А — средой Гольдберга) в соотношении:

- 50 $см^3$ суспензии водорослей и 50 $см^3$ питательной среды (разбавление в два раза);

- 25 $см^3$ суспензии водорослей и 75 $см^3$ питательной среды (разбавление в четыре раза);

- 16,6 $см^3$ суспензии водорослей и 83,4 $см^3$ питательной среды (разбавление в шесть раз);

- 12,5 $см^3$ суспензии водорослей и 87,5 $см^3$ питательной среды (разбавление в восемь раз);

- 10 $см^3$ суспензии водорослей и 90 $см^3$ питательной среды (разбавление в 10 раз);

- 5 $см^3$ суспензии водорослей и 95 $см^3$ питательной среды (разбавление в 20 раз);

- 2,5 $см^3$ суспензии водорослей и 97,5 $см^3$ питательной среды (разбавление в 40 раз);

- 1,66 $см^3$ суспензии водорослей и 98,34 $см^3$ питательной среды (разбавление в 60 раз);

- 1,25 $см^3$ суспензии водорослей и 98,75 $см^3$ питательной среды (разбавление в 80 раз);

- 1,0 $см^3$ суспензии водорослей и 99 $см^3$ питательной среды (разбавление в 100 раз);

- 0,1 $см^3$ суспензии водорослей и 99,9 $см^3$ питательной среды (разбавление в 1000 раз).

Холостая проба — питательная среда (например, для метода А — среда Гольдберга).

ДВ.2.4 Установление градуировочной характеристики

Колбы с подготовленными по ДВ.2.3 градуировочными растворами закрывают ватно-марлевыми пробками, встряхивают, помещают в люминостат или климатостат и выдерживают 15 мин при температуре (20 ± 2) °С и освещенности 3000 — 6000 лк, после чего содержимое каждой колбы (включая холостую пробу) тщательно перемешивают.

Затем с использованием счетной камеры Горяева под микроскопом подсчитывают (см. ДВ.1) плотность (численность) клеток водорослей в каждой колбе, отбирая не менее двух аликвот, и рассчитывают среднеарифметическое значение. После этого в соответствии с инструкцией (руководством) по эксплуатации прибора измеряют значения интенсивности флуоресценции B_i, не менее двух аликвот из каждой колбы, соответствующих полученным по ДВ.1 значениям плотности (численности) клеток водорослей в каждой колбе.

Устанавливают градуировочную характеристику в виде зависимости среднеарифметических значений из измеренных значений интенсивности флуоресценции (за вычетом среднеарифметического значения интенсивности флуоресценции холостой пробы) от среднеарифметических значений плотности (численности) клеток водорослей, полученных по ДВ.1. При этом:

- если прибор снабжен компьютерной (микропроцессорной) системой сбора и обработки информации, то градуировочную характеристику устанавливают в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации прибора;

- если прибор не предусматривает проведения автоматизированной градуировки, то угловой коэффициент (наклон) градуировочной характеристики b, $см^3$/клеток, рассчитывают по формуле

$$b = \frac{\sum_{i=1}^{i} X_i \Delta B_i}{\sum_{i=1}^{i} (X_i)^2}, \qquad (ДВ.2)$$

где X_i — плотность (численность) клеток водорослей в i-м градуировочном растворе, клеток/$см^3$;

ΔB_i — среднеарифметическое значение интенсивности флуоресценции i-го градуировочного раствора за вычетом среднеарифметического значения интенсивности флуоресценции холостой пробы;

i — число использованных градуировочных растворов (см. ДВ.2.3).

Примечание — Градуировочная характеристика должна проходить через начало координат, если не проходит, то рекомендуется установить причину этого, заново приготовить градуировочные растворы и повторить градуировку.

ДВ.2.5 Контроль стабильности градуировочной характеристики

Периодически, но не реже одного раза в месяц, проводят контроль градуировочной характеристики с использованием градуировочных растворов по ДВ.2.3.

Градуировочную характеристику считают стабильной, если сохраняются угол наклона градуировочной характеристики и линейная зависимость плотности (численности) клеток от интенсивности флуоресценции раствора.

ДВ.2.6 Порядок проведения измерений

Измерения интенсивности флуоресценции анализируемых проб проводят в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации прибора с учетом требований ДВ.2.1 и условий проведения градуировки прибора по ДВ.2.4. При этом не менее трех раз измеряют значение интенсивности флуоресценции каждой анализируемой пробы заданной кратности разбавления (концентрации) в каждой колбе. Аналогичные измерения проводят для контрольной и холостой проб.

ДВ.2.7 Определение численности клеток водорослей в анализируемой пробе

ДВ.2.7.1 При наличии компьютерной (микропроцессорной) системы сбора и обработки информации порядок обработки результатов измерений устанавливают в соответствии с руководством (инструкцией) по эксплуатации прибора.

ДВ.2.7.2 При отсутствии компьютерной (микропроцессорной) системы сбора и обработки информации значение интенсивности флуоресценции клеток водорослей B рассчитывают по формуле

$$B = B_{пр} - B_{х}, \qquad (ДВ.3)$$

где $B_{пр}$ — *среднеарифметическое значение из измеренных значений интенсивности флуоресценции анализируемой пробы;*

$B_{х}$ — *среднеарифметическое значение из измеренных значений интенсивности флуоресценции холостой пробы.*

ДВ.2.7.3 Плотность (численность) клеток водорослей $X_{ал}$, *клеток/см*^{3}, *в аликвоте анализируемой пробы определяют по соответствующей градуировочной характеристике (см. ДВ.2.4), используя значение B, рассчитанное по формуле (ДВ.3), либо рассчитывают по формуле*

$$X_{ал} = \frac{B}{b}, \qquad (ДВ.4)$$

где b — угловой коэффициент (наклон) градуировочной характеристики, рассчитанный по формуле (ДВ.2), см^3*/клеток.*

ДВ.2.7.4 Если полученное значение, найденное по ДВ.2.7.3, превышает верхнюю границу диапазона градуировочной характеристики, то анализируемую пробу разбавляют так, чтобы значение в разбавленной пробе укладывалось в диапазон градуировочной характеристики, либо анализируют меньший объем пробы.

ДВ.2.7.5 Плотность (численность) клеток водорослей в анализируемой пробе X, клеток/см^3, *рассчитывают по формуле*

$$X = \frac{X_{ал} V_{м.к} f}{V_{пр}}. \qquad (ДВ.5)$$

где $X_{ал}$ — *плотность (численность) клеток водорослей в аликвоте анализируемой пробы, рассчитанная по формуле (ДВ.4), клеток/см*^{3}*;*

$V_{м.к}$ — *вместимость мерной колбы, использованной для подготовки анализируемой пробы, см*^{3}*;*

$V_{пр}$ — *объем аликвоты анализируемой пробы, см*^{3}*;*

f — *коэффициент разбавления анализируемой пробы, при этом, если пробу не разбавляли, то f принимают равным единице, если разбавляли (см. ДВ.2.7.4), то f рассчитывают по формуле*

$$f = \frac{V_к}{V_а}, \qquad (ДВ.6)$$

где $V_к$ — *вместимость мерной колбы, использованной при разбавлении анализируемой пробы, см*^{3}*;*

$V_а$ — *объем аликвоты анализируемой пробы, взятый для разбавления, см*^{3}.

ДВ.2.7.6 За результат измерений плотности (численности) клеток водорослей принимают среднеарифметическое из результатов не менее двух определений, если расхождение между ними не превышает ± 5 %.

ДВ.3 Для определения плотности *(численности)* клеток водорослей допускается использовать турбодиметрию и фотометрию, при условии их достаточной чувствительности и корреляции с плотностью *(численностью)* клеток водорослей, *при этом* для мутных проб сточной воды предпочтительна флуориметрия (см. ДВ.2).

Приложение ДГ
(справочное)

Приготовление *анализируемых* проб сточных вод *для метода Б*

ДГ.1 Анализируемые пробы сточных вод готовят в конических колбах, смешивая, как указано в таблице ДГ.1, *необходимые* объемы концентрированной питательной среды [см. А.2.3 (приложение А)], суспензии водорослей в экспоненциальной фазе роста, исходной пробы сточной воды, *подготовленной в соответствии с требованиями 5.3.3.2 настоящего стандарта,* и морской воды. Пример приготовления анализируемых проб сточной воды разбавлением и контрольной пробы приведен в таблице ДГ.1, *при этом* общий объем проб во всех колбах *для тестирования* должен быть одинаковым. Начальная плотность *(численность)* клеток водорослей — по 6.4.4.

Таблица ДГ.1

Кратность разбавления *исходной пробы сточной воды,* количество раз	*Объем суспензии водорослей* (см. ДА.2.4), $см^3$	Объем исходной пробы сточной воды по 5.3.3.2, $см^3$	Объем морской воды по 5.2 или 5.3.2, $см^3$	Объем концентрированной *питательной среды по* А.2.3, $см^3$	Объем анализируемой *пробы сточной воды,* $см^3$
Без разбавления	10	80	—	10	100
2	10	50	30	10	100
3	10	33,33	46,67	10	100
4	10	25	55	10	100
5	10	20	60	10	100
8	10	12,5	67,5	10	100
12	10	8,33	71,67	10	100
16	10	6,25	73,75	10	100
24	10	4,17	75,83	10	100
32	10	3,125	76,875	10	100
Контрольная проба	10	—	80	10	100

Приложение ДД
(справочное)

Информация о результатах проведенных межлабораторных испытаний *для метода Б*

ДД.1 Результаты тестирования, проведенные в 1989 — 1990 гг. при межлабораторных исследованиях, приведены в таблице ДД.1.

Таблица ДД.1

Модельные токсиканты	Количество лабораторий	*Количество* значений выбросов	Среднеарифметическое значение $ЭК_{50}$ (EC_{50}), мг/дм^3	Стандартное отклонение мг/дм^3	Коэффициент вариации, %
Тест-организмы: Sceletonema costatum (Greville) Cleve					
Бихромат калия	9	2	2,5 (n = 7)	1,1	44
3,5-дихлорфенол	7	2	1,6 (n = 5)	0,3	18
Тест-организмы: Phaeodactylum tricomutum Bohlin					
Бихромат калия	10	3	20,1 (n = 7)	5,3	26
3,5-дихлорфенол	10	3	2,7 (n = 7)	0,2	8,6

Приложение ДЕ
(справочное)

Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного стандарта

ДЕ.1 Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного к нему международного стандарта ИСО 10253:2006 приведено в таблице ДЕ.1. Указанное в таблице ДЕ.1 изменение структуры национального стандарта Российской Федерации относительно структуры примененного международного стандарта обусловлено приведением в соответствие требований, установленных в ГОСТ Р 1.7, и включением дополнительного к ИСО 10253:2006 метода определения токсичности для учета потребностей национальной экономики Российской Федерации.

Таблица ДЕ.1

Структура международного стандарта ИСО 10253:2006			Структура настоящего национального стандарта		
Раздел 1			Раздел 1		
Раздел 2			Раздел 2		
Раздел 3			Раздел 3		
Подразделы	Пункты	Подпункты	Разделы	Пункты	Подпункты
3.1	—	—	3	3.1	—
3.2	—	—		3.2	—
3.3	—	—		3.3	—
3.4	—	—		3.4	—
3.5	—	—		—	—
3.6	—	—		3.5	—
3.7	—	—		3.6	—
Раздел 4			Подраздел 6.1		
Раздел 5			Подразделы 5.2; 6.2		
Подразделы	Пункты	Подпункты	Разделы	Пункты	Подпункты
5.1	—	—	5	5.2; 6.2	—
5.2	—	—		5.2	—
5.3	—	—		5.3.2	—
5.4	—	—	Приложение А		А.2.1
Раздел 6			Подразделы 5.2; 6.2		
Подразделы	Пункты	Подпункты	Разделы	Пункты	Подпункты
6.1	—	—	6	6.2	—
6.2	—	—	5	5.2	—
6.3	—	—		5.2	—
6.4	—	—	5; 6	5.2; 6.2	—
6.5	—	—	6	6.2	—
6.6	—	—	5	5.2	—

Окончание таблицы ДЕ.1

Структура международного стандарта ИСО 10253:2006			Структура настоящего национального стандарта		
Раздел 7			Подразделы 5.4; 6.4		
Подразделы	Пункты	Подпункты	Разделы	Пункты	Подпункты
7.1	—	—	Приложение А		А.2.2
7.2	—	—	Приложение ДА		ДА.2
7.3	—	—	5; 6	—	5.3.3.4; 6.4.3
7.4	—	—	5	—	5.3.3.4; 5.3.3.5
7.5	—	—	5	—	5.4.3.1; 5.4.3.2
7.6	—	—	5; 6	—	6.4.1; 6.4.2
7.7	—	—	6	—	6.4.1
Раздел 8			Раздел 1 (примечание 2)		
Раздел 9			Подраздел 6.5		
Подразделы	Пункты	Подпункты	Разделы	Пункты	Подпункты
9.1	—	—	6	—	6.5.2
9.2	—	—		—	6.5.3
9.3	—	—		—	6.5.4
Раздел 10			Подраздел 5.6		
Раздел 11			Раздел 1, примечание 4		
Раздел 12			Приложение ДД		
Раздел 13			Подраздел 5.6		
Приложение А		А.1	Приложение А		А.2.3 (примечание)
		А.2			А.2.3
		А.3	Приложение ДГ		ДГ.1
—			Приложение ДА		
—			Приложение ДБ		
—			Приложение ДВ		
—			Приложение ДГ		
—			Приложение ДЕ		
—			Приложение ДЖ		
—			Приложение ДИ		

Примечания

1 Прочерк, проставленный для подраздела 3.5 ИСО 10253:2006, означает, что указанный термин не включен в настоящий стандарт. Полный текст подраздела 3.5 с обоснованиями не включения в настоящий стандарт приведен в приложении ДЕ.

2 Подразделы 7.3 — 7.6 ИСО 10253:2006 состоят из значительного количества абзацев, которые в настоящем стандарте размещены в соответствующих подразделах, указанных в данной таблице.

Приложение ДЖ
(справочное)

Требования международного стандарта, не вошедшие в настоящий стандарт

ДЖ.1 Требования ИСО 10253:2006, не вошедшие в настоящий стандарт

В настоящий стандарт не включен термин 3.5 в связи с тем, что он дублирует термин 3.4.

Полный текст термина 3.5 приведен ниже:

«3.5 **тестируемая проба** (test batch): Смесь морской воды, питательных веществ и тестируемого вещества (тестирование среды 3.4), в котором культивируются водоросли».

Приложение ДИ
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных национальных и межгосударственных стандартов международным стандартам, использованным в качестве ссылочных в примененном международном стандарте

Таблица ДИ.1

Обозначение ссылочного национального, межгосударственного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование ссылочного международного стандарта
ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025—2006	IDT	ИСО/МЭК 17025—2005 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий»
ГОСТ Р 51592—2000	NEQ	ИСО 5667-1:1982 «Качество воды. Отбор проб. Часть 1. Руководство по составлению программы отбора проб»*
		ИСО 5667-2:1991 «Качество воды. Отбор проб. Часть 2. Руководство по методам отбора проб»*
		ИСО 5667-3:1994 «Качество воды. Отбор проб. Часть 3. Руководство по хранению и обращению с пробами»**
ГОСТ Р 52501—2005	MOD	ИСО 3696:1987 «Вода для лабораторного анализа. Технические требования и методы испытаний»
ГОСТ Р 53228—2008	—	—
ГОСТ 17.1.5.05—85	—	—
ГОСТ 245—76	—	—
ГОСТ 612—75	—	—
ГОСТ 1770—74	IDT	ИСО 1042:1998 «Посуда лабораторная стеклянная. Мерные колбы с одной меткой»
		ИСО 4788:1980 «Посуда лабораторная стеклянная. Градуированные мерные цилиндры»***
ГОСТ 3118—77	—	—
ГОСТ 4147—74	—	—
ГОСТ 4165—78	NEQ	ИСО 6353-1:1982 «Реактивы для химического анализа. Часть 1. Общие методы испытаний»
		ИСО 6353-2:1983 «Реактивы для химического анализа. Часть 2. Технические условия. Первая серия»
ГОСТ 4166—76	—	—

* Заменен на ИСО 5667-1:2006.
** Заменен на ИСО 5667-3:2003.
*** Заменен на ИСО 4788:2005.

Продолжение таблицы ДИ.1

Обозначение ссылочного национального, межгосударственного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование ссылочного международного стандарта
ГОСТ 4168—79	NEQ	ИСО 6353-3:1987 «Реактивы для химического анализа. Часть 3. Технические условия. Вторая серия»
ГОСТ 4174—77	—	—
ГОСТ 4201—79	NEQ	ИСО 6353-3:1987 «Реактивы для химического анализа. Часть 3. Технические условия. Вторая серия»
ГОСТ 4209—77		ИСО 6353-1:1982 «Реактивы для химического анализа. Часть 1. Общие методы испытаний»
		ИСО 6353-2:1983 «Реактивы для химического анализа. Часть 2. Технические условия. Первая серия»
ГОСТ 4217—77	—	—
ГОСТ 4220—75	—	—
ГОСТ 4233—77	NEQ	ИСО 6353-1:1982 «Реактивы для химического анализа. Часть 1. Общие методы испытаний»
		ИСО 6353-2:1983 «Реактивы для химического анализа. Часть 2. Технические условия. Первая серия»
ГОСТ 4234—77	NEQ	ИСО 6353-1:1982 «Реактивы для химического анализа. Часть 1. Общие методы испытаний»
		ИСО 6353-3:1987 «Реактивы для химического анализа. Часть 3. Технические условия. Вторая серия»
ГОСТ 4328—77	—	—
ГОСТ 4461—77	NEQ	ИСО 6353-2:1983 «Реактивы для химического анализа. Часть 2. Технические условия. Первая серия»
ГОСТ 4525—77	NEQ	ИСО 6353-1:1982 «Реактивы для химического анализа. Часть 1. Общие методы испытаний»
		ИСО 6353-3:1987 «Реактивы для химического анализа. Часть 3. Технические условия. Вторая серия»
ГОСТ 4529—78	—	—
ГОСТ 6709—72	—	—
ГОСТ 9147—80	—	—
ГОСТ 9656—75	—	—
ГОСТ 10652—73	NEQ	ИСО 6353-2:1983 «Реактивы для химического анализа. Часть 2. Технические условия. Первая серия»
ГОСТ 12026—76	—	—
ГОСТ 19126—2007	—	—

Окончание таблицы ДИ.1

Обозначение ссылочного национального, межгосударственного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование ссылочного международного стандарта
ГОСТ 25336–82	IDT	ИСО 1773:1976 «Посуда лабораторная стеклянная. Узкогорлые колбы для кипячения»*
		ИСО 3819:1985 «Посуда лабораторная стеклянная. Стаканы»
		ИСО 4797:1981 «Посуда лабораторная стеклянная. Колбы с коническими шлифами»**
ГОСТ 27065–86	—	—
ГОСТ 29227–91	IDT	ИСО 835-1—81 «Посуда лабораторная стеклянная. Мерные пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования»***

Примечание — В настоящей таблице использованы следующие условные обозначения степени соответствия стандартов:

- IDT — идентичные стандарты;
- MOD — модифицированные стандарты;
- NEQ — неэквивалентные стандарты.

* Заменен на ИСО 1773:1997.

** Заменен на ИСО 4797:2004.

*** Заменен на ИСО 835:2007.

Библиография

[1] ИСО 10253:2006	*«Качество воды. Испытание на замедление роста морских водорослей Sceletonema costatum и Phaeodactylum tricornutum»*
(ISO 10253:2006)	*(«Water quality — Marine algal growth inhibition test with Sceletonema costatum and Phaeodactylum tricornutum»)*
*[2] ПНД Ф 12.1:2:2.2:2.3.2—03**	*«Отбор проб почв, грунтов, осадков биологических очистных сооружений, шламов промышленных сточных вод, донных отложений искусственно созданных водоемов, прудов-накопителей и гидротехнических сооружений». Экологический Центр аналитического контроля, М., 2003*
*[3] ПНД Ф 12.15.1—08**	*«Методические указания по отбору проб для анализа сточных вод». Утверждены ФГУ «Федеральный центр анализа и оценки техногенного воздействия» Ростехнадзора, от 18 апреля 2008 г.*
*[4] НВН 33—5.3.01—85**	*«Инструкция по отбору проб для анализа сточных вод». Утверждена приказом Минводхоза СССР от 13 июля 1985 г.*

* Действует до утверждения аналогичного национального стандарта.

УДК 63:544:632:006.354 ОКС 13.060.70 Н08 ОКП 01 3300

Ключевые слова: морская природная вода, сточная вода, вещества, отработанные буровые растворы, твердые промышленные отходы, донные отложения, водные вытяжки, водные растворы, морские водоросли, токсичность, испытание, тестирование

Редактор *Л. В. Коретникова*
Технический редактор *В. Н. Прусакова*
Корректор *Е. Ю. Митрофанова*
Компьютерная верстка *А. П. Финогеновой*

Сдано в набор 09.06.2011. Подписано в печать 26.07.2011. Формат 60×84 1/8. Бумага офсетная. Гарнитура Ариал. Печать офсетная. Усл. печ. л. 4,65. Уч.-изд. л. 4,15. Тираж 191 экз. Зак. 652.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru
Набрано и отпечатано в Калужской типографии стандартов, 248021 Калуга, ул. Московская, 256.

gost.e-ecolog.ru