ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ГОСТ Р 57166— 2016**

# ВОДА

## Определение токсичности по выживаемости пресноводных инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg

**Издание официальное**

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

## Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии» совместно с ООО «Протектор»

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 17 октября 2016 г. № 1414-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

*Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячном 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 (*gost.e-ecolog.ru

© Стандартинформ, 2016

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 . . . . . 1
3 Термины и определения . . . . . 2
4 Отбор проб . . . . . 3
5 Метод . . . . . 4
Приложение А (рекомендуемое) Примеры определения средней летальной концентрации (разбавления) . . . . . 14
Приложение Б (обязательное) Приготовление минеральной среды Лозина-Лозинского для культивирования *Paramecium caudatum* Ehrenberg . . . . . 17
Приложение В (обязательное) Культивирование и подготовка к тестированию тест-организмов . . 18
Приложение Г (рекомендуемое) Примеры приготовления анализируемых растворов веществ и разбавлений сточной воды . . . . . 20
Библиография . . . . . 22

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ВОДА**

# Определение токсичности по выживаемости пресноводных инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg

Water. Determination of toxicity by survival rate of freshwater infusoria *Paramecium caudatum* Ehrenberg

**Дата введения — 2018—01—01**

## 1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на природные пресные воды (поверхностные и подземные), дехлорированные питьевые воды (централизованных систем и нецентрализованного питьевого водоснабжения), сточные воды (в том числе очищенные) с минерализацией не более 3 г/дм$^3$, водные растворы веществ, буровые растворы, а также водные вытяжки донных отложений, твердых промышленных отходов, грунтов и почв, и устанавливает метод лабораторного биологического тестирования (далее — тестирования) для определения их токсичности с использованием пресноводных инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg (далее — тест-организмов) по выживаемости тест-организмов при тестировании в условиях переменного воздействия света и постоянной температуры.

Настоящий метод позволяет определять токсичность исследуемых объектов и следующие токсикологические показатели (относительно контрольной пробы):

- среднюю летальную кратность разбавления ($ЛКР_{50}$) пробы, вызывающую гибель 50 % тест-организмов, а также безвредную кратность разбавления пробы ($ЛКР_{10}$), вызывающую отклонение тест-параметра — выживаемости, за 6 или 96 ч не более 10 % относительно контрольной пробы;
- среднюю летальную концентрацию ($ЛК_{50}$) растворов веществ, вызывающую гибель 50 % тест-организмов, и безвредную концентрацию ($ЛК_{10}$) растворов веществ, вызывающую отклонение тест-параметра — выживаемости, за 6 или 96 ч не более 10 % относительно контрольной пробы.

Примечания

1 Определение острой токсичности на инфузориях *Paramecium caudatum* Ehrenberg проводят в течение 6 ч. При необходимости на указанных инфузориях можно также определять хроническую токсичность в течение 96 ч тестирования, при этом определяют $ЛКР_{50}$ за 96 ч, $ЛК_{50}$ за 96 ч, $ЛКР_{10}$ и $ЛК_{10}$ за 96 ч.

2 Тестирование должен выполнять обученный персонал.

В помещении лаборатории, где проводят тестирование:

- окружающая среда не должна содержать пара или пыли, токсичной для тест-организмов;
- температура окружающего воздуха должна быть (20 ± 2) ° С;
- относительная влажность воздуха должна быть не более 80 %;
- атмосферное давление должно быть 84—106 кПа (630—800 мм рт. ст.).

## 2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 17.1.5.01—80 Охрана природы. Гидросфера. Общие требования к отбору проб донных отложений водных объектов для анализа на загрязненность

ГОСТ 17.4.3.01—83 Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб

ГОСТ 17.4.4.02—84 Охрана природы. Почвы. Метод отбора и подготовки проб для химического, бактериологического и гельминтологического анализа

ГОСТ 112—78 Термометры метеорологические стеклянные. Технические условия

**Издание официальное**

ГОСТ 450—77 Кальций хлористый технический. 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 4201—79 Реактивы. Натрий углекислый кислый. Технические условия

ГОСТ 4209—77 Реактивы. Магний хлористый 6-водный. 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 4461—77 Реактивы. Кислота азотная. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

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

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 12071—2014 Грунты. Отбор, упаковка, транспортирование и хранение образцов

ГОСТ ИСО/МЭК 17025—2009 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

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 27753.1—88 Грунты тепличные. Методы отбора проб

ГОСТ 27753.2—88 Грунты тепличные. Метод приготовления водной вытяжки

ГОСТ 28168—89 Почвы. Отбор проб

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

ГОСТ 30416—2012 Грунты. Лабораторные испытания. Общие положения

ГОСТ 31861—2012 Вода. Общие требования к отбору проб

ГОСТ 32424—2013 Классификация опасности химической продукции по воздействию на окружающую среду. Основные положения

ГОСТ 32425—2013 Классификация опасности смесевой химической продукции по воздействию на окружающую среду

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

ГОСТ Р 54845—2011 Дрожжи хлебопекарные сушеные. Технические условия

ГОСТ Р 56237—2014 Вода питьевая. Отбор проб на станциях водоподготовки и в трубопроводных распределительных системах

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 ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять 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 **токсичность:** Свойство воды (водной вытяжки, раствора вещества), обусловленное наличием в ней токсических веществ, характеризующих способность воды нарушать жизнедеятельность тест-организмов.

3.2 **острая токсичность:** Токсичность (в частности, природной, сточной воды, водной вытяжки, раствора вещества), проявляющаяся при кратковременном воздействии исследуемых проб (например, для инфузорий — 6 ч).

3.3 **хроническая токсичность:** Токсичность (в частности, природной, сточной воды, водной вытяжки, раствора вещества), проявляющаяся при длительном воздействии исследуемых проб (например, для инфузорий — 96 ч.)

3.4 **диапазон реагирования тест-организмов:** Экспериментально определяемый интервал концентраций (разбавлений), в котором указывается ряд концентраций (разбавлений) от недействующей до летальной концентрации (разбавления) раствора вещества или водной вытяжки исследуемой пробы (например, для инфузорий $ЛК_{50}$ за 24 ч для двухромовокислого калия — от 100 до 300,0 мг/дм$^3$).

3.5 **токсический эффект:** Результат воздействия токсичного вещества (веществ) на тест-организм, проявляющийся в изменении показателей его жизнедеятельности (например, выживаемость, снижение численности клеток и т. д.).

3.6 **минеральная среда:** Смесь дистиллированной воды и веществ, которая используется для культивирования инфузорий и приготовления контрольной пробы (среда Лозина-Лозинского).

## 4 Отбор проб

4.1 Отбор проб природной, питьевой и сточной воды проводят в соответствии с требованиями ГОСТ 31861, ГОСТ Р 56237, [1], [2], [3], при этом объем пробы воды должен быть не менее 500 см$^3$.

Условия и сроки хранения отобранных проб — по ГОСТ 31861 и ГОСТ Р 56237.

Пробы, предназначенные для тестирования, должны быть, по возможности, после отбора обработаны без задержки, чтобы исключить изменения первоначального состава в результате физических и химических реакций или биологических процессов. Максимальная длительность хранения не должна превышать 12 ч при температуре окружающего воздуха не выше 25 °С.

Обычно рекомендуется охлаждение или заморозка образцов в том случае, когда нет возможности проводить испытания сразу после отбора проб.

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

Допускается хранение отобранных проб до проведения их тестирования не более 48 ч при температуре от 0 °С до 4 °С.

4.2 Отбор проб донных отложений проводят в соответствии с требованиями ГОСТ 17.1.5.01, при этом масса отобранной пробы должна быть не менее 2 кг.

Срок хранения проб донных отложений — не более 12 ч после их отбора до проведения тестирования при температуре окружающего воздуха не выше 25 °С.

Допускается хранение отобранных 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.

4.3 Отбор проб буровых растворов проводят в соответствии с требованиями технической документации предприятия, на котором образуются 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 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 буровых растворов к тестированию срок хранения не должен превышать 14 сут.

4.4 Отбор проб твердых промышленных отходов проводят в соответствии с требованиями технической документации предприятия, на котором образуется отход, при этом масса отобранной пробы должна быть 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.

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

4.6 Отбор проб грунтов проводят по ГОСТ 12071, ГОСТ 27753.1; почв — по ГОСТ 17.4.3.01, ГОСТ 17.4.4.02, ГОСТ 28168, [2], при этом масса отобранной пробы должна быть не менее 2 кг.

Срок хранения отобранных проб грунтов (почв) в емкостях с притертой или плотно закрытой крышкой при температуре от 0 °С до 4 °С — не более 7 сут.

4.7 Для отбора проб природной воды, буровых растворов, донных отложений используют емкости из полиэтилена, полиэтилентерефталата или политетрафторэтилена, а при наличии в воде нефтепродуктов, поверхностно-активных веществ и пестицидов — емкости из темного стекла.

Для отбора проб сточных вод, твердых промышленных отходов, грунтов и почв 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, полиэтилентерефталата, политетрафторэтилена или темного стекла.

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

4.9 Консервацию отобранных проб не проводят.

## 5 Метод

### 5.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в регистрации выживаемости пресноводных тест-организмов *Paramecium caudatum* Ehrenberg в анализируемой пробе исследуемого объекта относительно контрольной пробы, определении ее токсичности и токсикологических показателей при тестировании 6 или 96 ч.

Примечание — Испытания на острую токсичность веществ проводят в течение 24 ч тестирования, хроническую токсичность — 96 ч. Допускается увеличивать продолжительность тестирования веществ до 10—15 сут.

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

Климатостат, обеспечивающий поддержание температуры (25 ± 2) °С и белое люминесцентное освещение от 500 до 1000 лк.

Весы лабораторные неавтоматического действия по ГОСТ Р 53228, высокого класса точности, с пределом абсолютной допустимой погрешности ±0,1 мг, с максимальной нагрузкой не более 210 г.

pH-метр любого типа, обеспечивающий измерения pH в диапазоне от 3 до 10 ед. pH с пределом абсолютной допускаемой погрешности ±0,05 ед. pH.

Кондуктометр любого типа, обеспечивающий измерения удельной электрической проводимости дистиллированной (деионизированной) воды в диапазоне измерений от 0,1 до 99,9 мкСм/см, с пределом абсолютной допускаемой погрешности ±2,0 мкСм/см при 20 °С.

Оксиметр любого типа, обеспечивающий измерения в диапазоне от 0 до 19,9 мг · $O_2$/дм$^3$ (при температуре от 5 °С до 30 °С), с допускаемой погрешностью измерения содержания кислорода не более 0,5 мг · $O_2$/дм$^3$.

Термометр лабораторный по ГОСТ 112 диапазоном измерения температуры от 0 °С до 50 °С с ценой деления шкалы 0,5 °С.

Пипетки автоматические (дозаторы) любого типа вместимостью 0,1—0,2 см$^3$ с пределом допускаемой относительной погрешности измерений ±1,0 %.

Сито с отверстиями диаметром 1 мм.

Насос вакуумный, обеспечивающий разрежение не более 2660,5 Па (20 мм рт. ст).

Аквариумный микрокомпрессор с распылителем.

Пипетки вместимостью 1-2-1-1, 1-2-1-2, 1-2-1-5, 1-2-1-25 по ГОСТ 29227.

Пастеровские пипетки с укороченным концом для пересадки инфузорий.

Микропипетки вместимостью 0,1; 0,2 см$^3$ с ценой деления 0,01 см$^3$.

Колбы мерные 2-25-2, 2-50-2, 2-100-2, 2-1000-2 по ГОСТ 1770.

Колбы стеклянные (конические) лабораторные Кн-1-100-14/23 ТС, Кн-1-1000-14/23 ТС, Кн-1-2000-14/23 ТС по ГОСТ 25336.

Микроскоп биологический типа МБС, обеспечивающий увеличение в 50—100 раз.

Лампа люминесцентная с освещенностью в пределах от 500 до 1000 лк.

Мешалка магнитная.

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

Центрифуга лабораторная медицинская.

Сушильный электрический шкаф общелабораторного назначения.

Шпатели металлические по ГОСТ 19126.

Холодильник бытовой, обеспечивающий поддержание температуры от минус 18 °С до минус 20 °С и от плюс 2 °С до плюс 4 °С.

Ступки и пестики фарфоровые по ГОСТ 9147.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Фильтры обеззоленные «белая лента».

Фильтровальная установка любого типа.

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

Пробирки стеклянные П4-10-14/23 ХС по ГОСТ 25336.

Цилиндры 2-25-1, 2-50-1, 2-100-1, 2-1000-1 по ГОСТ 1770.

Чашки Петри вместимостью 25 и 50 $см^3$.

Микроаквариумы вместимостью на 4 $см^3$ (блок камер из оргстекла).

Стаканы стеклянные Н-2-50 ТХС, Н-2-100 ТХС, Н-2-500 ТХС, Н-2-1000 ТХС по ГОСТ 25336.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или деионизированная с удельной электрической проводимостью не более 10 мкСм/см при 20 °С (далее — дистиллированная вода).

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

Примечание — Срок годности двухромовокислого калия марки ч. д. а. — 1 год.

Минеральная среда Лозина-Лозинского (далее — среда для разбавления), приготовленная в соответствии с требованиями Б.1 (приложение Б), которая используется для культивирования тест-организмов и для разбавления анализируемых проб.

Примечание — Емкости, используемые для приготовления минеральной среды, должны быть изготовлены из стекла.

Тест-организмы: пресноводные инфузории вида *Paramecium caudatum* Ehrenberg. Культивирование и подготовка к тестированию тест-организмов — в соответствии с приложением В.

Кальций хлористый, безводный по ГОСТ 450, х. ч.

Магний хлористый по ГОСТ 4209, х. ч.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233, х. ч.

Натрий углекислый кислый по ГОСТ 4201, х. ч.

Калий хлористый по ГОСТ 4234, х. ч.

Кислота азотная по ГОСТ 4461, х. ч.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, х. ч.

Сухие пекарские дрожжи по ГОСТ Р 54845 для корма инфузорий.

Допускаются к использованию оборудование, материалы, реактивы с аналогичными характеристиками, разрешенные к применению для этих целей в установленном порядке.

### 5.3 Подготовка к тестированию

#### 5.3.1 Подготовка посуды

5.3.1.1 Емкости, используемые для отбора проб и тестирования, должны быть химически чистыми.

Посуду для отбора проб промывают смесью бихромата калия и серной кислоты (хромовой смесью). Стенки посуды осторожно смачивают хромовой смесью, после чего на 2 ч посуду оставляют, затем ее тщательно промывают водопроводной водой, нейтрализуют раствором пищевой соды и промывают 3—4 раза дистиллированной водой.

Для проведения тестирования используют стеклянную посуду. В качестве емкостей для тестирования допускается использовать микроаквариумы вместимостью 4 $см^3$ (блок-камер из органического стекла).

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 10 %-ным раствором углекислого кислого натрия, промывают водопроводной водой, после чего не менее трех раз ополаскивают дистиллированной водой.

Примечание — Для мытья микроаквариумов (из органического стекла) используют обычное хозяйственное мыло. Микроаквариумы тщательно моют мыльным раствором, затем промывают сначала водопроводной водой, а потом дистиллированной водой. Мыть микроаквариумы кислотой не рекомендуется, поскольку полированная поверхность микроаквариумов становится непрозрачной.

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

5.3.1.3 Емкости для отбора проб 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.

Химически чистая посуда для отбора проб и биотестирования хранится с закрытыми стеклянными притертыми пробками или завинчивающимися крышками в защищенных от пыли ящиках лабораторного стола или на закрытых полках, стеллажах и т. п. Срок хранения не ограничен.

**5.3.2 Проверка физиологической чувствительности тест-организмов**

Периодически (не реже одного раза в месяц), а также непосредственно перед тестированием, синхронизированную культуру (В.2.1, приложение В) суточных тест-организмов *Paramecium caudatum* Ehrenberg проверяют на физиологическую чувствительность. Для этого определяют среднюю летальную концентрацию $ЛК_{50}$ за 24 ч тестирования (24 ч $ЛК_{50}$) модельного токсиканта (двухромовокислого калия), как указано ниже.

5.3.2.1 Готовят исходный раствор модельного токсиканта массовой концентрацией 1 г/дм$^3$ следующим способом: в мерную колбу вместимостью 1000 см$^3$ вносят 1 г двухромовокислого калия и растворяют в небольшом количестве дистиллированной (деионизированной) воды (см. 5.2), затем доводят содержимое колбы до метки дистиллированной водой, тщательно перемешивают и маркируют. Срок хранения исходного раствора модельного токсиканта — не более 7 сут.

5.3.2.2 Готовят анализируемые растворы модельного токсиканта (двухромовокислого калия) заданной концентрации в следующей последовательности:

- приготавливают растворы модельного токсиканта двухромовокислого калия массовой концентрацией от 100,0 до 300,0 мг/дм$^3$ следующим способом:

в пять емкостей вместимостью более 50 см$^3$ мерным цилиндром вносят различные объемы минеральной среды Лозина-Лозинского (см. приложение Б) и исходного раствора двухромовокислого калия массовой концентрацией 1 г/дм$^3$ (см. 5.3.2.1) в соответствии с таблицей Г.1 приложения Г. При этом содержимое каждой емкости тщательно перемешивают. В каждой емкости массовая концентрация приготовленного раствора модельного токсиканта (двухромовокислого калия) составляет соответственно: 100,0; 150,0; 200,0; 250,0 и 300,0 мг/дм$^3$;

- для каждой приготовленной концентрации модельного токсиканта (двухромовокислого калия) готовят три емкости вместимостью 25 см$^3$ каждая и вносят анализируемые растворы следующим образом: в каждую емкость добавляют по 10 см$^3$ конкретного раствора модельного токсиканта (двухромовокислого калия), после чего помещают в них по 10 экземпляров тест-организмов.

Анализируемые водные растворы различных концентраций двухромовокислого калия и контрольной пробы готовят непосредственно перед определением физиологической чувствительности тест-организмов.

Для приготовления контрольной пробы используют минеральную среду Лозина-Лозинского (см. приложение В).

Для каждой концентрации анализируемых растворов двухромовокислого калия и контрольной пробы при тестировании используют не менее трех емкостей.

Пример приготовления анализируемых концентраций модельного токсиканта приведен в Г.1 (приложение Г).

5.3.2.3 Проверку физиологической чувствительности тест-организмов проводят аналогично тестированию анализируемых проб продолжительностью 24 ч (см. 5.4.3).

5.3.2.4 Подсчитывают число выживших тест-организмов аналогично подсчету тест-организмов по оценке токсичности анализируемых проб по 5.4.3.5 и определяют значение 24 ч $ЛК_{50}$ модельного токсиканта (двухромовокислого калия), при этом:

- если значение 24 ч $ЛК_{50}$ данного модельного токсиканта находится в диапазоне от 170,0 до 250,0 мг/дм$^3$, то считают, что подготовленные тест-организмы пригодны для тестирования;

- если значение 24 ч $ЛК_{50}$ данного модельного токсиканта не входит в указанный диапазон, то тогда считают, что подготовленные тест-организмы не пригодны для тестирования. Проверяют соблюдение правильности процедуры тестирования, условия подготовки тест-организмов к тестированию и, при необходимости, повторяют тестирование с использованием обновленной культуры инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg.

Пример определения значения 24 ч $ЛК_{50}$ модельного токсиканта приведен в А.1 приложения А.

Примечание — Значение 24 ч $ЛК_{50}$ раствора модельного токсиканта указывают в протоколе испытаний с датой определения данной токсикометрической характеристики, чтобы подтвердить соответствие физиологической чувствительности тест-организмов, использованных для получения представленных в протоколе результатов, требованиям настоящего стандарта.

5.3.2.5 Если по результатам тестирования не удалось получить конкретное значение 24 ч $ЛК_{50}$, то для определения 24 ч $ЛК_{50}$ модельного токсиканта получают результаты обработкой с применением метода математической статистики — пробит-анализ. Пример приведен в А.3 приложения А.

**5.3.3 Подготовка проб**

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

5.3.3.1 Подготовка исходных проб природной и питьевой воды

Отобранные пробы природной и питьевой воды непосредственно перед тестированием фильтруют через мембранные фильтры с порами диаметром 3,5 мкм или через обеззоленные фильтры «белая лента», после чего измеряют pH и содержание растворенного кислорода отфильтрованной пробы.

Не допускается для фильтрования использовать фильтр «синяя лента».

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

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 pH и концентрацию растворенного кислорода отфильтрованной пробы.

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

Из отобранных проб буровых растворов, твердых промышленных отходов, донных отложений, грунтов и почв, готовят водные вытяжки, затем измеряют pH и концентрацию растворенного кислорода отфильтрованной пробы.

**а) Подготовка водных вытяжек из проб буровых растворов**

Перед приготовлением водной вытяжки из пробы буровых растворов отобранную пробу тщательно перемешивают в смесителе со скоростью вращения 1000 об/мин в течение 5 мин и определяют pH бурового раствора. Пробу бурового раствора считают непригодной для тестирования, если:

- pH пробы бурового раствора выше 9,0 или ниже 6,0;
- на стенках сосуда с пробой бурового раствора появились черные пятна;
- проба бурового раствора имеет неприятный запах.

После перемешивания пробу бурового раствора смешивают с дистиллированной водой (см. 5.2) в соотношении 1:9 по объему и снова перемешивают с применением смесителя со скоростью вращения 1000 об/мин в течение 5 мин.

После окончания перемешивания смесь выдерживают при температуре (20 ± 5) °С в течение 1 ч, затем водную вытяжку над осадком осторожно переливают за один прием в другую 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 допускается консервация и хранение подготовленных водных вытяжек проб буровых растворов.

**б) 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 температуре (20 ± 5) °С до воздушно-сухого состояния в вытяжном шкафу или в хорошо проветриваемом помещении.

Водную вытяжку из высушенной пробы отходов готовят в соотношении 1:10 (твердые промышленные отходы и дистиллированная вода соответственно) следующим способом: в стеклянную емкость вместимостью 1000 $см^3$ вносят 50 г сухой массы пробы твердых промышленных отходов, добавляют 450 $см^3$ дистиллированной 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.

Примечания

1 Для приготовления 900 $см^3$ водной вытяжки обычно требуется 100 г сухой массы пробы отходов.

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

После окончания перемешивания емкость со смесью выдерживают при температуре от 0 °С до 4 °С в течение 12—14 ч, затем жидкость над осадком осторожно переливают в другую колбу, после чего используют ее для подготовки анализируемой пробы.

Примечание — Жидкие промышленные отходы, содержащие менее 1 % взвешенного вещества, не подвергаются выщелачиванию, а фильтруются через фильтр «синяя лента». Фильтрат подвергается тестированию. 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 0 °С до 4 °С не более 48 ч.

**в) 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 (стакан) и заливают дистиллированной водой (см. 5.2) в соотношении 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, а затем в течение 12—14 ч выдерживают при температуре от 2 °С до 4 °С. Затем водную вытяжку над осадком осторожно переливают в другую емкость и фильтруют, после чего используют для подготовки анализируемой пробы.

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

**г) Подготовка водных вытяжек из проб грунтов и почв**

Перед приготовлением водной вытяжки из проб грунтов и почв отобранную пробу грунтов подготавливают в соответствии с требованиями ГОСТ 30416, ГОСТ 27753.2, почв — ГОСТ 17.4.4.02.

Водную вытяжку из пробы грунта (почвы) готовят следующим способом: в емкость вместимостью 1000 $см^3$ вносят 50 г высушенной подготовленной пробы грунта (почвы), заливают дистиллированной водой в соотношении 1:4 по объему и перемешивают с использованием орбитального шейкера (или качалки-мешалки) в течение 2 ч.

После окончания перемешивания емкость со смесью выдерживают при температуре (20 ± 5) °С в течение 30 мин, затем водную вытяжку над осадком осторожно переливают в другую емкость и фильтруют.

Оставшуюся часть осадка в емкости встряхивают до взмучивания взвешенных частиц пробы и фильтруют через обеззоленные фильтры «белая лента» с применением вакуумного водяного (или электрического) насоса при вакууме не более 2666,5 Па (20 мм рт. ст.). При этом, если первые порции фильтрата будут мутными, то их несколько раз фильтруют через новый фильтр (обеззоленный фильтр «белая лента») до получения прозрачного раствора.

Полученные фильтраты объединяют, после чего используют для подготовки анализируемой пробы.

Примечание — При наличии повышенной мутности отфильтрованных водных вытяжек их выдерживают при температуре 0 °С—4 °С в течение 24 ч, затем водную вытяжку над осадком осторожно переливают в другую емкость, фильтруют и только после этого используют для приготовления анализируемой пробы.

Допускается хранение подготовленных водных вытяжек из грунтов (почв) при температуре от 0 °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 емкости путем растворения определенного количества исследуемой пробы вещества в определенном объеме дистиллированной 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 двое суток до 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 объем растворителя в 1 $дм^3$ анализируемой пробы не превышает 0,1 $см^3$, 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 рекомендован один из способов. Например, используют следующую процедуру: в мерную емкость вместимостью 100 $см^3$ вносят 0,1 г вещества, затем осторожно добавляют небольшое количество дистиллированной воды

(см. 5.2) и перемешивают до полного растворения вещества, затем содержимое емкости доводят до метки дистиллированной водой, снова перемешивают и маркируют. Перед тестированием приготовленный раствор выдерживают при температуре (20 ± 5) °С не менее 2 ч.

Измеряют pH 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) Значение водородного показателя pH от 6,5 до 7,5 ед. pH.

Если значение pH исходной пробы (раствора) выходит за указанные пределы, то регулируют pH пробы (добавляют раствор соляной кислоты молярной концентрации 1 моль/дм$^3$ или раствор гидроксида натрия молярной концентрации 1 моль/дм$^3$) так, чтобы добавленный объем не превышал 5 % существующего объема.

Если концентрация растворенного кислорода менее 40 % насыщения, то пробу аэрируют при помощи аквариумного компрессора не более 20 мин для стабилизации pH.

Примечание — Обычно тестирование проб должно выполняться без регулирования pH среды после добавления испытуемой пробы. Однако некоторые вещества могут оказывать токсическое действие на тест-организмы вследствие повышенной кислотности или щелочности. Для определения токсичности пробы, не зависящей от pH, регулируют значение pH исходной пробы (исходного раствора) до значения pH минеральной среды.

Для исходных проб природной и питьевой воды проводят тестирование при измеренных значениях pH.

Для исходных проб водных вытяжек из твердых промышленных отходов и других объектов исследования регулирование pH не допускается.

При необходимости допускается регулирование значений pH исходных растворов веществ и буровых растворов.

б) Температурный оптимум для тест-организмов находится в пределах от 24 °С до 28 °С.

в) Минерализация — менее 3,0 г/дм$^3$.

5.3.3.6 Подготовка анализируемых проб

Анализируемой пробой природной воды является подготовленная по 5.3.3.1 исходная проба природной воды.

Анализируемые пробы сточной воды для тестирования (см. 5.3.2.2) готовят согласно Г.2 (приложение Г).

Анализируемые пробы буровых растворов, твердых промышленных отходов, донных отложений, грунтов и почв для тестирования готовят из их водных вытяжек (см. 5.3.3.3) путем разбавления водных вытяжек минеральной средой Лозина-Лозинского, аналогично анализируемой пробе сточной воды (см. Г.2, приложение Г).

Анализируемые пробы вещества для тестирования готовят следующим способом: в емкости вместимостью 100 см$^3$ (для получения различных концентраций) вносят по 40 см$^3$ минеральной среды Лозина-Лозинского и рассчитанные объемы исходного раствора данного вещества (см. 5.3.3.4 и таблицу Г.1, приложение Г), отвечающие требованиям, установленным в 5.3.3.5.

5.3.3.7 Измеряют и регистрируют pH анализируемой пробы.

5.3.4 Подготовку тест-организмов к тестированию проводят в соответствии с требованиями В.2 (приложение В) с учетом требований 5.3.2.4.

### 5.4 Проведение тестирования

Тестирование проводят в два этапа: предварительное и окончательное.

Примечание — Тестирование проб природной и питьевой воды проводят без предварительного тестирования.

#### 5.4.1 Предварительное тестирование

Предварительное тестирование проводят для установления диапазона разбавлений (концентраций) проб, в пределах которого необходимо провести окончательное тестирование для определения значения 6 ч $ЛКР_{50}$ ($ЛКР_{50}$ за 96 ч) или 6 ч $ЛК_{50}$ ($ЛК_{50}$ за 96 ч) в зависимости от анализируемых проб.

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

При предварительном тестировании применяют не менее двух емкостей на каждую заданную кратность разбавления (концентрацию) анализируемой и контрольной проб и используют не менее 20 тест-организмов.

Процедура тестирования — по 5.4.3.

Пример проведения предварительного тестирования и установления диапазона концентраций вещества, в пределах которого необходимо проводить окончательное тестирование, приведен в А.2.1, приложение А.

**5.4.2 Окончательное тестирование**

По результатам предварительного тестирования (см. 5.4.1) выбирают диапазон разбавлений (концентраций) анализируемых проб для окончательного тестирования. При этом коэффициент между разбавлениями (концентрациями), как правило, 2,0 или 2,5.

Для окончательного тестирования используют не менее пяти разбавлений (концентраций) анализируемых проб, при этом кратность разбавления (концентрации) проб необходимо, по возможности, подбирать, основываясь на результатах предварительного тестирования, таким образом, чтобы обеспечить два уровня снижения выживаемости тест-организмов ниже и выше предполагаемого значения $ЛК_{50}$ ($ЛКР_{50}$).

Для окончательного тестирования применяют не менее трех емкостей на каждую заданную кратность разбавления (концентрацию) анализируемой и контрольной проб и используют не менее 30 тест-организмов.

Процедура тестирования — по 5.4.3.

Пример проведения окончательного тестирования и установление значения средней летальной концентрации 24 ч $ЛК_{50}$ для вещества приведен в А.2.2 (приложение А).

Примечание — Исходя из статистических данных, схема тестирования может быть изменена, например, уменьшено количество емкостей с анализируемыми пробами для каждого разбавления (концентрации) за счет увеличения количества тестируемых разбавлений (концентраций) пробы и сокращения коэффициента между разбавлениями (концентрациями) анализируемой пробы.

**5.4.3 Процедура тестирования**

5.4.3.1 В каждую емкость (см. 5.4.1 и 5.4.2) вместимостью 25 $см^3$ для каждой исследуемой концентрации анализируемой пробы (разбавления) вносят по 10 $см^3$ анализируемой пробы, затем в каждую емкость помещают по 10 шт. односуточных тест-организмов.

Примечание — Растворы концентраций веществ и разбавлений водных вытяжек объектов исследования готовят в емкостях вместимостью не менее 50 $см^3$. Затем каждый раствор заданной концентрации (разбавления) по 10 $см^3$ вносят в емкости вместимостью 25 $см^3$, при этом используют по три емкости для каждой концентрации вещества (разбавления водной вытяжки).

5.4.3.2 Для каждой анализируемой пробы (разбавлений, концентраций) подготавливают контрольную пробу следующим способом: в емкости вместимостью 25 $см^3$ вносят по 10 $см^3$ минеральной среды Лозина-Лозинского и помещают по 10 шт. односуточных тест-организмов. Для приготовления контрольной пробы используют столько же емкостей, как и для приготовления исследуемых концентраций (разбавлений).

Примечание — Плотность посадки тест-организмов при тестировании — 1 шт. на 1 $см^3$.

5.4.3.3 Емкости с анализируемыми и контрольными пробами, подготовленными по 5.4.3.1, 5.4.3.2, помещают в климатостат.

5.4.3.4 Тестирование проводят в течение 6 ч (при необходимости 96 ч) (см. 5.1) в климатостате при температуре (25 ± 2) °С и попеременном воздействии света и темноты:

- 16 ч — при равномерном белом освещении в диапазоне от 500 до 1000 лк на расстоянии 0,35 м от поверхности проб в емкостях;
- 8 ч — при отсутствии освещения.

5.4.3.5 Через 6 ч тестирования под микроскопом (увеличение не менее чем в 50—100 раз) подсчитывают количество выживших тест-организмов в каждой емкости (включая контрольную). Регистрируют только подвижных инфузорий, а неподвижно лежащих на дне емкости инфузорий пастеровской пипеткой удаляют. Если тестирование проводят в течение 96 ч, то подсчитывают выживших тест-организмов через каждые 24 ч (48, 72 и 96 ч).

Примечание

1 В процессе тестирования наблюдают за изменением движения, формы тела, пульсацией сократительной вакуоли тест-организмов.

2 Показателем гибели тест-организмов служит деформация тела, разрыв пелликулы, лизис клетки.

3 Острыми летальными концентрациями считают такие концентрации, в которых гибнут 50 % или все тест-организмы в течение 6 или 96 ч тестирования.

Средней летальной концентрацией (разбавлением) пробы ($ЛК_{50}$, $ЛКР_{50}$) при определении острой токсичности считают такую концентрацию (разбавление), при которой гибнут 50 % тест-организмов в течение 6 ч. Если за это время часть тест-организмов выживает, то тестирование продолжают при этой концентрации (разбавлении) в течение 96 ч и определяют хроническую токсичность. При этом оценку степени токсичности определяют по 5.5.4.

Примечание — Если проба сточной воды в течение 6 ч проявляет острую летальную токсичность ($ЛКР_{50}$) 50 % и более, то считают, что такая сточная вода опасна для биоценоза активного ила и может негативно повлиять на процессы очистки.

5.4.3.6 После окончания тестирования визуально осматривают в каждой емкости состояние тест-организмов. Любые обнаруженные отклонения регистрируют.

5.4.4 Результаты тестирования считают достоверными, если соблюдаются следующие условия:

а) гибель тест-организмов в контрольной пробе в конце тестирования не должна превышать 10 %;

б) $ЛК_{50}$ за 24 ч модельного токсиканта находится в пределах, указанных в 5.3.2.4.

Если условия а)—б) не соблюдаются, то находят причины несоответствия, устраняют их и тестирование повторяют с новой культурой тест-организмов.

### 5.5 Обработка результатов

5.5.1 По результатам тестирования (подсчета выживших инфузорий — см. 5.4.3.5) для каждого заданного разбавления (концентрации) анализируемой пробы, в том числе контрольной, рассчитывают среднеарифметическое значение выживших тест-организмов.

#### 5.5.2 Определение токсичности анализируемых проб

5.5.2.1 Токсичность анализируемых проб $A$, %, определяют по гибели тест-организмов для каждого заданного разбавления (концентрации) анализируемой пробы относительно контрольной пробы после 6 ч (или 96 ч) тестирования и рассчитывают по формуле

$$A = \frac{\bar{x}_к - \bar{x}_{ан}}{\bar{x}_к} 100, \quad (1)$$

где $\bar{x}_к$ — среднеарифметическое значение количества выживших тест-организмов в контрольной пробе, шт. (см. 5.5.1);

$\bar{x}_{ан}$ — среднеарифметическое значение количества выживших тест-организмов для каждого заданного разбавления (концентрации) анализируемой пробы, шт. (5.5.1).

#### 5.5.3 Определение средней летальной кратности разбавления (концентрации)

5.5.3.1 Для каждого заданного разбавления (концентрации) анализируемой пробы рассчитывают процент снижения выживаемости тест-организмов после 6 ч (при необходимости 96 ч) тестирования по отношению к выживаемости тест-организмов в контрольной пробе, используя полученные по 5.5.1 среднеарифметические значения и формулу (1).

По полученным значениям процентов снижения выживаемости тест-организмов определяют конкретное значение средней летальной кратности разбавления (концентрации) пробы, вызывающее 50 %-ное снижение выживаемости тест-организмов 6 ч $ЛКР_{50}$ (6 ч $ЛКР_{50}$ или 96 ч $ЛКР_{50}$) или 24 ч $ЛК_{50}$ (24 ч $ЛК_{50}$ или 96 ч $ЛК_{50}$) в зависимости от анализируемой пробы. Пример определения $ЛК_{50}$ приведен в А.2.2 приложения А.

При необходимости определяют:

- минимальную кратность разбавления (концентрацию) пробы, соответствующую 100 %-ной гибели тест-организмов за 6 ч (или 96 ч);

- максимальную кратность разбавления (концентрацию) пробы, соответствующую 0 %-ной гибели тест-организмов за 6 ч (или 96 ч).

5.5.3.2 Если по результатам, полученным по 5.5.3.1, не удалось определить конкретное значение средней летальной кратности разбавления (концентрации) пробы, вызывающей 50 %-ную гибель тест-организмов за 6 ч (или 96 ч), то для определения этого значения используют пробит-анализ.

Пример использования пробит-анализа приведен в А.3 (приложение А).

#### 5.5.4 Определение степени токсичности анализируемых проб

5.5.4.1 Если значение токсичности анализируемых проб, рассчитанное по формуле (1), составляет менее 10 %, то среднюю летальную кратность разбавления (летальную концентрацию) анализируемой пробы, при которой выживаемость тест-организмов снизилась относительно контрольной

пробы не более 10 % за 6 ч тестирования (или 96 ч), относят к безвредной кратности разбавления (безвредной концентрации).

5.5.4.2 Степень токсичности исследуемых объектов оценивают:

- природной и питьевой воды — по таблице 1;

Таблица 1 — Степень токсичности проб природной и питьевой воды

| Степень токсичности проб природной и питьевой воды | | Значение токсичности для проб природной и питьевой воды без разбавления А, % |
|---|---|---|
| общая | детализированная | |
| Токсичность отсутствует | Нетоксичная | До 10 включ. |
| Не обладает острой токсичностью | Слаботоксичная | Св. 10 до 25 включ. |
| | Малотоксичная | Св. 25 до 35 включ. |
| | Среднетоксичная | Св. 35 до 50 включ. |
| Обладает острой токсичностью | Высокотоксичная | Св. 50 до 100 включ. |

- донных отложений — по таблице 2;

Таблица 2 — Степень токсичности проб донных отложений

| Степень токсичности проб водных вытяжек донных отложений | | Значение токсичности для проб донных отложений *А*, % |
|---|---|---|
| общая | детализированная | |
| Токсичность отсутствует | Нетоксичная | До 10 включ. |
| Не обладает острой токсичностью | Слаботоксичная | Св. 10 до 35 включ. |
| | Среднетоксичная | Св. 35 до 50 включ. |
| Обладает острой токсичностью | Высокотоксичная | Св. 50 до 100 включ. |
| Примечание — При необходимости более детальной оценки токсичности загрязненных проб донных отложений степень токсичности определяют по значению средней летальной кратности разбавления (см. 5.5.3) 96 ч $ЛКР_{50}$, приведенному в таблице 3. | | |

- буровых растворов — по таблице 3;

Таблица 3 — Степень токсичности проб буровых растворов, загрязненности проб донных отложений

| Степень токсичности водных вытяжек проб буровых растворов (донных отложений) | Значение средней летальной кратности разбавления водных вытяжек проб буровых растворов (донных отложений) 96 ч $ЛКР_{50}$, разы |
|---|---|
| Нетоксичные | До 1,0 |
| Слаботоксичные | Менее 100 |
| Среднетоксичные | От 100 до 1000 |
| Высокотоксичные | От 1000 до 10000 |
| Гипертоксичные | От 10000 |

- водных растворов веществ — по таблице 4 (в том числе химической продукции, смесевой химической продукции — по ГОСТ 32424, ГОСТ 32425);

- сточной воды, твердых промышленных отходов, почв и грунтов по стандартам и другим нормативным документам, утвержденным в установленном порядке.

Примечание — Под нормативными документами следует понимать документы, устанавливающие критерии отнесения исследуемых объектов к классу опасности для окружающей природной среды, разработанные в целях реализации федеральных законов (технических регламентов) в данной области.

Таблица 4 — Степень токсичности водных растворов веществ

| Степень токсичности водных растворов веществ | Значение средней летальной концентрации вещества 24 ч $ЛК_{50}$, мг/дм$^3$ |
|---|---|
| Нетоксичные | Св. 1000 |
| Практически нетоксичные | От 1000 до 100 включ. |
| Слаботоксичные | Менее 100 до 10 включ. |
| Среднетоксичные | Менее 10 до 1,0 включ. |
| Высокотоксичные | Менее 1,0 до 0,01 включ. |
| Гипертоксичные | Менее 0,01 |

Примечание — При необходимости устанавливают класс опасности веществ по значению средней летальной концентрации 24 ч $ЛК_{50}$, приведенному в таблице 4 и по ГОСТ 32424.

### 5.6 Оформление результатов тестирования

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

а) ссылку на настоящий стандарт с указанием метода определения;

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

в) тест-организмы: род, вид, метод культивирования, возраст;

г) подробное описание тестирования:

- дату начала тестирования и продолжительность;
- для природной воды, сточных вод, водных вытяжек буровых растворов, твердых промышленных отходов, донных отложений, грунтов, почв — кратность разбавления, способ и продолжительность хранения проб. При необходимости, условия, в которых проводились отстаивание, фильтрование, а также размораживание пробы;
- для веществ — анализируемые концентрации, способ их приготовления;
- наименование и способ культивирования тест-организмов;
- значение pH анализируемых проб перед тестированием и после тестирования; сведения о регулировании pH проб (при необходимости);

д) токсичность исследуемого объекта с указанием степени токсичности и результатов определения токсичности, средней летальной кратности разбавления 6 ч (или 96 ч) $ЛКР_{50}$, средней летальной концентрации 6 ч (или 96 ч) $ЛК_{50}$ в зависимости от анализируемой пробы, метод расчета (при необходимости);

е) обнаруженные негативные эффекты (например, ненормальное вращение тест-организмов), а также другие обстоятельства и условия, не предусмотренные настоящим стандартом, способные повлиять на результат тестирования.

5.6.2 Значения 6 ч $ЛКР_{50}$ (96 ч $ЛКР_{50}$), 6 ч $ЛК_{50}$ (24 ч $ЛК_{50}$ или 96 ч $ЛК_{50}$) и диапазон разбавлений (концентраций) пробы, соответствующий 0 %-ной и 100 %-ной смертности выражают:

- в процентах (%) или в кратности разбавления (разы) — для природной воды, сточных вод и водных вытяжек;
- в миллиграммах на кубический дециметр (мг/дм$^3$) — для растворов веществ.

**Приложение А**
**(рекомендуемое)**

## Примеры определения средней летальной концентрации (разбавления)

### А.1 Пример определения 24 ч $ЛК_{50}$ модельного токсиканта

Результаты определения физиологической чувствительности суточных инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg в растворе модельного токсиканта двухромовокислого калия приведены в таблице А.1.

Таблица А.1

| Продолжительность тестирования, ч | Массовая концентрация раствора модельного токсиканта, мг/дм$^3$ | Количество выживших тест-организмов в емкостях, шт. | | | Среднеарифметическое значение количества выживших тест-организмов, шт. | Процент гибели тест-организмов, % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | № 1 | № 2 | № 3 | | |
| 24 | 0 (контрольная проба) | 10 | 10 | 10 | 10 | 0 |
| | 100,0 | 10 | 10 | 10 | 10 | 0 |
| | 150,0 | 10 | 8 | 9 | 9 | 10 |
| | 175,0 | 8 | 7 | 6 | 7 | 30 |
| | 200,0 | 5 | 4 | 6 | 5 | 50 |
| | 250,0 | 2 | 2 | 2 | 2 | 80 |
| | 300,0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 |

По результатам тестирования модельного токсиканта, приведенным в таблице А.1, гибель 50 % тест-организмов зарегистрирована в концентрации 200,0 мг/дм$^3$, которая входит в диапазон концентраций, указанный в 5.3.3.4 настоящего стандарта. Следовательно, тест-организмы пригодны для тестирования.

### А.2 Примеры определения средней летальной концентрации вещества при тестировании

А.2.1 Результаты проведения предварительного тестирования по 5.5.1 настоящего стандарта для выбора диапазона концентраций вещества, в пределах которого необходимо провести окончательное тестирование, приведены в таблице А.2.

Таблица А.2

| Продолжительность тестирования, ч | Массовая концентрация вещества, мг/дм$^3$ | Количество выживших тест-организмов в емкостях, шт. | | Среднеарифметическое значение количества выживших тест-организмов, шт. | Процент гибели тест-организмов, % |
|---|---|---|---|---|---|
| | | № 1 | № 2 | | |
| 24 | 0 (контрольная проба) | 10 | 10 | 10 | 0 |
| | 0,01 | 10 | 10 | 10 | 0 |
| | 0,1 | 10 | 10 | 10 | 0 |
| | 1,00 | 10 | 8 | 9 | 10 |
| | 10,0 | 1 | 1 | 1 | 90 |
| | 100,0 | 0 | 0 | 0 | 100 |

Из данных таблицы А.2 следует, что диапазон концентраций вещества, в пределах которого необходимо проводить окончательное тестирование, составляет от 1,0 до 10,0 мг/дм$^3$.

А.2.2 Результаты проведения окончательного тестирования по 5.5.2 настоящего стандарта приведены в таблице А.3.

Таблица А.3

| Продолжительность тестирования, ч | Массовая концентрация вещества, мг/дм$^3$ | Количество выживших тест-организмов в емкостях, шт. | | | Среднеарифметическое значение количества выживших тест-организмов, шт. | Процент гибели тест-организмов, % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | № 1 | № 2 | № 3 | | |
| 24 | 0 (контрольная проба) | 10 | 10 | 10 | 10 | 0 |
| | 1,0 | 8 | 10 | 9 | 9 | 10 |
| | 2,5 | 9 | 8 | 7 | 8 | 20 |
| | 5,0 | 6 | 4 | 5 | 5 | 50 |
| | 7,5 | 3 | 2 | 4 | 3 | 70 |
| | 10,0 | 0 | 1 | 2 | 1 | 90 |

Из данных таблицы А.3 видно, что 50 %-ной гибели тест-организмов соответствует массовая концентрация вещества, равная 5,0 мг/дм$^3$ при тестировании в течение 24 ч (24 ч $ЛК_{50}$).

Если значение массовой концентрации вещества, которое соответствует 50 %-ной гибели тест-организмов при тестировании в течение 24 ч, не зарегистрировано (см. таблицу А.4), то его определяют, используя для обработки результатов тестирования пробит-анализ аналогично А.3.

Таблица А.4

| Продолжительность тестирования, ч | Массовая концентрация вещества, мг/дм$^3$ | Количество выживших тест-организмов в емкостях, шт. | | | Среднеарифметическое значение количества выживших тест-организмов, шт. | Процент гибели тест-организмов, % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | № 1 | № 2 | № 3 | | |
| 24 | 0 (контрольная проба) | 10 | 10 | 10 | 10 | 0 |
| | 1,0 | 9 | 9 | 9 | 9 | 10 |
| | 2,5 | 8 | 9 | 7 | 8 | 20 |
| | 5,0 | 6 | 5 | 7 | 6 | 40 |
| | 7,5 | 3 | 2 | 4 | 3 | 70 |
| | 10,0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 90 |

### А.3 Примеры обработки результатов тестирования с использованием пробит-анализа

А.3.1 Если в результате тестирования не зарегистрировано конкретное значение средней эффективной кратности разбавления (концентрации) пробы, то результаты тестирования обрабатывают с применением метода математической статистики — пробит-анализа. Значения пробитов, соответствующие гибели тест-организмов в диапазоне от 0 % до 99 %, приведены в таблице А.5.

Таблица А.5

| Процент гибели тест-организмов, % | 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 |

*Окончание таблицы А.5*

| Процент гибели тест-организмов, % | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 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 |

А.3.2 Результаты тестирования по определению средней летальной кратности разбавления пробы на примере сточной воды приведены в таблице А.6.

Таблица А.6

| Кратность разбавления анализируемой пробы сточной воды С, % | Десятичный логарифм кратности разбавления (lg С) | Процент гибели тест-организмов, % | Значения пробитов по таблице А.5 |
|---|---|---|---|
| 3,12 | 0,494 | 0 | — |
| 6,25 | 0,796 | 0 | — |
| 12,50 | 1,097 | 10 | 3,72 |
| 25,00 | 1,398 | 45 | 4,87 |
| 50,00 | 1,699 | 70 | 5,52 |
| 100,00 | 2,000 | 95 | 6,64 |
| Примечание — Данные, приведенные в настоящей таблице, получены в результате тестирования анализируемой пробы сточной воды в течение 96 ч. | | | |

А.3.3 По значениям пробитов и десятичных логарифмов кратности разбавлений (см. таблицу А.6) строят график линейной зависимости, откладывая по оси абсцисс значения логарифмов кратности разбавлений анализируемой пробы, по оси ординат — значения пробитов.

Пример построения графика линейной зависимости значений пробитов от десятичного логарифма кратности разбавлений (lgC) на примере сточной воды приведен на рисунке А.1.

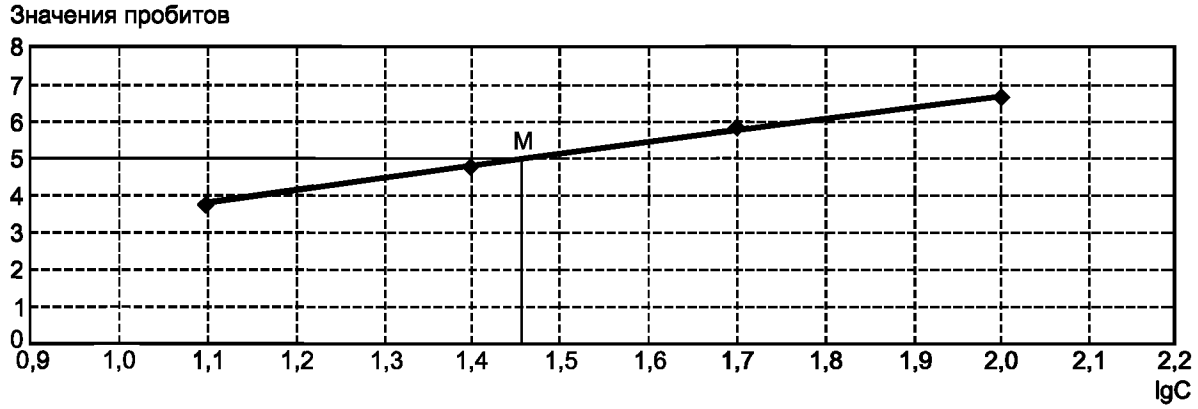


Рисунок А.1 — График линейной зависимости значений пробитов от десятичного логарифма кратности разбавлений анализируемой пробы сточной воды

А.3.4 На графике (см. рисунок А.1) на оси ординат из точки, соответствующей значению пробита пять, что определяет 50 %-ную гибель тест-организмов, 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, равное 1,45, соответствующее 96 ч $ЭКР_{50}$.

Используя таблицу антилогарифмов, определяют значение кратности разбавления 96 ч $ЭКР_{50}$, соответствующее 50 %-ной гибели тест-организмов за 96 ч, которое равно 28,18 %.

Примечание — Для количественной оценки токсичности и определения токсикологических показателей допускается применение пробит-анализа с использованием компьютерных программ.

**Приложение Б**
**(обязательное)**

## Приготовление минеральной среды Лозина-Лозинского для культивирования *Paramecium caudatum* Ehrenberg

### Б.1 Приготовление минеральной среды Лозина-Лозинского для тест-организмов

Для культивирования тест-организмов *Paramecium caudatum* Ehrenberg используют минеральную среду Лозина-Лозинского.

Исходные растворы № 1—№ 5 для приготовления минеральной среды Лозина-Лозинского готовят на дистиллированной воде из реактивов, вносимых в количествах, приведенных в таблице Б.1.

Исходные растворы хранят при температуре 0 °С—4 °С не более одного года.

Минеральную среду Лозина-Лозинского готовят следующим способом:

в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ вносят дистиллированную воду до метки, затем переливают в колбу вместимостью 2000 $см^3$ и добавляют по 1 $см^3$ исходных растворов № 1, № 2, № 3, № 4 и № 5 (см. таблицу Б.1), перемешивают, плотно закрывают ватно-марлевой пробкой. Содержимое колбы ставят на водяную баню и кипятят в течение 30 мин, после чего охлаждают в течение одних суток.

Таблица Б.1 — Состав минеральной среды Лозина-Лозинского

| Номер исходного раствора | Наименование реактива | Массовая концентрация реактива в исходном растворе, $мг/дм^3$ | Массовая концентрация реактива в питательной среде, $мг/дм^3$ |
|---|---|---|---|
| 1 | Натрий хлористый по ГОСТ 4233 (NaCl) | 100000 | 100,0 |
| 2 | Калий хлористый по ГОСТ 4234 (KCl) | 10000 | 10,0 |
| 3 | Кальций хлористый ($CaCl_2$) безводный | 10000 | 10,0 |
| 4 | Магний хлористый по ГОСТ 4209 ($MgCl_2$) | 10000 | 10,0 |
| 5 | Натрий углекислый кислый по ГОСТ 4201 ($NaHCO_3$) | 20000 | 20,0 |

Приготовленную минеральную среду Лозина-Лозинского хранят в условиях, исключающих воздействие света, при температуре (20 ± 5) °С не более одного года.

Минеральная среда должна иметь pH от 6,5 до 7,5.

Перед началом работы с инфузориями необходимо провести активную аэрацию среды (1 $дм^3$ аэрируют 30 мин) с помощью аквариумного микрокомпрессора с распылителем, который должен быть чистым и применяться только для этих целей. При отсутствии микрокомпрессора допускается проводить насыщение минеральной среды кислородом воздуха путем переливания среды за сутки до работы с инфузориями в плоскодонную колбу слоем не более 5 см.

**Приложение В**
**(обязательное)**

## Культивирование и подготовка к тестированию тест-организмов

### В.1 Условия культивирования тест-организмов. Общие требования

В.1.1 Исходный материал для культивирования тест-организмов *Paramecium caudatum* Ehrenberg получают в лабораториях, занимающихся тестированием, имеющих культуру требуемой видовой принадлежности (или из коллекций). Чувствительность культуры к модельному токсиканту двухромовокислому калию (5.3.2.4) должна соответствовать установленному в настоящем стандарте диапазону $ЛК_{50}$ за 24 ч.

Примечание — Тест-организмы — пресноводные инфузории *Paramecium caudatum* Ehrenberg допускается выделять из природных водоемов. Выделение культуры проводят следующим способом: банкой вместимостью 1 $дм^3$ у самого берега зачерпывают воду с илом и как можно быстрее под микроскопом (увеличение в 100 раз) просматривают пробы. Обнаруженных *Paramecium caudatum* Ehrenberg последовательно переносят в микроаквариумы объемом сначала со смесью среды пробы и культуры в соотношении 2:1, затем увеличивают содержание культуральной жидкости в микроаквариумах через каждый час и помещают в чистый минеральный раствор.

Для определения инфузорий используют «Определитель пресноводных беспозвоночных ... « (Мажейкайсте, 1977) [6].

Тест-организмы культивируют на минеральной среде Лозина-Лозинского и содержат в климатостате, инкубаторе или в помещении с регулируемой температурой (25 ± 2) °С.

При этом обеспечивают естественное или искусственное освещение так, чтобы соблюдались следующие периоды: 16 ч — воздействие света при освещенности 500—1000 лк, 8 ч — без воздействия света (в темноте).

Тест-организмы *Paramecium caudatum* Ehrenberg необходимо защищать от воздействия прямого солнечного света.

Тест-организмы и минеральная среда, в которой проводят их культивирование, должны содержаться в емкостях только из стекла.

Емкости, применяемые для культивирования тест-организмов, должны быть оснащены свободными или перфорированными крышками, чтобы уменьшить испарение, но обеспечить газообмен.

Емкости тщательно моют при каждой замене минеральной среды.

В качестве корма используют сухие пекарские дрожжи. Сухие пекарские дрожжи, предназначенные для кормления тест-организмов, хранят при комнатной температуре от 20 °С до 25 °С не более одного года.

Примечания

1 Тест-организмы — пресноводные инфузории *Paramecium caudatum* Ehrenberg имеют широкое географическое распространение, обладают коротким жизненным циклом и требуют минимум пространства и оборудования для культивирования и проведения тестирования. Тест-организмы могут культивироваться постоянно в лабораторных условиях.

2 Короткий жизненный цикл, быстрота размножения позволяют проследить реакцию на интоксикацию в относительно короткий срок в длинном ряду поколений. Используя принцип клонирования, можно получить большое количество генетически однородного материала.

3 Размножение инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg происходит путем продольного деления взрослого организма пополам в течение 1 суток. Темп деления инфузорий 1—2 шт. в сутки.

Для экспериментов используют клональные культуры инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg.

Клон выводят следующим способом: одну особь освобождают от посторонней микрофлоры путем последовательной пересадки через несколько микроаквариумов с минеральной средой и оставляют для размножения. Когда количество разделившихся инфузорий становится достаточным (30—40 шт.), их пересаживают в емкость со средой Лозина-Лозинского.

Полученную таким способом культуру инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg адаптируют к заданной температуре в течение 3—4 недель при температуре 24 °С—25 °С — в термостате, при 12 °С—13 °С и 4 °С—5 °С — в холодильниках.

Колебания температуры не должны превышать ±1 °С.

Для поддержания стандартных условий культивирования пользуются культурой в стационарной фазе роста.

В.1.2 Культивирование инфузорий проводят следующим способом: в чашку Петри вместимостью 50 $см^3$ с минеральной средой Лозина-Лозинского (объем среды 30 $см^3$) вносят 100 шт. инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg из маточной культуры и добавляют корм (одну гранулу сухих дрожжей на данный объем). Выращивают инфузории (при постоянной температуре (24 ± 2) °С и освещенности 500—1000 лк) в течение 3 сут. Через 3 сут, когда плотность инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg обычно достигает максимума, культуру инфузорий Пастеровской пипеткой пересаживают в чистую чашку Петри с минеральной средой Лозина-Лозинского в количестве 100 шт. на 30 $см^3$ и снова добавляют корм. Таким способом получают культуру инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg, предназначенную для культивирования. Культура инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg очень

долго находится в экспоненциальной фазе роста. Стационарная фаза достигается при культивировании свыше двух месяцев.

Примечание — Допускается проводить культивирование инфузорий в термобоксе, изготовленном из оргстекла, с помощью нагревательного элемента, термодатчика и терморегулятора, избегая попадания прямых солнечных лучей, или в термостате, но в этом случае необходимо установить маломощную лампу дневного света с реле времени, регулирующим освещение: 12 ч свет и 12 ч темнота.

### В.2 Подготовка к тестированию *Paramecium caudatum* Ehrenberg

#### В.2.1 Оборудование и процедура получения суточной культуры

Для тестирования используют суточную культуру инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg (синхронизированная культура), которую получают в лаборатории следующим способом:

- в чашку Петри вместимостью 50 см$^3$ с минеральной средой Лозина-Лозинского (объем 30 см$^3$) из емкости с маточной культурой помещают 100 шт. взрослых *особей Paramecium caudatum* Ehrenberg, кормят и выдерживают в течение 1 сут;
- через сутки молодь отбирают пастеровской пипеткой с укороченным концом и помещают в чистую чашку Петри с минеральной средой Лозина-Лозинского;
- затем односуточную (синхронизированную культуру) используют при тестировании.

Тестирование проб с испытуемыми тест-организмами проводят в чашках Петри вместимостью на 25 см$^3$ из стекла или в микроаквариумах (блок-камерах) с рабочим объемом 4 см$^3$ из органического стекла, при этом плотность посадки на объем 10 см$^3$ — 10 шт. тест-организмов, а на объем 4 см$^3$ — 5 шт.

Микроаквариумы из органического стекла представляют собой две склеенные между собой пластины размером 20—21 × 7—8 см. В верхней пластине толщиной примерно 1 см просверливают отверстия диаметром 3 см, нижняя пластина толщиной примерно 0,5 см служит дном. В блоке — 12 камер (лунок), которые расположены в два ряда по шесть в каждом. В каждую лунку вносят по 5 тест-организмов. Пять рядов используют для различных концентраций, а шестой — для контроля. Сверху микроаквариум закрывают стеклянной пластинкой соответствующего размера, что препятствует испарению раствора.

#### В.2.2 Регулирование плотности популяции

Как правило, нет необходимости регулировать плотность популяции тест-организмов при подготовке к тестированию.

#### В.2.3 Кормление

Суточные инфузории *Paramecium caudatum* Ehrenberg при тестировании не кормят.

### В.3 Условия культивирования маточной культуры *Paramecium caudatum* Ehrenberg

В.3.1 Для культивирования маточной культуры инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg удобны небольшие стеклянные емкости (например, чашки Петри) вместимостью 50 см$^3$, плотность посадки — 100 шт. особей на 30 см$^3$.

Появившуюся молодь в необходимом количестве отсаживают в отдельные емкости. Когда вновь появившиеся тест-организмы начинают размножаться, их снова пересаживают в чистые емкости с минеральной средой. Каждое поколение маркируют и на емкости ставят дату.

При культивировании и проведении тестирования необходимо поддерживать непрерывное размножение тест-организмов, учитывая особенности биологического цикла их развития.

Длительное культивирование тест-организмов в лабораторных условиях позволяет устанавливать пределы изменчивости основных биологических показателей в зависимости от сезона. В оптимальных условиях содержания выживаемость тест-организмов не зависит от времени года. Длительность культивирования тест-организмов в лаборатории в оптимальных условиях не влияет на результаты опытов.

Этот вид предпочитает альфа-мезосапробные условия. Температурный оптимум лежит в пределах 24 °С—28 °С и предпочитает pH, близкую к нейтральной 6,5—7,5 ед. pH.

#### В.3.2 Кормление

Для корма маточной культуры *Paramecium caudatum* Ehrenberg используют сухие активные гранулированные пекарские дрожжи по ГОСТ 28483 (в отличие от европейских — без консервантов), на которых происходит беспроблемное культивирование инфузорий.

Примечание — Указанные дрожжи выпускает завод, который находится в Новосибирске, — ЗАО Компания Проксима (тел. 3832 106-306, сайт в Интернете gost.e-ecolog.ru ожжи расфасованы в пакетики по 10 г, инструкция по хранению написана на пакете. Для культивирования инфузорий достаточно одного пакетика в год.

Указанные выше пекарские дрожжи, предназначенные для кормления тест-организмов, хранят в закрытой посуде при комнатной температуре от 20 °С до 25 °С. Вносят дрожжи в чашку Петри в очень небольшом количестве — по одной грануле.

Примечание — Можно в качестве корма для инфузорий использовать очищенный дробленый рис, при этом добавляют 3 зернышка в чашку Петри на объем 30 см$^3$ питательной среды.

Рекомендуется регулярно просматривать состояние маточной культуры *Paramecium caudatum* Ehrenberg, пересаживать на свежую минеральную среду и кормить через трое суток.

**Приложение Г**
**(рекомендуемое)**

## Примеры приготовления анализируемых растворов веществ и разбавлений сточной воды

### Г.1 Пример приготовления анализируемых растворов веществ

Г.1.1 Для приготовления исходного раствора вещества массовой концентрацией 1 г/дм$^3$ в мерную емкость вместимостью 100 см$^3$ помещают навеску 0,1 г вещества, добавляют немного дистиллированной воды, перемешивают до полного растворения, затем постепенно доливают до метки и тщательно перемешивают. Приготовленный исходный раствор маркируют и выдерживают при комнатной температуре 2 ч.

Г.1.2 Для приготовления анализируемых растворов вещества (например, стандартного раствора двухромовокислого калия массовой концентрации 100,0; 150,0; 200,0; 250,0 и 300,0 мг/дм$^3$) необходимо использовать минеральную среду Лозина-Лозинского (среда для разбавления) — см. таблицу Г.1.

Таблица Г.1 — Приготовление анализируемых концентраций вещества

| Концентрация вещества в анализируемом растворе, мг/дм$^3$ | Объем добавляемого исходного раствора вещества, см$^3$ | Объем добавляемой минеральной среды Лозина-Лозинского, см$^3$ | Объем анализируемой пробы, см$^3$ |
|---|---|---|---|
| Контрольная проба | — | — | 40 |
| Анализируемая проба (модельный токсикант) | | | |
| 100 | 4,0 | 36,0 | 40 |
| 150 | 6,0 | 34,0 | 40 |
| 200 | 8,0 | 32,0 | 40 |
| 250 | 10,0 | 30,0 | 40 |
| 300 | 12,0 | 28,0 | 40 |

Примечание — Общий объем для параллельных определений (повторностей) — 40 см$^3$.

### Г.2 Пример приготовления анализируемой пробы сточной воды

Г.2.1 Исходную сточную воду всегда принимают за 100 %.

Г.2.2 Для приготовления анализируемых разбавлений пробы сточной воды в качестве воды для разбавления необходимо использовать минеральную среду Лозина-Лозинского — см. таблицу Г.2.

Таблица Г.2 — Приготовление анализируемых разбавлений пробы сточной воды

| Соотношение сточной воды и воды для разбавления | Уровень разбавления, разы | Объем пробы сточной воды анализируемой пробы, см$^3$ | Объем минеральной среды для разбавления, см$^3$ |
|---|---|---|---|
| Контрольная проба | — | — | 50,0 |
| Анализируемая проба (сточная вода) | | | |
| 0 | 1 (неразбавленная) | 50,0 | — |
| 1:1 | 2 | 25,0 | 25,0 |
| 1:2 | 3 | 16,6 | 33,4 |
| 1:3 | 4 | 12,5 | 37,5 |
| 1:4 | 5 | 10,0 | 40,0 |
| 1:5 | 6 | 8,33 | 41,67 |
| 1:6 | 7 | 7,11 | 42,89 |
| 1:7 | 8 | 6,25 | 43,75 |
| 1:8 | 9 | 5,55 | 44,45 |
| 1:9 | 10 | 5,00 | 45,00 |

*Окончание таблицы Г.2*

| Соотношение сточной воды и воды для разбавления | Уровень разбавления, разы | Объем пробы сточной воды анализируемой пробы, $см^3$ | Объем минеральной среды для разбавления, $см^3$ |
|---|---|---|---|
| 1:99 | 100 | 0,50 | 49,50 |
| 1:999 | 1000 | 0,05 | 49,95 |

П р и м е ч а н и е — Общий объем для параллельных определений (повторностей) 50 $см^3$.

**Г.3 Процедура тестирования**

Тестирование проводят в соответствии с требованиями 5.4.3 настоящего стандарта.

**Г.4 Обработка результатов**

Обработка результатов — в соответствии с требованиями 5.5 настоящего стандарта.

## Библиография


[1] НВН 33-5.3.01—85* Инструкция по отбору проб для анализа сточных вод. Утверждена приказом Минводхоза СССР от 13 июля 1985 г.

[2] 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.

[3] 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

[4] Методические указания по разработке нормативов качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения, в том числе нормативов предельно допустимых концентраций вредных веществ в водах водных объектов рыбохозяйственного значения. Утверждено Приказом Росрыболовства от 04.08.2009 г. № 695. Зарегистрировано Минюстом России от 03.09.2009 г. № 14702

Москва: Издательство ВНИРО, 2011 г. — 201 с.

[5] Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов.

Утв. МПР России 27.04.2001 г.

Москва: Издательство РЭФИА, НИА—Природа, 2002 г. — 117 с.

[6] Мажейкайсте С.И. Класс ресничные инфузории Ciliata. — В кн. «Определитель пресноводных беспозвоночных Европейской части СССР» — Л., 1977, с. 46—97


* Действует в Российской Федерации.

** Действует до утверждения аналогичного межгосударственного стандарта.

УДК 63:544:632:006:354 ОКС 13.060.01 ОКП 01 3100
01 3300

Ключевые слова: природная вода, сточная вода, буровые растворы, твердые промышленные отходы, водные вытяжки объектов исследования, водные растворы веществ, испытание, пресноводные инфузории, инфузории *Paramecium caudatum* Ehrenberg, токсичность, тестирование

Редактор *С.Н. Назина*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.В. Бучная*
Компьютерная верстка *Л.А. Круговой*

Сдано в набор 21.10.2016. Подписано в печать 08.12.2016. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 3,26. Уч.-изд. л. 2,94. Тираж 37 экз. Зак. 3066.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта.

Издано и отпечатано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru