ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 57163— 2016

ВОДА

Определение токсичности по выживаемости односуточной молоди рыб *Poecilia reticulata* Peters в пресной и морской воде

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. № 1411-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 ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «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 2
3 Термины и определения 3
4 Отбор проб 3
5 Метод А. Определение токсичности по выживаемости односуточной молоди рыб *Poecilia reticulata* Peters в пресной воде (Cyprinodontiformes, Pisces) 4
6 Метод Б. Определение токсичности по выживаемости односуточной молоди рыб *Poecilia reticulata* Peters в морской воде (Cyprinodontiformes, Pisces) 14
Приложение А (рекомендуемое) Примеры определения средней летальной концентрации (разбавления) 16
Приложение Б (обязательное) Методы культивирования тест-организмов 20
Приложение В (рекомендуемое) Приготовление культивационной воды для выращивания *Poecilia reticulata* Peters (методы А и Б) 23
Приложение Г (рекомендуемое) Примеры приготовления анализируемых растворов веществ и разбавлений сточной воды 25
Библиография 27

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ВОДА

Определение токсичности по выживаемости односуточной молоди рыб *Poecilia reticulata* Peters в пресной и морской воде

Water. Determination of toxicity by survival rate of one-day young fish Poecilia reticulata Peters in fresh and marine water

Дата введения — 2018—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на природные пресные и морские воды, включая воды эстуариев, сточные воды (в том числе очищенные) с минерализацией от 0 до 33 г/дм^3, а также на водные вытяжки объектов исследования: буровые растворы, донные отложения, твердые промышленные отходы, грунты и водные растворы растворимых веществ.

Устанавливает определение, перечисленных выше объектов, токсичности по выживаемости односуточной молоди рыб вида *Poecilia reticulata* Peters (далее — тест-организмов) после лабораторного биологического тестирования (далее — тестирование) следующими методами:

- по выживаемости тест-организмов при тестировании в пресной воде в условиях переменного воздействия света и постоянной температуры (метод А);
- по выживаемости тест-организмов при тестировании в морской воде в условиях переменного воздействия света и постоянной температуры (метод Б).

Методы позволяют 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 96 ч тестирования не более 10 % от контрольных значений (методы А и Б);
- 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 96 ч тестирования не более 10 % от контрольных значений (методы А и Б);

При определении токсичности анализируемых объектов с минерализацией выше 20,0 г/дм^3 тестирование проводят после адаптации тест-организмов согласно Б.4.2 (приложение Б).

Примечания

1 Тестирование должен выполнять квалифицированный персонал.

2 Лица, выполняющие тестирование, должны иметь опыт лабораторной работы не менее 3-х лет.

3 Пользователь стандарта несет ответственность за обеспечение соответствующих требований стандарта при проведении тестирования.

В помещении лаборатории, где проводят тестирование:

- окружающая среда не должна содержать веществ, которые могут оказывать токсическое действие на тест-организмы;
- 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.);

Издание официальное

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 112—78 Термометры метеорологические стеклянные. Технические условия

ГОСТ 450—77 Кальций хлористый технический. Технические условия

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

ГОСТ 1770—74 (ИСО 1042—83, ИСО 4786—80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4166—76 Реактивы. Натрий сернокислый. 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 9656—75 Реактивы. Кислота борная. Технические условия

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 12071—2000 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 27753.2—88 Грунты тепличные. Метод приготовления водной вытяжки

ГОСТ 29227—91 (ИСО 835-1—1981) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть I. Общие требования

ГОСТ 30416—2012 Грунты. Лабораторные испытания. Общие положения

ГОСТ 31861—2012 Вода. Общие требования к отбору проб

ГОСТ 32294—2013 Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Определение острой токсичности для рыб на ранних стадиях развития

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

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

ГОСТ Р 51232—98 Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества

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

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:** Способность вещества, или суммарное количество веществ содержащихся в природной, сточной воде, водной вытяжке, вызывать нарушения физиологических функций организма, в результате чего возникают симптомы интоксикаций (заболевания), а при тяжелых поражениях — его гибель.

3.2 **острая токсичность:** Токсичность (в частности, природной, сточной воды, водной вытяжки, раствора вещества), проявляющаяся при кратковременном воздействии исследуемых проб, например для рыб — 96 ч.

3.3 **хроническая токсичность:** Токсичность (в частности, природной, сточной воды, водной вытяжки, раствора вещества), проявляющаяся при длительном воздействии исследуемых проб, например для рыб — 30 сут.

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 рыб $ЛК_{50}$ за 24 ч для двухромовокислого калия находится от 50 мг/дм^3 до 200,0 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 **контрольный раствор:** Культивационная вода, используемая для выращивания тест-организмов.

4 Отбор проб

4.1 Отбор проб природной и сточной воды проводят в соответствии с требованиями ГОСТ 31861, ГОСТ Р 56237, [1] и [2], при этом объем пробы воды должен быть не менее 30 дм^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 с тем, 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 массой не менее 5 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 двух месяцев при температуре минус 18 °С.

4.3 Отбор проб 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 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.

4.4 Отбор проб твердых промышленных отходов проводят в соответствии с требованиями технической документации предприятия, на котором образуется отход, массой не менее 5 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 водных растворов веществ, условия и сроки их хранения должны соответствовать требованиям стандартов и другой документации на конкретную продукцию (группу однородной продукции).

4.6 Отбор проб грунтов проводят по ГОСТ 12071, ГОСТ 27753, при этом масса отобранной пробы должна быть не менее 2 кг.

Срок хранения отобранных проб грунтов 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, отработанных 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 и грунтов 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 А. Определение токсичности по выживаемости односуточной молоди рыб *Poecilia reticulata* Peters в пресной воде (Cyprinodontiformes, Pisces)

5.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в регистрации выживаемости односуточной молоди рыб (тест-организмов) вида *Poecilia reticulata* Peters в анализируемой пробе исследуемого объекта относительно контрольной пробы, определении ее токсичности и токсикологических показателей при тестировании в пресной воде в течение 96 ч.

5.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы, материалы

Аквариальная (помещение) с регулируемой температурой, которое обеспечивает поддержание температуры (20 ± 2) °С и используют рассеянный свет, естественный световой период.

Примечание — Терморегулируемое помещение, поддерживающее температуру (25 ± 1) °С, является предпочтительным, так как оно позволяет быстрее уравновешивать тестируемые растворы и минимизировать изменения температуры во время приготовления растворов и переносе тест-организмов в растворы.

Термостатированные аквариумы из химически инертного материала и достаточной вместимостью (например, стеклянные аквариумы или из органического стекла) вместимостью 1, 3, 5, 10, 50 и 200 $дм^3$, обеспечивающие поддержание температуры (25 ± 1) °С.

Микрокомпрессор аквариумный АЭН.

Весы неавтоматического действия по ГОСТ Р 53228 высокого класса точности с пределом абсолютной допустимой погрешности ±0,1 мг, 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 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—78 с диапазоном измерения температуры от 0 °С до 50 °С с ценой деления шкалы 0,5 °С.

Прибор для измерения минерализации (солености) любого типа, обеспечивающий измерения в диапазоне от 0 до 100 г/дм^3, (например, карманный рефрактометр-солемер с автотермокомпенсацией) с допускаемой погрешностью измерения общей минерализации (солености) ± 1,0 г/дм^3.

Аквариумные водонагреватели с датчиками.

Колбы мерные 2-100-2, 2-500-2, 2-1000-2 по ГОСТ 1770.

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

Емкости для транспортировки и хранения проб воды вместимостью 5 дм^3.

Сачок для отлова рыбы.

Стеклянная палочка.

Сифоны.

Мешалка магнитная.

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

Шпатели металлические по ГОСТ 19126.

Сушильный электрический шкаф общелабораторного назначения.

Климатостат, обеспечивающий поддержание температуры (25 ± 1) °С.

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

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

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

Сито с отверстиями диаметром 1 мм.

Стеклянная палочка.

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

Вода питьевая по ГОСТ Р 51232.

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

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

Культивационная — вода для разбавлений.

Макроводоросли (например, риччия, сальвиния или роголистник темно-зеленый), используемые для приготовления культивационной воды и культивирования тест-организмов.

Тест-организмы: рыбы вида *Poecilia reticulata* Peters. Культивирование и подготовка к тестированию тест-организмов — приложение Б.

Кислота азотная по ГОСТ 4461, х. ч.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, х. ч.

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.

Посуда для отбора проб промывается смесью бихромата калия и серной кислоты (хромовой смесью). Стенки посуды осторожно смачиваются хромовой смесью, после чего на 2 ч посуда оставляется, затем она тщательно промывается водопроводной водой, нейтрализуется раствором пищевой соды и промывается 3—4 раза дистиллированной водой.

Для проведения тестирования используют аквариумы из стекла или из органического пластика (применяемого для пищевых продуктов).

Примечание — Емкости (аквариумы) для культивирования и тестирования тест-организмов моют, применяя моющие средства, не содержащие вредных химических веществ.

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 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 10 %-ным 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 защищенных от пыли ящиках лабораторного стола или на закрытых полках, стеллажах и т. д.

5.3.1.4 Мембранные фильтры перед применением должны быть промыты дистиллированной водой и стерилизованы кипячением в дистиллированной воде не менее 10 мин.

5.3.2 Проверка физиологической чувствительности тест-организмов для метода А

Периодически (не реже одного раза в месяц), синхронизированную молодь суточных тест-организмов проверяют на физиологическую чувствительность. Для этого определяют среднюю летальную концентрацию (24 ч $ЛК_{50}$) модельного токсиканта (двухромовокислого калия) в следующей последовательности:

5.3.2.1 Готовят исходный раствор модельного токсиканта массовой концентрацией 10 г/дм^3 следующим способом: в мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят 10 г двухромовокислого калия и растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды (см. 5.2), затем доводят содержимое емкости до метки дистиллированной водой, тщательно перемешивают и маркируют. Приготовленный исходный раствор выдерживают в течение 2 ч.

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 шесть различных растворов модельного токсиканта двухромовокислого калия с массовой концентрацией от 50,0 до 200,0 мг/дм^3 в соответствии с таблицей Г.1 приложения Г.

Каждой концентрации соответствует три емкости (повторности). При этом в каждой емкости массовая концентрация приготовленного раствора модельного токсиканта (двухромовокислого калия) составляет соответственно 50,0; 100,0; 125,0; 150,0; 175,0 и 200,0 мг/дм^3.

- Затем помещают в каждую емкость по 10 экз. суточных тест-организмов.

Примечание — Общее количество емкостей вместимостью более 5 дм^3 необходимых для выполнения проверки физиологической чувствительности тест-организмов составляет 21, включая контроль (три емкости). Общее количество односуточных мальков — 210 экз.

5.3.2.3 Проверку физиологической чувствительности тест-организмов проводят аналогично тестированию анализируемых проб объектов исследования по 5.5.3. Продолжительность тестирования 24 ч.

Для приготовления контрольной пробы используют культивационную воду по В.1 (приложение В), при этом используют не менее трех емкостей.

Анализируемые растворы двухромовокислого калия каждой концентрации готовят непосредственно перед определением физиологической чувствительности тест-организмов.

5.3.2.4 Подсчитывают число выживших тест-организмов аналогично подсчету тест-организмов по оценке токсичности анализируемых проб по 5.5.2 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 106,0 до 175,0 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 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 рыб *Poecilia reticulata* Peters.

Пример определения значения 24 ч $ЛК_{50}$ модельного токсиканта приведен в приложении А (пункт А.1).

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 используют пробит-анализ. Аналогичный пример приведен в А.3 приложении А.

5.3.3 Подготовка проб

Перед тестированием предварительно охлажденные или замороженные пробы доводят до температуры (20 ± 5) °С.

5.3.3.1 Подготовка исходных проб природной воды

Отобранные пробы пресной природной 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 кислорода отфильтрованной пробы.

Примечание — При подготовке исходных природных морских вод, а также вод эстуариев подготовку проб осуществляют согласно 5.3.3.1.

Объем пробы воды для определения токсичности должен быть не менее 30 $дм^3$.

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.

Объем пробы сточной воды для определения токсичности должен быть не менее 30 $дм^3$.

Примечание — При подготовке исходных проб сточных соленых вод, поступающих в морские водоемы, подготовку проб осуществляют согласно 5.3.3.2.

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

Из отобранных проб буровых растворов, твердых промышленных отходов, донных отложений и грунтов, готовят водные вытяжки, затем измеряют pH и концентрацию растворенного кислорода подготовленных водных вытяжек.

Примечание — Допускается при необходимости тестирование почв, при этом подготовка исходных проб аналогично вышеизложенной см. 5.3.3.3.

Объем пробы водной вытяжки для определения токсичности должен быть не менее 30 $дм^3$.

Примечание — При подготовке исходных проб буровых растворов, твердых промышленных отходов, поступающих в морские водоемы; донных отложений и грунтов, отобранных в морских водоемах подготовку проб осуществляют согласно 5.3.3.3.

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 не пригодной 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 жидкость над осадком (водную вытяжку бурового раствора) 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.

Примечание — Если тестируют буровые растворы, которые сбрасывают в морскую среду, то тогда водную вытяжку из них готовят на искусственной или природной морской воде (приложение В) соответствующей минерализации.

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 культивационная вода, соответственно) следующим способом:

В емкость вместимостью 1500 $см^3$ вносят 100 г сухой массы пробы твердых промышленных отходов, добавляют 1000 $см^3$ 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.

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

После окончания перемешивания смесь 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 и отходы, содержащие менее 1 % взвешенного материала, фильтруют через фильтр «синяя лента», а затем 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.

Примечание — Если тестируют твердые промышленные отходы, которые сбрасывают в морскую среду, то тогда водные вытяжки из них готовят на искусственной или природной морской воде (приложение В) соответствующей минерализации.

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 емкость 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 жидкость над осадком осторожно переливают в другую емкость и фильтруют, после чего используют для подготовки анализируемой пробы.

Объем водной вытяжки пробы для определения токсичности должен быть не менее 30 $дм^3$.

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

Примечание — При тестировании проб донных отложений, которые отбирались в морской среде, то тогда водные вытяжки из них готовят на искусственной или природной морской воде (приложение В) соответствующей минерализации (району исследования, откуда отбирались пробы).

г) Подготовка водных вытяжек из проб грунтов

Перед приготовлением водной вытяжки из пробы грунта отобранную пробу грунта подготавливают в соответствии с требованиями ГОСТ 30416, ГОСТ 27753.2.

Водную вытяжку из пробы грунта готовят следующим способом:

В стеклянную емкость вместимостью 1000 $см^3$ вносят 100 г высушенной подготовленной пробы грунта, заливают дистиллированной водой (см. 5.2) в соотношении 1:4 по объему и перемешивают с использованием орбитального шейкера (или качалки-мешалки) в течение 2 ч.

После окончания перемешивания смесь выдерживают при температуре (20 ± 5) °С в течение 30 мин, затем жидкость 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 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 жидкость над осадком осторожно переливают в другую емкость, фильтруют и только после этого используют для приготовления анализируемой пробы.

Объем водной вытяжки пробы для определения токсичности должен быть не менее 30 $дм^3$.

Допускается хранение подготовленных водных вытяжек из грунтов при температуре от 0 °С до 4 °С не более 72 ч.

Примечание — При тестировании проб грунтов, которые отбирались в морской среде, водные вытяжки из них готовят на искусственной или природной морской воде (приложение В) соответствующей минерализации.

5.3.3.4 Подготовка исходных растворов веществ

Исходные растворы веществ готовят в стеклянной мерной емкости путем растворения определенного количества исследуемой пробы вещества в определенном объеме дистиллированной воды.

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 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 невозможно рекомендовать какую-либо единую методику. Например, используют следующую процедуру: в мерную емкость вместимостью 1000 $см^3$ вносят 10 г вещества (или другое его количество, в зависимости от заданной концентрации раствора). Затем осторожно добавляют небольшое количество дистиллированной воды (см. 5.2) и перемешивают до полного растворения вещества. 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.

Примечание — При тестировании веществ, которые поступают в морские водоемы, исходные растворы данных веществ готовят на искусственной или природной морской воде (приложение В) соответствующей минерализации.

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 pH (7,0—8,3) ед. pH;

При тестировании проб природной и питьевой воды и других природных объектов, а также исходных растворов веществ регулирование значений pH не допускается.

При необходимости допускается регулирование значений pH исходных буровых растворов.

б) Концентрация растворенного кислорода не менее 4 $мг \cdot O_2/дм^3$.

Если концентрация растворенного кислорода исходной пробы менее указанного значения, то пробу аэрируют при помощи аквариумного компрессора.

в) Минерализация не выше 3,0 $г/дм^3$.

г) Жесткость от 2,8 до 4,0 мг-экв/л.

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. 5.3.3.2) готовят согласно Г.2 (приложение Г).

Анализируемые пробы буровых растворов, твердых промышленных отходов, донных отложений и грунтов для тестирования готовят из их водных вытяжек (см. 5.3.3.3) путем разбавления водных вытяжек культивационной водой по В.1 или В.2 (приложение В), аналогично анализируемой пробе сточной воды, см. Г.2 (приложение Г).

Анализируемые пробы веществ для тестирования готовят следующим способом: в емкости вместимостью не менее 5 дм^3 вносят по 5 дм^3 воды для разбавлений (см. таблицу Г.1) и исходного раствора вещества (см. 5.3.3.4 и таблицу Г.1, приложение Г), для получения заданных концентраций вещества, отвечающих требованиям, установленным в 5.3.3.5.

Примечание — При подготовке анализируемых проб (разбавлений, концентраций), предназначенных для тестирования в морской среде, исходные растворы веществ и водные вытяжки разбавляют искусственной или природной морской водой (приложение В) соответствующей минерализации.

5.3.3.7 Измеряют и регистрируют pH анализируемой пробы.

5.3.4 Подготовку тест-организмов к тестированию проводят в соответствии с требованиями Б.2 (приложение Б) с учетом требований 5.3.2.

5.4 Проведение тестирования

Тестирование проводят в два этапа: предварительное и окончательное.

Примечание — Тестирование проб природной 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 96 ч ЛКР$_{50}$ или 96 ч ЛК$_{50}$, 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 используют коэффициент 10 между разбавлениями (концентрациями).

При предварительном тестировании применяют не менее двух емкостей на каждую заданную кратность разбавления (концентрацию) анализируемой и контрольной пробы, при этом используют не менее 20 экземпляров 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 приложении А (А.3.1).

5.4.2 Окончательное тестирование

По результатам предварительного тестирования (см. 5.4.1) по установлению диапазона разбавлений (концентраций) подготавливают анализируемые пробы для окончательного тестирования аналогично подготовке анализируемых проб по 5.3.3.6 для тестирования, но с использованием коэффициента 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 пробы, при этом используют не менее 30 экземпляров тест-организмов.

Процедура тестирования — по 5.4.3.

Пример проведения окончательного тестирования и установления значения средней летальной концентрации 96 ч ЛК$_{50}$ для вещества приведен в приложение А (А.3.2).

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 вместимостью не менее 5 дм^3, вносят по 5 дм^3 анализируемой пробы (разбавлений, концентраций), затем в каждую емкость помещают по 10 шт. суточных тест-организмов.

5.4.3.2 Для каждой анализируемой пробы (разбавлений, концентраций) подготавливают контрольную пробу следующим способом: в емкости вместимостью не менее 5 дм^3 вносят по 5 дм^3 культивационной воды по В.1 (приложение В) и помещают по 10 шт. суточных тест-организмов.

При тестировании используют по три емкости для каждой концентрации вещества (разбавления водной вытяжки) и контрольной пробы.

Примечание — Плотность посадки тест-организмов — 1 шт. на 0,5 дм^3.

5.4.3.3 Тестирование проводят в течение 96 ч (см. 5.1) в аквариальной (помещении) при температуре (25 ± 2) °С и попеременном воздействии света и темноты:

- 16 ч — при равномерном белом освещении в диапазоне от 500 до 1000 лк,
- 8 ч — при отсутствии освещения.

5.4.3.4 Через каждые 24 ч тестирования подсчитывают количество выживших тест-организмов в каждой емкости (включая контрольную).

5.4.3.5 После окончания тестирования:

- измеряют pH в каждой емкости с анализируемой и контрольной пробой;
- измеряют количество растворенного кислорода в каждой емкости с анализируемой и контрольной пробой;
- 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 двухромовокислого калия 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 подсчета выживших тест-организмов для каждого заданного разбавления (концентрации) анализируемой пробы по трем емкостям, в том числе и трем контрольным, рассчитывают среднеарифметическое значение выживших тест-организмов.

5.5.2 Определение токсичности анализируемых проб

5.5.2.1 Токсичность анализируемых проб (А, %) определяют по гибели тест-организмов для каждого заданного разбавления (концентрации) анализируемой пробы, относительно контрольной пробы, после 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. (по 5.5.1);

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

5.5.3 Определение значения средней эффективной кратности разбавления (концентрации)

5.5.3.1 Для каждого заданного разбавления (концентрации) анализируемой пробы рассчитывают процент снижения выживаемости тест-организмов после 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 96 ч $ЛКР_{50}$ (96 ч $ЛК_{50}$). Пример определения $ЛКР_{50}$ приведен в А.3 (приложение А).

При необходимости определяют:

- минимальную кратность разбавления (концентрацию) пробы, соответствующую 100 %-ной гибели тест-организмов за 96 ч тестирования;
- максимальную кратность разбавления (концентрацию) пробы, соответствующую 0 %-ной гибели тест-организмов за 96 ч тестирования.

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

Пример использования пробит-анализа приведен в приложении 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 (среднюю летальную концентрацию) анализируемой пробы, при которой выживаемость тест-организмов снизилась относительно контрольной пробы не более 10 % за 96 ч тестирования, относят к безвредной кратности разбавления (безвредной концентрации).

5.5.4.2 Степень токсичности исследуемых объектов оценивают:

- природной воды — по таблице 1;
- донных отложений — по таблице 2;
- буровых растворов — по таблице 3;
- 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 нормативным документом 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 1 — Степень токсичности проб природной воды

Степень токсичности проб природной воды		Значение токсичности для проб природной 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.

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.		

Таблица 3 — Степень токсичности проб отработанных буровых растворов, загрязненных 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
Нетоксичная	1,0
Слаботоксичная	Менее 100

Окончание таблицы 3

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
Среднетоксичная	От 100 до 1000
Высокотоксичная	От 1000 до 10000
Гипертоксичная	Более 10000

Таблица 4 — Степень токсичности водных растворов веществ

Степень токсичности проб водных растворов веществ	Значение средней летальной концентрации проб вещества 96 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 химических веществ по значению средней летальной концентрации 96 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 указывают следующую информацию:

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 и грунтов — 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 96 ч $ЛКР_{50}$, средней летальной концентрации 96 ч $ЛК_{50}$, в зависимости от анализируемой пробы, метод расчета (при необходимости);

е) обнаруженные негативные эффекты (например, вялость, плавание по поверхности, ненормальное вращение), а также другие обстоятельства и условия, не предусмотренные настоящим стандартом, способные повлиять на результат тестирования.

5.6.2 Значения 96 ч $ЛКР_{50}$ (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.

6 Метод Б. Определение токсичности по выживаемости односуточной молоди рыб *Poecilia reticulata* Peters в морской воде (Cyprinodontiformes, Pisces)

6.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в регистрации выживаемости односуточной молоди рыб (тест-организмов) вида Poecilia reticulata Peters в анализируемой пробе исследуемого объекта относительно контрольной пробы, определении ее токсичности и токсикологических показателей при тестировании в морской воде в течение 96 ч.

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

Примечание — Методы культивирования *Poecilia reticulata* Peters приведены в приложении Б.

Культивационная вода, приготовленная в соответствии с требованиями, см. В.2 (приложение В).

Натрий хлористый по ГОСТ 4233.

Магний хлористый 6-водный по ГОСТ 4209.

Натрий сернокислый, безводный по ГОСТ 4166.

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

Калий хлористый по ГОСТ 4234, х. ч.

Натрий углекислый однозамещенный по ГОСТ 4201, х. ч.

Кислота борная по ГОСТ 9656, х. ч.

6.3 Отбор проб для тестирования — по п. 4.

6.4 Подготовка к тестированию — аналогично п. 5.3, с использованием культивационной воды по В.2 (приложение В) и тест-организмов — см. Б.2. (приложение Б).

Примечания

1 При тестировании проб водных вытяжек из объектов исследования: буровых отходов, донных отложений, твердых промышленных отходов, грунтов, сбрасываемых в морскую среду, — водные вытяжки из вышеуказанных проб готовят на природной (или искусственной) морской воде (приложение В) соответствующей минерализации (месту отбора пробы).

2 При тестировании проб веществ, поступающих в морскую среду, исходные растворы данных веществ готовят на природной (или искусственной) морской воде (приложение В) соответствующей минерализации.

6.5 Проверку физиологической чувствительности тест-организмов по отношению к модельному токсиканту (двухромовокислому калию) проводят по 5.3.2 в условиях тестирования по 6.5.1, используя культивационную воду, приготовленную по В.2 (приложение В). При этом используют данные, приведенные в таблице А.4 (приложение А), и соответствующие статистические методы математического анализа для определения 96 ч $ЛК_{50}$ модельного токсиканта. Значение 96 ч $ЛК_{50}$ модельного токсиканта должно находиться в пределах 45,0—60,0 мг/дм^3.

6.5.1 Условия проведения тестирования

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

а) Значение pH — (8,0—8,5) ед. pH.

При тестировании проб морской природной воды, воды эстуариев и других природных объектов, а также исходных растворов веществ регулирование значений pH не допускается.

При необходимости допускается регулирование значений pH исходных буровых растворов.

б) Содержание растворенного кислорода в воде не менее 4 мг · O_2/дм^3.

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

в) Минерализация — от 3 мг/дм^3 до 33 мг/дм^3.

Примечание — При тестировании проб морской воды, воды эстуариев и водных объектов минерализацией от 3 г/дм^3 до 20 г/дм^3 тест-организмы получают при условиях культивирования в пресной воде (или в воде минерализацией от 3 до 20 г/дм^3). Тест-организмы помещают в анализируемые растворы без адаптации к исследуемой минерализации пробы.

При тестировании проб морской воды, воды эстуариев и водных объектов минерализацией от 20 г/дм^3 до 33 г/дм^3 тест-организмы адаптируют по Б.4.2. (приложение Б).

6.6 Проведение тестирования

6.6.1 Проводят тестирование — по 5.4, с использованием тест-организмов, подготовленных по Б.2.1 и Б.4.2 (приложение Б) в течение 96 ч.

Пример проведения предварительного тестирования и установления диапазона концентраций вещества, в пределах которого необходимо проводить окончательное тестирование, приведен в А.3.1 приложения А.

6.6.2 Окончательное тестирование проводят с анализируемыми пробами, которые приготовлены с использованием коэффициента между разбавлениями (концентрациями) по 5.4.2.

Пример проведения окончательного тестирования для определения значения средней летальной концентрации 96 ч $ЛК_{50}$ приведен в А.3.2 приложения А.

6.6.3 Для приготовления контрольной пробы используют культивационную воду, приготовленную с использованием природной или искусственной морской воды по В.2 (приложение В).

6.6.4 При необходимости определяют 24 ч $ЛК_{50}$ (24 ч $ЛКР_{50}$), а также концентрации вещества (разбавлений), соответствующие 0 %-ной и 100 %-ной гибели тест-организмов за 96 ч.

6.7 Процедура тестирования — по 5.4.3 со следующими уточнениями:

6.7.1 В каждую емкость (см. 5.4.1 и 5.4.2) вместимостью не менее 5 $дм^3$ для каждой исследуемой концентрации анализируемой пробы (разбавления), приготовленной на культивационной воде по В.2, (приложение В), вносят по 5 $дм^3$ анализируемой пробы, затем в каждую емкость помещают по 10 шт. односуточных тест-организмов.

Примечания

1 Растворы концентраций веществ, природной морской воды и разбавлений водных вытяжек объектов исследования готовят в емкостях объемом не менее 5 $дм^3$. При этом используют по три емкости для каждой концентрации вещества (разбавления водной вытяжки) и контрольной пробы.

2 Плотность посадки тест-организмов — 1 шт. на 0,5 $дм^3$.

6.7.2 Для каждой анализируемой пробы (разбавлений, концентраций) подготавливают контрольную пробу следующим способом: в емкости вместимостью не менее 5 $дм^3$ вносят по 5 $дм^3$ культивационной воды по В.2 (приложение В) и помещают по 10 шт. односуточных тест-организмов.

6.7.3 Если для растворения или диспергирования вещества используют растворитель, то одновременно параллельно готовят контрольные емкости с контрольной пробой, содержащие воду для разбавлений и растворитель в максимальной используемой концентрации.

6.7.4 После тестирования и подсчета неподвижных тест-организмов измеряют в анализируемых и контрольных пробах концентрацию растворенного кислорода и pH. Если концентрация растворенного кислорода ниже 4 мг/$дм^3$, тестирование повторяют.

6.8 Обработка результатов — по 5.5.

6.9 Оформление результатов — по 5.6.

При этом результаты испытаний считают достоверными, если:

- гибель тест-организмов в контрольной пробе в конце тестирования менее или равна 10 %;
- 96 ч $ЛК_{50}$ модельного токсиканта калия двухромовокислого находится в пределах 45,0—60,0 мг/$дм^3$.

Приложение А
(рекомендуемое)

Примеры определения средней летальной концентрации (разбавления)

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

Результаты определения физиологической чувствительности суточных *Poecilia reticulata* Peters в растворе модельного токсиканта (двухромовокислый калий) 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)	10	10	10	10	0
	50,0	10	10	10	10	0
	100,0	9	9	9	9	10
	125,0	8	7	9	8	20
	150,0	7	5	6	6	40
	175,0	4	5	3	4	60
	200,0	1	1	1	1	90

По результатам тестирования, приведенным в таблице А.1, гибель 50 % тест-организмов не зарегистрирована. В этом случае для обработки результатов тестирования применяют пробит-анализ аналогично А.3.

Получают значение 24 ч $ЛК_{50}$ для указанного модельного токсиканта, равное 162,47 мг/дм^3, которое входит в диапазон концентраций, указанный в 5.3.2.4. Следовательно, используемые тест-организмы пригодны для тестирования.

А.2 Пример определения 96 ч $ЛК_{50}$ модельного токсиканта для метода Б

Результаты определения физиологической чувствительности суточных *Poecilia reticulata* Peters в растворе модельного токсиканта (двухромовокислый калий) приведены в таблице А.2.

Таблица А.2

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		
96	0 (контрольная)	10	10	10	10	0
	10,0	10	8	9	9	10
	25,0	8	7	6	7	30
	50,0	5	4	6	5	50
	75,0	2	1	3	2	80
	100,0	0	0	0	0	100

Из данных таблицы А.2 видно, что 50 %-ной гибели тест-организмов соответствует массовая концентрация вещества, равная 50,0 мг/дм^3, при тестировании в течение 96 ч (96 ч $ЛК_{50}$), которая входит в диапазон концентраций, указанный в 6.5 настоящего стандарта. Следовательно, используемые тест-организмы пригодны для тестирования.

А.3 Примеры определения средней летальной концентрации вещества при тестировании по методам А и Б

А.3.1 Результаты проведения предварительного тестирования по 5.4.1 настоящего стандарта для выбора диапазона концентраций вещества, в пределах которого необходимо провести окончательное тестирование, 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		
96	0 (контрольная)	10	10	10	0
	1,0	10	10	10	0
	10,00	9	9	9	10
	100,0	1	1	1	90
	1000,0	0	0	0	100

По результатам тестирования, приведенным в таблице А.3, следует, что диапазон концентраций вещества, в пределах которого необходимо проводить окончательное тестирование, составляет от 10,0 до 100 мг/дм^3.

А.3.2 Результаты проведения окончательного тестирования по 5.4.2 настоящего стандарта приведены в таблице А.4.

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		
96	0 (контрольная)	10	10	10	10	0
	10,0	8	10	9	9	10
	25,0	9	8	7	8	20
	50,0	6	7	8	7	30
	75,0	5	6	4	5	50
	100,0	1	1	1	1	90

По результатам тестирования, приведенным в таблице А.4, 50 %-ная гибель тест-организмов зарегистрирована в концентрации вещества, равный 75,0 мг/дм^3, при тестировании в течение 96 ч (96 ч $ЛК_{50}$).

Если значение массовой концентрации вещества, которое соответствует 50 %-ной гибели тест-организмов при тестировании в течение 96 ч, не зарегистрировано (см. таблицу А.5), то его определяют, используя для обработки результатов тестирования пробит-анализ аналогично А.4.

Таблица А.5

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		
96	0 (контрольная)	10	10	10	10	0

Окончание таблицы А.5

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		
96	10,0	10	10	10	10	0
	25,0	9	8	7	8	20
	50,0	5	6	7	6	40
	75,0	5	4	3	4	60
	100,0	1	1	1	1	90

А.4 Примеры обработки результатов тестирования с использованием пробит-анализа

А.4.1 Если в результате тестирования не зарегистрировано конкретное значение средней летальной 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.6.

Таблица А.6

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
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.4.2 Результаты тестирования по определению средней летальной кратности разбавления пробы на примере сточной воды приведены в таблице А.7.

Таблица А.7

Кратность разбавления анализируемой пробы сточной воды С, %	Десятичный логарифм кратности разбавления (lg С)	Процент гибели тест-организмов, %	Значения пробитов по таблице А.6
3,12	0,494	0	—
6,25	0,796	0	—
12,50	1,097	10	3,72
25,00	1,398	25	4,33
50,00	1,699	60	5,25
100,00	2,000	80	5,84
Примечание — Данные, приведенные в таблице А.7, получены в результате тестирования анализируемой пробы сточной воды по методу А в течение 96 ч.			

А.4.3 По значениям пробитов и десятичных логарифмов кратности разбавлений (см. таблицу А.7) 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.

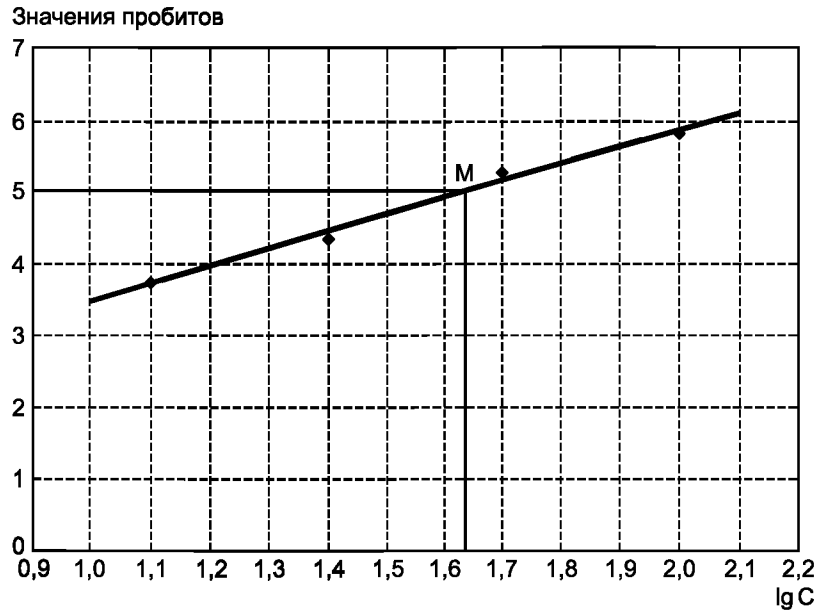

Рисунок А.1 — График линейной зависимости значений пробитов от десятичного логарифма кратности разбавлений анализируемой пробы сточной воды

А.4.4 На графике (см. рисунок А.1) на оси ординат из точки, соответствующей значению пробита пять, проводят прямую параллельно оси абцисс до пересечения с графиком. Из точки пересечения прямой с графиком (М) опускают перпендикуляр на ось абсцисс и получают значение lg С, равное 1,63, соответствующее 96 ч $ЛКР_{50}$.

Используя таблицу антилогарифмов, определяют значение кратности разбавления 96 ч $ЛКР_{50}$, соответствующее 50 %-ной гибели тест-организмов за 96 ч, которое равно 42,66 %.

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

Приложение Б
(обязательное)

Методы культивирования тест-организмов

Б.1 Условия культивирования тест-организмов. Общие требования

Б.1.1 Исходный материал для культивирования тест-организмов *Poecilia reticulata* Peters получают в лабораториях, занимающихся тестированием, имеющих рыб требуемой видовой принадлежности. Чувствительность суточной молоди (мальков), указанных выше рыб к модельному токсиканту должна соответствовать установленному в настоящем стандарте диапазону $ЛК_{50}$ за 24 ч (метод А) и за 96 ч (метод Б).

Тест-организмы культивируют в термостатированных аквариумах при температуре (25 ± 1) °С и содержат в помещении с регулируемой температурой (20 ± 2) °С. Плотность посадки тест-организмов из расчета 1—2 $дм^3$ культивационной воды на 1 экз., производителей — не менее 4 $дм^3$ на 1 экз.

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

Тест-организмы и культивационная вода, в которой проводят их культивирование, должны содержаться в емкостях (аквариумах) из химически инертного материала и достаточной вместимости (например, стеклянные аквариумы или из органического стекла).

Примечания

1 Тест-организмы — Аквариумные живородящие рыбки *Poecilia reticulata* Peters: 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. Выдерживают значительные колебания солености.

2 Развитие рыб проходит через две стадии (мальки и взрослые особи). Мальки рождаются совершенно сформированными. При температуре (25 ± 1) °С развитие мальков до взрослой стадии проходит через 4—6 мес.

Б.1.2 Вода для культивирования тест-организмов — по приложению В и 5.2 (далее — культивационная вода) должна соответствовать условиям тестирования см. В.1 (приложение В).

Б.1.3 Емкости тщательно моют при каждой замене культивационной воды.

Б.1.4 В качестве корма для производителей используют сухой корм (дафнии, циклопы) или живой корм (мотыль, трубочник, дафнии, циклопы).

Б.2 Условия подготовки к тестированию *Poecilia reticulata* Peters

Б.2.1 Процедура получения молоди для методов А и Б

Для тестирования используют суточных мальков *Poecilia reticulata* Peters (синхронизированная культура), которые получают в лаборатории от половозрелых самок.

Для получения молоди отбирают производителей не старше двух лет. Продолжительность жизни рыбок *Poecilia reticulata* Peters в аквариумных условиях 3—3,5 года. Необходимо учитывать, что однажды оплодотворенная самка может нереститься несколько раз.

Каждую новую партию половозрелых самок подбирают по возрасту из одного помета. Используют мальков после рождения при выживаемости не ниже 80 %, что определяет в дальнейшем физиологическую чувствительность тест-организмов суточных мальков *Poecilia reticulata* Peters.

Тест-организмы для тестирования получают следующим образом:

- в емкость (аквариум) вместимостью 20 $дм^3$ с культивационной водой из емкости с маточной культурой (накануне постановки опытов) отбирают производителей не старше двух лет для спаривания. Соотношение самцов и самок 2:1.

- через сутки после оплодотворения самку помещают в отдельную термостатированную нерестовую емкость объемом не менее 4 $дм^3$. В термостатированной нерестовой емкости самка находится примерно от трех до пяти суток, за указанное время в организме самки происходит эндогенное развитие мальков.

Готовность самки к вымету мальков определяют по наличию хорошо заметного темного пятна перед анальным плавником. При этом форма брюшка приближается к прямоугольной и оно становится намного шире спины.

Примечание — После окончания нереста самок изолируют, так как они поедают потомство.

Количество мальков, которое надо получить рассчитывают заранее. Например, для того чтобы получить для тестирования 210 экз. рыбок, готовят к оплодотворению не менее трех самок, исходя из того, что одна оплодотворенная самка в среднем выметывает не менее 75 шт. молоди.

- через одни сутки мальков, по мере их вымета в течение суток, отбирают трубочкой и помещают в чистую емкость с культивационной водой;

- затем суточных мальков (синхронизированную культуру) используют в эксперименте.

Процедура получения суточных тест-организмов (от оплодотворения самки, включая эндогенное развитие, до вымета мальков) занимает около семи суток.

Б.2.2 Регулирование плотности популяции

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

Предварительную адаптацию к культивационной воде тест-организмов (мальков) *Poecilia reticulata* Peters не проводят.

Б.2.3 Кормление

Суточных мальков *Poecilia reticulata* Peters при тестировании не кормят.

Б.3 Условия культивирования маточной культуры *Poecilia reticulata* Peters по методу А

Б.3.1 Для культивирования маточной культуры рыбок *Poecilia reticulata* Peters удобны емкости из стекла или полимерного материала, изготовленного без использования пластификатора (например, термостатируемые аквариумы, обеспечивающие температуру воды (25 ± 1) °С.

Плотность посадки тест-организмов из расчета 1—2 $дм^3$ культивационной воды на 1 экз., производителей — не менее 4 $дм^3$ на 1 экз. Перед посадкой рыб в емкости (аквариумы) с культивационной водой вышеуказанные емкости помещают растения без жестких, режущих кромок. Предпочтение следует отдавать густым мелколистным, обязательно плавающим растениям (риччия, сальвиния). Спереди или в центре аквариума должно быть свободное пространство для плавания.

Аквариумы освещают верхним светом не менее 8 ч в сутки. В качестве источника света используют обычные лампы дневного света.

Для содержания производителей используют питьевую воду по ГОСТ 2874, которую отстаивают на протяжении 7 сут. Воду аэрируют, фильтруют и термостатируют при температуре (25 ± 1) °С.

Культивационная вода должна соответствовать следующим требованиям:

- pH — (7,0—8,3) ед. pH;
- концентрация растворенного кислорода — не менее 4 мг · O_2/$дм^3$;
- температура (25 ± 1) °С;
- минерализация — не выше 3,0 г/$дм^3$;
- жесткость — от 2,8 до 4,0 мг-экв/л.

Один раз в месяц 1/3 часть культивационной воды заменяют на свежую. Добавляемая вода должна быть той же температуры, что и в аквариуме. Вместо испарившейся воды добавляют дистиллированную воду.

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

В оптимальных условиях содержания выживаемость тест-организмов не зависит от времени года. Средние значения плодовитости, подготовленной самки для вымета мальков, за одни сутки составляет от 25 шт. (первый помет) до 75 шт. (второй помет) мальков на одну самку. Длительность культивирования тест-организмов в лаборатории в оптимальных условиях даже в течение многих лет не влияет на результаты опытов.

Poecilia reticulata Peters хорошо переносит осолонение до 33 г/$дм^3$. При минерализации от 0 до 18—20 г/$дм^3$ особых трудностей с выращиванием и размножением *Poecilia reticulata* Peters не возникает. Для тестирования морских вод с более высокой минерализацией рыбок адаптируют (см. Б.4.2).

Б.4 Условия культивирования *Poecilia reticulata* Peters по методу Б.

Б.4.1 Для культивирования *Poecilia reticulata* Peters также используют термостатированные аквариумы, обеспечивающие плотность посадки тест-организмов из расчета 1—2 $дм^3$ культивационной воды на 1 экз., производителей — не менее 4 $дм^3$ на 1 экз.

При минерализации от 0 до 20 г/$дм^3$ особых трудностей с выращиванием и размножением *Poecilia reticulata* Peters не возникает. Для тестирования морских вод с более высокой минерализацией целесообразно получить исходный материал в пресной воде (или в воде с минерализацией от 3 до 20 г/$дм^3$) с последующей адаптацией к более высокой минерализации по Б.4.2.

Условия культивирования *Poecilia reticulata* Peters по методу Б соответствуют методу А (см. Б.3.1) со следующими уточнениями:

Аквариум заполняют отстоянной и аэрированной в течение 7 сут природной или искусственной морской водой необходимой минерализации, pH 8,0—8,5, температура 25 °С—27 °С. Каждые 3 сут часть воды (1/4—1/5 часть) заменяют свежей. Первоначальный объем в аквариумах поддерживают, доливая дистиллированную воду вместо испарившейся. При этом контролируют минерализацию с помощью солемера. Ил со дна аквариума убирают регулярно при помощи сифона.

Кроме рыб, в аквариум помещают зеленую водоросль рода энтероморфа, которая при хорошем освещении хорошо развивается и служит для *Poecilia reticulata* Peters укрытием и кормом.

Кормят *Poecilia reticulata* Peters 1—2 раза в сутки, производителей чаще сухим (дафнии, циклопы) или живым кормом (мотыль, трубочник, дафнии, циклопы). Корм вносят в таком количестве, чтобы рыбы съедали его без остатка за 3—5 мин, так как излишки приводят к ухудшению качества воды в аквариуме. Особенно осторожно следует кор-

мить рыб живыми дафниями и циклопами, которые в морской воде быстро погибают и могут служить источником сильного загрязнения.

Б.4.2 Адаптация *Poecilia reticulata* Peters к среде с повышенной минерализацией

При необходимости биотестирования проб воды или различных водных вытяжек из проб: буровых растворов, донных отложений, твердых промышленных отходов и грунтов с общим содержанием солей свыше 20 г/дм^3 выращивают культуру *Poecilia reticulata* Peters, адаптированную к повышенной минерализации среды. Для этого в культивационную воду по п. В.2 (приложение В), в которой культивируют *Poecilia reticulata* Peters, минерализация которой известна, постепенно порциями добавляют хлористый натрий или профессиональную морскую соль. В начале его вносят из расчета 3 г/дм^3. Затем постепенно через 2 сут минерализацию воды повышают на 3 г/дм^3 и повторяют каждые 2 сут до тех пор, пока содержание солей в среде не достигнет нужного уровня (с учетом начальной минерализации). В дальнейшем достигнутый уровень минерализации среды поддерживают постоянно.

Примечание — При тестировании проб веществ, которые поступают в морскую среду минерализацией свыше 20 г/дм^3 применяют также адаптированную культуру *Poecilia reticulata* Peters. При этом учитывают минерализацию воды акватории, где применяют данные вещества (например, при бурении на морском шельфе).

Постепенная адаптация к океанической минерализации (33 г/дм^3) занимает около двух недель.

Эта же среда служит контролем при тестировании и в качестве воды для разбавлений. Адаптированную культуру *Poecilia reticulata* Peters к данной минерализации нельзя использовать для тестирования вод с более низкой минерализацией.

Оптимальные значения культивационной воды pH составляет 7,0—8,0, однако временные изменения pH в пределах 5,8—9,0 не подавляют существенным образом жизнедеятельность тест-организмов.

Б.4.3 Кормление

Производителей *Poecilia reticulata* Peters кормят 3—5 раз (методы А и Б) в сутки живым кормом. Корм дают в таком количестве, чтобы рыбы съедали его без остатка за 3—5 мин.

Мальков рекомендуется кормить «пылью», состоящей из инфузорий, эвглен, коловраток, молоди ветвистоусых рачков и науплиусов веслоногих рачков.

При отсутствии «пыли» молодь *Poecilia reticulata* Peters можно кормить перетертой сухой дафнией или каким-либо другим сухим кормом. На 100 рыбок его необходимо не более 1 г в сут. По мере того как растут рыбки, в их рацион вводят резанный трубочник, мотыль, коретру и другие живые корма. Одно-двухнедельных мальков кормят 5 раз в сут., более взрослых — 2—3 раза.

Мальков сортируют, чтобы избежать неравномерного развития, и постепенно переводят из нерестовых емкостей в емкости сначала вместимостью 50 дм^3, а далее 200 дм^3. Аквариумы заполняют культивационной водой, как и для производителей.

Б.4.3.1 Контроль качества

Мальки *Poecilia reticulata* Peters в возрасте одних суток должны полностью соответствовать требованиям, которые предъявляются к тест-организмам полученным из лабораторных культур.

Для контроля их соответствия указанным требованиям, один раз в квартал и перед тестированием, проверяют чувствительность тест-организмов (односуточных мальков) *Poecilia reticulata* Peters, к модельному токсиканту (двухромовокислому калию). При этом 24 ч $ЛК_{50}$ должна быть в диапазоне от 109 до 175 мг/дм^3 (метод А) и 96 ч $ЛК_{50}$ должна быть в диапазоне 45—60 мг/дм^3 (метод Б).

Приложение В
(рекомендуемое)

Приготовление культивационной воды для выращивания *Poecilia reticulata* Peters (методы А и Б)

В.1 Приготовление культивационной воды (метод А)

Для приготовления культивационной воды используют питьевую воду по ГОСТ 2874, которую отстаивают в емкостях в течение 7 сут. Затем воду аэрируют, фильтруют и термостатируют при температуре (25 ± 1) °С.

Природную воду (поверхностную или грунтовую) или дехлорированную питьевую воду из-под крана используют для культивирования тест-организмов так и для разбавления анализируемых объектов, если тест-организмы выживают в ней на протяжении процессов культивирования, акклиматизации и тестирования, не показывая симптомы стресса. Приготовленную воду используют для культивирования и разбавления, если вода соответствует следующим требованиям:

- pH — от 7,0 до 8,0 ед. pH;
- жесткость от 2,8 до 4,0 мг-экв/л;
- концентрация растворенного кислорода не менее 4 мг O_2/дм^3;
- температура от 24 °С до 27 °С.

Воду в аквариумах аэрируют с помощью микрокомпрессоров. Еженедельно 1/3 объема воды в аквариуме меняют на свежую, температура которой не должна отличаться от таковой в аквариуме. Первоначальный объем воды в аквариумах поддерживают, доливая дистиллированную воду вместо испарившейся. Со дна аквариумов регулярно убирают сифоном ил.

Перед размещением рыб аквариумы засаживают мелколистными и плавающими растениями. Аквариумы освещают ярким верхним светом не менее 8 ч в сутки. Для этого используют электролампы накаливания или люминесцентные.

В.2 Приготовление культивационной воды (метод Б)

Для культивирования тест-организмов *Poecilia reticulata* Peters используют природную (из условно чистого района) или искусственную морскую воду необходимой солености, которую отстаивают в емкостях в течение 7 сут. Затем воду аэрируют, фильтруют и термостатируют при температуре (25 ± 2) °С.

Если в качестве воды для культивирования используют природную морскую воду, то ее отбирают вдали от берега с глубины 3—5 м, чтобы избежать поверхностного загрязнения, и транспортируют в лабораторию в стеклянных или полиэтиленовых емкостях. В лаборатории воду фильтруют через мембранный фильтр с порами диаметром 0,45 мкм, чтобы удалить находящиеся в ней взвешенные вещества и организмы, и хранят в темном месте при комнатной температуре.

Природную или искусственную морскую воду используют для культивирования тест-организмов так и для разбавления анализируемых объектов, если тест-организмы выживают в ней на протяжении процессов культивирования, акклиматизации и тестирования, не показывая симптомы стресса. Приготовленную воду используют для культивирования и разбавления, если вода соответствует следующим требованиям:

- pH — от 8,0 до 8,5 ед. pH;
- концентрация растворенного кислорода не менее 4 мг O_2/дм^3;
- температура (25 ± 2) °С;
- минерализация не более 33 мг/дм^3.

Примечание — Через каждые трое суток часть воды (1/4—1/5) заменяют свежей. Первоначальный объем воды в аквариумах поддерживают, доливая дистиллированную воду вместо испарившейся. При этом контролируют минерализацию с помощью солемера и регулярно убирают ил со дна аквариума при помощи сифона.

Кроме рыб, в аквариум помещают зеленую водоросль рода энтероморфа, которую при хорошем освещении хорошо развивается и служит для *Poecilia reticulata* Peters укрытием и кормом.

Искусственную морскую воду готовят на дистиллированной воде по ГОСТ 6709 из реактивов, вносимых в количествах, приведенных в таблице В.1.

Таблица В.1

Наименование реактива	*Масса реактива, вносимая на 1 дм^3 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*

Окончание таблицы В.1

Наименование реактива	*Масса реактива, вносимая на 1 дм^3 дистиллированной воды, г*
Натрий сернокислый по ГОСТ 4166 (Na_2SO_4), безводный	*3,70*
Кальций хлористый по ГОСТ 450 ($CaCl_2$), 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/дм^3 (33 %). При необходимости, для уменьшения минерализации (солености), искусственную морскую воду разбавляют дистиллированной водой.

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

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—8,5;
- содержание растворенного кислорода не менее 4 мг · O_2/дм^3;
- температура (25 ± 2) °С.

Искусственную морскую воду хранят в емкости из темного стекла с притертой крышкой (используют емкости до 20 дм^3) при комнатной температуре не более года.

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 (например, массовой концентрацией 10 г/дм^3) необходимо использовать только дистиллированную воду по 5.2. В мерную колбу объемом 1,0 дм^3 поместить навеску 10,0 г вещества, затем добавить немного дистиллированной воды и размешать до полного растворения, довести объем до метки и маркировать.

Г.1.2 Для приготовления анализируемых растворов вещества массовой концентрации 50,0; 100,0; 125,0; 150,0; 175,0 и 200,0 мг/дм^3 необходимо использовать культивационную воду (вода для разбавления) см. таблицу Г.1

Т а б л и ц а Г.1 — Приготовление анализируемых концентраций вещества

Концентрация вещества в анализируемом растворе, мг/дм^3	Объем добавляемого исходного раствора вещества, дм^3	Объем добавляемой воды для разбавления, дм^3	Объем анализируемой пробы, дм^3
Контрольная проба	—	—	5,0
Анализируемая проба (модельный токсикант)			
50,0	0,025	4,975	5,0
100,0	0,050	4,950	5,0
125,0	0,063	4,937	5,0
150,0	0,075	4,925	5,0
175,0	0,088	4,912	5,0
200,0	0,100	4,900	5,0

П р и м е ч а н и е — Общий объем для параллельных определений (повторностей) 15,0 дм^3.

Г.2 Пример приготовления анализируемых разбавлений сточной воды

Г.2.1 Исходная сточная вода всегда принимается за 100 %.

Г.2.2 Для приготовления анализируемых разбавлений сточной воды в качестве воды для разбавления необходимо использовать культивационную воду по таблице Г.2.

Т а б л и ц а Г.2. — Приготовление анализируемых разбавлений сточной воды

Соотношение сточной воды и воды для разбавления	Уровень разбавления, разы	Объем пробы сточной воды анализируемой пробы, дм^3	Объем среды для разбавления, дм^3
Контрольная проба	—	—	5,00
Анализируемая проба (сточная вода)			
0	1 (не разбавленная)	5,00	—
1 : 1	2	2,50	2,50
1 : 2	3	1,66	3,34
1 : 3	4	1,25	3,75
1 : 4	5	1,00	4,00
1 : 5	6	0,83	4,17
1 : 6	7	0,71	4,29
1 : 7	8	0,62	4,38
1 : 8	9	0,55	4,45

Окончание таблицы Г.2

Соотношение сточной воды и воды для разбавления	Уровень разбавления, разы	Объем пробы сточной воды анализируемой пробы, $дм^3$	Объем среды для разбавления, $дм^3$
1 : 9	10	0,50	4,50
1 : 99	100	0,05	4,95
1 : 999	1000	0,005	4,995

П р и м е ч а н и е — Общий объем для параллельных определений (повторностей) 15,0 $дм^3$.

Г.3 Процедура тестирования

Тестирование проводят в соответствии с требованиями 5.4.3.

Г.4 Обработка результатов

Обработка результатов в соответствии с требованиями 5.5.

Библиография

[1] 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.

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

* Действуют 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 пресная вода, сточная вода, природная морская вода, искусственная морская вода, буровые растворы, твердые промышленные отходы, водные вытяжки объектов исследования, водные растворы веществ, испытание, рыбы *Poecilia reticulata* Peters, токсичность, биологическое тестирование

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

Сдано в набор 21.10.2016. Подписано в печать 06.12.2016. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 3,72. Уч.-изд. л. 3,46. Тираж 33 экз. Зак. 3015.
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