ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ
В СФЕРЕ ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФБУ «Федеральный центр
анализа и оценки техногенного
воздействия»

В.В. Новиков

"10" октября 2014 г.

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ

МЕТОДИКА ИЗМЕРЕНИЙ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ КУЛЬТУРЫ ВОДОРОСЛИ ХЛОРЕЛЛА (*Chlorella vulgaris* Beijer) ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ПИТЬЕВЫХ, ПРЕСНЫХ ПРИРОДНЫХ И СТОЧНЫХ ВОД, ВОДНЫХ ВЫТЯЖЕК ИЗ ГРУНТОВ, ПОЧВ, ОСАДКОВ СТОЧНЫХ ВОД, ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА И ПОТРЕБЛЕНИЯ

ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04
Т 16.1:2:2.3:3.7-04

Методика допущена для целей государственного экологического контроля

МОСКВА
(издание 2014 г.)

gost.e-ecolog.ru

Право тиражирования и реализации принадлежит разработчику.

Методика рассмотрена и одобрена федеральным бюджетным учреждением «Федеральный центр анализа и оценки техногенного воздействия» (ФБУ «ФЦАО»).

Настоящее издание методики действует до выхода нового издания.

Заместитель директора ФБУ «ФЦАО» А.Б.Сучков

Разработчик:

ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет»
660041, Красноярск, пр. Свободный, 6
Телефон: (391)206-21-34
Факс: (391)244-86-25
E-mail: gr2897@gmail.com

Полное или частичное тиражирование, копирование и размещение в Интернете и на любых других носителях информации данных материалов без письменного разрешения разработчика преследуется по ст. 146 Уголовного Кодекса Российской Федерации.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Назначение и область применения методики 2
1 Принцип методики 2
2. Требования к показателям точности измерений 3
3. Оборудование, материалы, реактивы 4
3.1 Средства измерений 4
3.2 Вспомогательное оборудование 4
3.3 Тест-культура, реактивы и материалы 5
4. Условия безопасного проведения работ 6
5. Требования к квалификации лиц, проводящих биотестирование 6
6. Условия выполнения биотестирования 6
7. Подготовка к биотестированию 7
7.1. Подготовка посуды для отбора, хранения проб и биотестирования 7
7.2. Отбор, транспортировка и хранение водных проб 7
7.3. Подготовка водных проб к биотестированию 9
7.4. Отбор, транспортировка, хранение проб грунтов и почв 10
7.5. Приготовление водной вытяжки из грунтов и почв 11
7.6. Отбор, транспортировка и хранение проб осадков сточных вод, отходов производства и потребления 13
7.7. Приготовление водной вытяжки из осадков сточных вод, отходов производства и потребления 14
7.8. Приготовление разбавлений исследуемых вод и водных вытяжек для биотестирования 16
7.9. Приготовление тест-культуры водоросли 17
8. Проведение биотестирования 18
9. Получение результатов и их обработка 19
9.1. Снятие результатов токсикологического эксперимента 19
9.2. Величина токсичной кратности разбавления (ТКР) 20
10. Контроль погрешности методики токсикологического анализа 21
10.1. Контроль качества культуры водоросли хлорелла 21
10.2. Обработка (вычисление) результатов измерений (определений) 22
10.3. Оформление результатов измерений (определений) 22
10.4. Оценка приемлемости результатов, получаемых в условиях воспроизводимости 23
10.5. Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории 23
Список литературы 25
Приложение 1 27
Приложение 2 28
Приложение 3 30
Приложение 4 31
Приложение 5 32
Приложение 6 33
Приложение 7 34
Приложение 8 35

НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДИКИ

Настоящий документ устанавливает методику определения токсичности проб вод (поверхностных пресных, грунтовых, питьевых, сточных) и водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления по изменению оптической плотности тест-культуры зеленой протококковой водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) в лабораторных условиях. Оптическая плотность тест-культуры водоросли после 22 часов роста измеряется с помощью фотоэлектроколориметра.

1. ПРИНЦИП МЕТОДИКИ

Методика основана на регистрации различий в величине оптической плотности тест-культуры водоросли хлорелла, выращенной на среде, не содержащей токсических веществ (контроль) и в тестируемых пробах вод и водных вытяжек (опыт), в которых эти вещества могут присутствовать. Измерение оптической плотности суспензии водоросли позволяет оперативно контролировать изменение численности клеток в контрольном и опытном вариантах токсикологического эксперимента, проводимого в специализированном многокюветном культиваторе. Критерием токсичности воды является снижение на 20% и более (подавление роста) или увеличение на 30% и более (стимуляция роста) величины оптической плотности культуры водоросли, выращиваемой в течение 22 часов на тестируемой воде по сравнению с ее ростом на контрольной среде, приготовленной на дистиллированной воде.

В экспериментах по определению токсического действия устанавливают токсичную концентрацию отдельных веществ или токсичную кратность разбавления вод и водных вытяжек, вызывающих снижение на 20 % и более или увеличение на 30 % и более величины оптической плотности тест-культуры водоросли по сравнению с контролем за 22 часа световой экспозиции.

Контроль качества культуры водоросли хлорелла проводится один раз в квартал. Он осуществляется посредством определения ее чувствительности к «модельному» токсиканту – бихромату калия ($K_2Cr_2O_7$). При хорошем состоянии культуры водоросли и правильно поставленном эксперименте после 22 часов культивирования 50%-ное подавление прироста по сравнению с контролем должно наблюдаться в диапазоне концентраций бихромата калия (0,4–1,6) мг/дм^3. При этом оптическая плотность культуры водоросли в контрольном варианте за этот период должна достигнуть величины 0,15±0,03.

2. ТРЕБОВАНИЯ К ПОКАЗАТЕЛЯМ ТОЧНОСТИ ИЗМЕРЕНИЙ

При соблюдении всех регламентированных условий и проведении анализа в точном соответствии с данной методикой значения метрологических характеристик результатов измерений не превышают значений, приведенных в таблице 1.

Таблица 1

Диапазоны измерений определяемой характеристики, значения показателей повторяемости и воспроизводимости

Диапазон измерений оптической плотности культуры водоросли хлорелла, единицы оптической плотности	Показатель повторяемости (относительное среднее квадратическое отклонение результатов полученных, в условиях повторяемости), σ_r, %	Показатель воспроизводимости (относительное среднее квадратическое отклонение результатов полученных, в условиях воспроизводимости), σ_R, %	Предел повторяемости (относительное значение допускаемого расхождения между четырьмя результатами параллельных определений), r, %	Предел воспроизводимости (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами, полученными в условиях воспроизводимости), R, %
от 0,05 до 0,2 включ.	8	13	29	36

Значения пределов повторяемости и внутрилабораторной прецизионности методики используют при:

- оформлении результатов измерений, выдаваемых лабораторией;
- оценке качества проводимых лабораторией измерений;
- проверке приемлемости результатов единичных измерений при реализации методики в лаборатории.

3. ОБОРУДОВАНИЕ, МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ

Для проведения исследований по данной методике необходимы следующие средства измерений, материалы и реактивы:

3.1 Средства измерений

- фотоэлектроколориметр ИПС-03 (ТУ 4437-003-26218570-2006);
- термометр цифровой «Замер-1» (ТУ 4215-002-13245171-01) или аналогичный;
- мерный цилиндр на 25, 50 и 100 $см^3$ (ГОСТ 1770-74);
- весы лабораторные общего назначения (ГОСТ Р 53228-2008);
- гири (ГОСТ OIML R 111-1-2009);
- pH-метр электронный любого типа, например, pH-420 (ТУ 4215-008-81696414-2007);
- перестраиваемая автоматическая пипетка вместимостью 1–5 $см^3$ или стеклянные пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5 и 10 $см^3$ (ГОСТ 29227-91).

3.2 Вспомогательное оборудование

- многокюветный культиватор водорослей КВМ-05 (ТУ 3615-006-26218570-2007);
- культиватор КВ–05 (ТУ 3615-006-26218570-2007);
- центрифуга лабораторная с комплектом пробирок 50-100 $см^3$, скорость вращения ротора 4000-5000 об/мин;
- холодильник бытовой, обеспечивающий замораживание (-20 ± 1) °С и хранение проб (от +2 до +4) °С;
- аппарат универсальный для встряхивания жидкостей в колбах и пробирках АВУ-6С (ТУ 64-1-2451-78);
- сушильный шкаф, любого типа, обеспечивающий поддержание температуры в диапазоне от (+40) до (+200) °С;
- воронки лабораторные (ГОСТ 25336-82);
- воронка Бюхнера (ГОСТ 9147-80);
- стаканы стеклянные лабораторные вместимостью 100, 200, 250, 1000 $см^3$ (ГОСТ 25336-82);
- сита почвенные (ТУ 46-47-885-73);
- шпатели металлические (ГОСТ 19126-2007);
- пробоотборник объемом 500-700 $см^3$ (ГОСТ 6859-72);
- батометр-бутылка на штанге тип ГР-16М (ТУ 25-04-1749);
- буры почвенные (ГОСТ 27753.1-88);
- щупы винтообразные с продольным вырезом, поршневые (ГОСТ 2517-2012);
- ножи почвенные (ГОСТ 23707-95);
- лопаты (ГОСТ 19596-87);

- склянки и банки стеклянные с винтовым горлом, с прокладкой и крышкой или с притертой пробкой для отбора и хранения проб вместимостью 500, 1000, 2000, 5000 $см^3$ (ТУ 6-19-6-70);
- флаконы и банки цилиндрические полиэтиленовые или политетрафторэтановые с навинчивающимися крышками для отбора и хранения проб и реактивов вместимостью 100, 250, 500, 1000,2000 $см^3$ (ТУ 6-19-45).

3.3 Тест-культура, реактивы и материалы

- культура зеленой водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer, термофильный штамм, соответствующая критериям чувствительности к модельному токсиканту;
- вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72);
- калий двухромовокислый ХЧ или ЧДА (ГОСТ 4220-75);
- калий азотнокислый ХЧ или ЧДА (ГОСТ 4217-77);
- калий фосфорнокислый однозамещенный ХЧ или ЧДА (ГОСТ 4198-75);
- магний сернокислый 7-водный ХЧ или ЧДА (ГОСТ 4523-77);
- железо лимоннокислое Ч (ТУ 6-09-2562-77);
- кислота борная ХЧ (ГОСТ 9656-75);
- аммоний ванадиевокислый мета Ч или ЧДА (ГОСТ 9336-75);
- марганец хлористый Ч или ЧДА (ГОСТ 612-75);
- молибдена окись Ч (ТУ 6-09-4471-77);
- цинка сульфат 7-водный ХЧ или ЧДА (ГОСТ 4174-77);
- кислота соляная ХЧ или ЧДА (ГОСТ 3118-77);
- натрия гидрооксид ХЧ или ЧДА (ГОСТ 4328-77);
- фильтры бумажные обеззоленные «белая лента» (ТУ 6-09-1678-77, ГОСТ 12.026-76);
- фильтры мембранные с диаметром пор 0,45; 3,5 мкм «Владипор» марки МФАС-ОС-2 (ТУ 6-55-221-1029-89), МФАС-П-4 (ТУ 6-55-221-903-88) или аналогичные зарубежного производства;
- вата хлопковая медицинская гигроскопическая (ГОСТ 5556-81);
- бинт марлевый медицинский (ГОСТ 1172-93).

Примечание: *допускается использование средств измерений, вспомогательных устройств, реактивов и материалов другого типа, имеющиханалогичные метрологические и технические характеристики.*

4. УСЛОВИЯ БЕЗОПАСНОГО ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТ

При работе с химическими веществами, загрязненными грунтами, почвами, осадками сточных вод, отходами и сточными водами соблюдают требования техники безопасности по ГОСТ 12.1.007-76, ГОСТ 12.1.008-76.

При пробоподготовке загрязненных грунтов, почв, осадков сточных вод и отходов пользуются средствами индивидуальной защиты по ГОСТ 12.4.016-83, ГОСТ 12.4.020-82, ГОСТ 12.4.034-2001.

К воздуху производственных помещений предъявляют санитарно-гигиенические требования по ГОСТ 12.1.005-88.

Безопасность при работе с электроустановками обеспечивают по ГОСТ Р 12.1.019-2009 и в соответствии с требованиями инструкций к оборудованию.

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004-91, СНиП 21-01-97.

Рабочие столы и поверхности должны содержаться в чистоте. После завершения работ проводится влажная уборка рабочих поверхностей.

Работающий персонал должен пройти обучение безопасности труда по ГОСТ 12.0.004-90.

5. ТРЕБОВАНИЕ К КВАЛИФИКАЦИИ ЛИЦ, ПРОВОДЯЩИХ БИОТЕСТИРОВАНИЕ

К биотестированию допускаются специалисты, имеющие опыт работы в лаборатории, освоившие методические приемы водной токсикологии и уложившиеся в нормативы контроля при освоении методики.

6. УСЛОВИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Биотестирование проводят в нормальных лабораторных условиях. Помещение не должно содержать токсичных паров и газов.

Температура окружающего воздуха в лаборатории должна быть в пределах от +17 до +27 °С, атмосферное давление 84–106 кПа (630–800 мм.рт.ст.). Освещение помещения не ограничено особыми требованиями и может быть естественным или искусственным. К влажности помещения также не предъявляются особые требования.

7. ПОДГОТОВКА К БИОТЕСТИРОВАНИЮ

Перед началом работ по биотестированию необходимо подготовить посуду, пробоотборники, места хранения отобранных проб. Подготовительные процедуры должны исключать попадание токсичных, органических и других веществ из окружающей среды в тестируемую воду или в водные вытяжки из грунтов, почв, осадков сточных вод и отходов.

7.1. Подготовка посуды для отбора, хранения проб и биотестирования

Отбор проб воды обычно производится в посуду из пластика, либо в банки из темного стекла в случае, если в воде содержатся нефтепродукты, моющие средства или пестициды.

Отбор проб грунтов, почв, осадков сточных вод и отходов следует производить в банки из темного стекла.

Посуда для отбора проб и биотестирования должна быть химически чистой. Ее промывают 10 %-ным раствором азотной кислоты. Стенки посуды сначала смачивают этим раствором, после этого оставляют на 2-3 часа и затем тщательно промывают водопроводной водой. Возможные остатки кислоты нейтрализуют раствором пищевой соды, в заключении посуду 3-4 раза промывают дистиллированной водой. Сильно загрязненную посуду, а также новую посуду промывают водой, затем заполняют 10 %-ным раствором азотной кислоты и выдерживают не менее суток. После этого ее промывают раствором соды, водопроводной и несколько раз дистиллированной водой. Не следует использовать для мытья посуды хромовую смесь, синтетические поверхностно-активные вещества и органические растворители. Для сушки и стерилизации посуду, кроме мерной, помещают на один час в сушильный шкаф при 160±5°С. Если емкости могут разрушаться при температуре 160 °С, то их стерилизуют в паровом стерилизаторе при температуре 121 ± 2 °С (10^5 Па) в течение 20 мин.

7.2. Отбор, транспортировка и хранение водных проб

Общие процедуры отбора проб вод, а также требования к устройствам для пробоотбора, определены в следующих нормативных документах (если условия, указанные в данных документах, противоречат требованиям настоящей методики, следует руководствоваться последней):

- ГОСТ 31861-2012 «Вода. Общие требования к отбору проб»;
- ГОСТ 31862-2012 «Вода питьевая. Отбор проб»;
- ГОСТ 17.1.5.05-85 «Охрана природы. Гидросфера. Общие требования к отбору проб поверхностных и морских вод, льда и атмосферных осадков»;
- ГОСТ 17.1.5.04-81 «Охрана природы. Гидросфера. Приборы и устройства для отбора, первичной обработки и хранения проб природных вод. Общие технические условия»;
- Р 52.24.353-2012 «Отбор проб поверхностных вод суши и очищенных сточных вод»;

– ПНД Ф 12.15.1-08 «Методические указания по отбору проб для анализа сточных вод».

Место отбора проб и периодичность отбора устанавливают в соответствии с программой исследования в зависимости от водного объекта (ГОСТ 31861-2012).

В зависимости от задач исследования определяют тип пробы: точечная, составная или другая в соответствии с ГОСТ 31861-2012.

Для проведения токсикологического анализа объем взятой пробы должен составлять не менее 500 $см^3$.

Способы отбора, транспортировки, хранения, подготовки к выполнению биотестирования должны обеспечить неизменность состава проб в период между отбором проб и их анализом.

Пробы отбирают вручную специальными приспособлениями или с применением автоматических пробоотборников, при этом емкости для проб должны быть изготовлены из нетоксичного материала, легко выниматься из пробоотборника для очистки и мытья.

При отборе пробы с поверхности водоема или водотока используют стеклянную или полиэтиленовую бутыль (Р 52.24.353-2012).

Для отбора глубинных проб воды из озер, водохранилищ, прудов и рек следует использовать батометры.

Отбор проб питьевых вод перед поступлением в распределительную сеть осуществляется из кранов на водоводах, расположенных на входе в установку обеззараживания. Пробы воды распределительной сети отбирают в периоды наибольшего расхода воды (ГОСТ 31862-2012).

Водопроводную воду отбирают из-под крана после интенсивного слива, многократно ополоснув его отбираемой водой. Кран антисептической обработке не подвергается.

Отбор сточных вод следует производить в местах наибольшего перемешивания в той части потока, где взвешенные частицы распределены более равномерно. Очищенные сточные воды необходимо отбирать до их хлорирования.

Для проведения анализа сточных вод на токсичность предпочтительно отбирать составную среднесуточную пробу, собирая ее порциями с периодичностью один час. Точечные (разовые) пробы допустимо использовать только в исключительных случаях.

Пробы, предназначенные для исследования на токсичность, нельзя подвергать консервированию. Отобранные пробы наливают до краев в дважды промытые отбираемой водой банки или флаконы и закрывают без пузырьков воздуха пришлифованными стеклянными пробками или полиэтиленовыми крышками. Пробы упаковывают в деревянные ящики для переноски проб и прокладывают бумагой или ветошью. В жаркую погоду пробы для обеспечения лучшей сохранности рекомендуется транспортировать в контейнерах-холодильниках при пониженных положительных температурах. Зимой для предохранения проб от промерзания контейнеры должны быть оборудованы термоизолирующими про-

кладками. Следует избегать попадания прямого солнечного света на транспортируемые пробы.

При отборе пробы заполняют акт (Приложение 1), в котором отмечают:

- шифр пробы;
- цель пробоотбора;
- дату;
- время;
- место отбора пробы;
- температуру воды;
- ФИО и подпись отбиравшего пробы.

На бутыли размещают этикетку с указанием шифра пробы.

При отборе проб необходимо соблюдать технику безопасности.

Пробы, поступающие в лабораторию для исследования, должны быть зарегистрированы в журнале регистрации с обязательным указанием количества емкостей и номера акта, составленного при отборе проб.

Биотестирование проб воды проводят не позднее 6 часов после их отбора. При невозможности проведения анализа в указанный срок пробы воды охлаждают до (+2) – (+4) °С. В этих условиях пробы до анализа могут храниться не более одних суток. О продолжительности хранения проб воды делают отметку в протоколе биотестирования. В исключительных случаях при отсутствии летучих органических веществ допускается замораживание проб до (-20) °С и их хранение до двух недель. При этом следует иметь в виду, что после размораживания токсичность воды может измениться. Если пробы требуется отстаивать или фильтровать, то обе эти процедуры должны производиться до замораживания.

7.3. Подготовка водных проб к биотестированию

Если пробы были охлаждены или заморожены, то перед биотестированием их доводят до комнатной температуры. Крупнодисперсные включения, присутствующие в сточных водах, следует удалить фильтрацией пробы через пористый обеззоленный фильтр «белая лента». Нельзя использовать мелкопористый фильтр, например, «синяя лента», поскольку он может задерживать коллоидные вещества, что скажется на результатах биотестирования.

Природные воды фильтруют через мембранные фильтры с диаметром пор 3-5 мкм или через пористый обеззоленный фильтр.

Используемый для обеззараживания питьевых и сточных вод активный хлор является токсическим веществом, поэтому перед биотестированием таких вод его необходимо удалить отстаиванием пробы в открытой емкости с широким горлом при температуре (+2) – (+4) °С в течение 3–5 часов.

Проба воды, подготовленная к биотестированию, должна иметь pH 7,0–8,5. Если pH пробы не укладывается в эти пределы, то устанавливается токсичность отдельно до и после коррекции кислотности пробы 10%-ным раствором HCl или 10 %-ным раствором NaOH. Коррекция pH не должна вызывать

химической реакции с веществами пробы (выпадение осадка, комплексообразование) и увеличивать ее объем более, чем на 5 %. В протоколе опыта указываются оба результата биотестирования, однако заключение о токсичности дается по пробы до коррекции кислотности.

Пробы грунтовых или других вод с высоким содержанием двухвалентного железа (более 1 мг/дм^3) следует предварительно отстаивать не менее 24 часов при температуре от (+2) до (+4) °С. После этого осветленная вода сифонируется и анализируется на токсичность.

7.4. Отбор, транспортировка, хранение проб грунтов и почв

Отбор проб грунтов и почв, их транспортировка и хранение осуществляют в соответствии со следующими документами (если условия, указанные в данных документах, противоречат требованиям настоящей методики, следует руководствоваться последней):

- ГОСТ 17.4.3.01-83 «Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб»;
- ГОСТ 17.4.4.02-84 «Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа»;
- ГОСТ 27753.1-88 «Грунты тепличные. Методы отбора проб»;
- ГОСТ 28168-89 «Почвы. Отбор проб»;
- ГОСТ 12071-2000 «Грунты. Отбор, упаковка, транспортирование и хранение образцов».

Пробные площадки закладывают на участках с однородным почвенным и растительным покровом. При контроле загрязнения почв предприятиями промышленности пробные площадки намечают вдоль векторов «розы ветров» (ГОСТ 17.4.4.02-84). Фоновые образцы почвы для проведения контрольных измерений на токсичность отбирают на незагрязненных участках обследуемых территорий, имеющих аналогичный тип почвы.

Точечные пробы отбирают на пробной площадке из одного или нескольких слоев или горизонтов методом конверта или любым другим способом с таким расчетом, чтобы каждая проба представляла собой часть почвы, типичной для генетических горизонтов или слоев данного вида почвы. На каждые 20 га площади закладывают не менее одной пробной площадки размером 10×10 м (ГОСТ 17.4.4.02-84). При обследовании площади менее 0,5 га размер площадки уменьшают до 5×5 м.

При исследовании тепличных грунтов вся площадь теплицы разбивается на пробные площадки. Площадь одной пробной площадки должна составлять 230–270 м^2. Границы пробной площадки определяются элементами тепличных конструкций. В теплице, свободной от растений, отбор проб производят равномерно на всей площади пробной площадки. На пробной площадке, занятой растениями, точечные пробы отбирают в рядах между растениями (ГОСТ 27753.1-88).

Для отбора проб почв используют нож, шпатель или почвенный бур.

Объединенную пробу получают путем смешивания точечных проб одинакового объема, отобранных на одной пробной площадке. Для этого точечные пробы переносят на клеенку или крафт-бумагу, перемешивают и квартуют (сокращают) в 3-4 раза. Почву после квартования отбирают несколькими равными порциями и переносят в стеклянные банки с герметичной крышкой. Таким образом, получают объединенную пробу, масса которой должна составлять не менее 1 кг.

Используемые способы отбора, транспортировки, хранения, пробоподготовки должны обеспечить неизменность состава проб почв и грунтов к моменту их биотестирования.

При отборе проб почвы составляют акт по утвержденной форме (см. Приложение 1). На емкость с пробой наклеивают этикетку, на которой указывается шифр пробы.

Пробы, которые поступают в лабораторию, регистрируют в журнале регистрации с указанием количества емкостей и номера акта отбора проб.

Пробы почв и грунтов анализируют не позднее 12 ч с момента отбора. Если данное условие нельзя выполнить, то объединенные пробы хранят в холодильнике в емкостях с плотно закрытой крышкой до одной недели при температуре от (+2) до (+4) °С. Не допускается консервирование пробы почв для анализа на токсичность.

7.5. Приготовление водной вытяжки из грунтов и почв

Отобранные для проведения биотестирования почвы разрыхляют шпателем и освобождают от инородных материалов. К ним относятся механические включения, такие как промышленные, строительные, бытовые отходы и т.п., а также галечник, обломки камней, корневищ и веток. Возможность удаления таких включений из пробы устанавливается на основе изучения полевого описания места ее отбора. Данные сведения должны присутствовать в сопроводительной документации (акт отбора) к пробам, направленным на токсикологический анализ.

После этого пробы переносят на чистые листы плотной бумаги и доводят до воздушно-сухого состояния в хорошо проветриваемом помещении или в вытяжном шкафу. Высушенную почву просеивают сквозь сито с размером ячеек 1 мм и выдерживают открытыми не менее 2-х часов при комнатной температуре и влажности воздуха.

Подготовленную пробу почвы распределяют на ровной поверхности слоем в 1 см и отбирают из 5-ти точек методом конверта. Отобранная проба с массой около 200 г разделяется на две равные части: для биотестирования и для определения гигроскопической влажности после высушивания до постоянной массы. Пересчет воздушно-сухой пробы на массу абсолютно-сухой проводят по формуле 1:

$$\Delta M_{\text{абс.сух}} = \frac{\Delta M_{\text{абс.сух}}}{K_{гр}}, \qquad (1)$$

где $\Delta M_{абс.сух}$ – масса абсолютно-сухого образца, г; $\Delta M_{возд.сух.}$ – масса воздушно-сухого образца почвы, г; $K_{ср}$ – коэффициент пересчета массы воздушно-сухой пробы на массу абсолютно-сухой (среднее из трех измерений).

Для определения массовой доли почвы в воздушно-сухой пробе нужно:

1. Взвесить три пустых высушенных бюкса с крышками, записав их массу (M_o), а затем взвесить эти же бюксы с навесками (около 1 г) воздушно-сухой пробы ($M_{возд.сух.i}$).

2. Поместить открытые бюксы с воздушно-сухими пробами в сушильный шкаф и выдержать в течение 3 часов при температуре 105±5 °С. Затем закрыть бюксы притертыми крышками, перенести в эксикатор и дождаться их полного остывания (30-50 мин). Взвесить бюксы с навесками абсолютно-сухой пробы и записать их массы ($M_{абс.сух.i}$). После первого взвешивания пробы почвы необходимо еще несколько раз по 1-2 часа высушивать и охлаждать в эксикаторе, добиваясь расхождения в массе менее 0,005 г. Точность взвешивания должна составлять 0,001 г.

3. На основе полученных данных рассчитать значения коэффициента пересчета K_i для каждого эксперимента по формуле 2:

$$K_i = \frac{M_{абс.сух.i} - M_{oi}}{M_{возд.сух.i} - M_{oi}}, \qquad (2)$$

где K_i – коэффициент пересчета в i-том измерении; $M_{абс.сух.i}$ – масса бюкса с абсолютно-сухим образцом в i-м измерении, г; $M_{возд.сух.i}$ – масса бюкса с воздушно-сухим образцом в i-м измерении, г; M_{oi} – масса пустого бюкса в i-м измерении, г.

4. По результатам трех последних измерений массы бюксов производится расчет среднего значения ($K_{ср.}$) по формуле 3:

$$K_{ср.} = \frac{K_1 + K_2 + K_3}{3}, \qquad (3)$$

Водную вытяжку из почвы для биотестирования готовят в соотношении 1 часть почвы и 4 части дистиллированной воды. Воду для удаления углекислого газа, который растворяет карбонаты кальция и магния, предварительно кипятят 30 мин, а затем охлаждают и аэрируют.

Для получения водной вытяжки берут 100±1 г пробы почвы в воздушно-сухом состоянии, пересчитав навеску на ее абсолютно-сухую массу. Количество почвы должно быть достаточным для получения объема экстракта, необходимого при выполнении всех процедур биотестирования. Навеску почвы переносят в колбу емкостью 1000 см^3 и приливают 4-кратное количество дистиллированной воды.

Полученную смесь в течение 2-х часов перемешивают на аппарате для встряхивания жидкости и затем отстаивают 30 мин. Надосадочная жидкость отбирается сифонированием и фильтруется через мембранные фильтры с диаметром пор 3–5 мкм или через бумажные обеззоленные фильтры «белая лента». Если первые порции фильтрата оказываются мутными, то их нужно несколько раз фильтровать до получения прозрачного раствора.

При появлении устойчивой окраски и (или) повышенной мутности водной вытяжки, характерных для некоторых типов почв (гумусированные, дерново-подзолистые, торфяные и др.) водную вытяжку из них готовят в соотношении 1 часть почвы и 10 частей дистиллированной воды.

Вытяжка из почв должна иметь величину pH в диапазоне 7,0–8,5. При необходимости вытяжку перед серийным разбавлением предварительно нейтрализуют. После нейтрализации пробы аэрируют 10–20 мин для стабилизации pH.

Требуемые разбавления водной вытяжки для биотестирования готовят согласно п. 7.8.

7.6. Отбор, транспортировка и хранение проб осадков сточных вод, отходов производства и потребления

Отбор, транспортировку и хранение проб осадков сточных вод, отходов производства и потребления производят согласно следующим нормативным документам (если условия, указанные в данных документах, противоречат требованиям настоящей методики, следует руководствоваться последней):

- СП 2.1.7.1386-03 «Определение класса опасности токсичных отходов производства и потребления»;
- Отходы минерального происхождения. Рекомендации по отбору и подготовке проб. Общие положения. ПНД Ф 12.4.2.1-99;
- Отбор проб почв, грунтов, осадков биологических очистных сооружений, шламов промышленных сточных вод, донных отложений искусственно созданных водоемов, прудов-накопителей и гидротехнических сооружений ПНДФ 12.1:2:2.2:2.3.2-03.

Выделяют несколько групп отходов:

- ПО: отходы производства (производственные отходы);
- ТБО: отходы потребления (твердые бытовые отходы);
- смесь ПО и ТБО (смешанные отходы).

По агрегатному состоянию различают твердые (пылеобразные, порошкообразные, зернистые, шлаки, гранулированные, кусковые), пасто-, смоло- и студнеобразные и др. Кроме того, отходы могут быть гомогенными или гетерогенными.

Отбор проб проводится на пробных площадках, из емкостей накопителя или из источника образования отхода. На каждые 20 га накопителя закладывается не менее 1 пробной площадки (СП 2.1.7.1386-03).

Для отбора проб с больших по площади хранилищ отходов выделяют пробную площадку в виде квадрата со сторонами не менее 10 м. Для небольших накопителей (менее 0,5 га) пробная площадка должна быть не менее 5×5 м. Точечные пробы отбираются на пробных площадках из одного или нескольких слоев или горизонтов методом конверта, по диагонали или любым другим способом с таким расчетом, чтобы в каждом случае проба представляла собой типичную часть отхода. Объединенная проба составляется путем смеши-

вания точечных проб (не менее 5 проб), отобранных на одной площадке или из одной емкости (СП 2.1.7.1386-03).

При отборе проб из кучи точечные пробы берут с ее вершины, основания и боковых поверхностей. Число проб из кучи высотой до 2 м должно быть не менее 9 и увеличиваться на 4 пробы с каждым дополнительным метром высоты (ФР.1.39.2007.03223).

При отборе проб ТБО необходимо установить его состав. Он включает входящие в ТБО компоненты (бумага, картон, пищевые отходы, дерево, пластик, стекло, черный и цветной металл, текстиль, кожа, резина, камни, штукатурка и др.), а также их процентное содержание. Для лабораторных исследований из массы каждого компонента отхода отбирают в отдельный пакет его составляющие. Масса пробы каждого из компонентов должна быть не менее 300 г.

Состав производственных отходов определяется производителем (собственником) отхода самостоятельно или с привлечением аккредитованных в установленном порядке организаций (СП 2.1.7.1386-03).

Для отбора проб отходов используют шпатель или почвенный бур (ГОСТ 17.4.4.02-84). Отбор сыпучих отходов из тары (вагон, кузов автомобиля, контейнер и др.) производят с помощью щупа.

Количество и необходимый объем отбираемой пробы отхода зависит от его агрегатного состояния, влажности, степени однородности и его зернистости (для сыпучих отходов).

Точечные пробы отходов перед объединением тщательно гомогенизируют. Обращаясь с твердыми сыпучими и пастообразными отходами, используют металлические шпатели. Полужидкие отходы гомогенизируют встряхиванием.

Объединенная проба отхода при отсутствии специальных требований должна составлять не менее 1 кг.

Пробы отходов не подлежат консервированию. В лабораторию пробы должны поступить не позднее, чем через 12 ч после отбора. При невозможности проведения анализа в указанный срок пробы охлаждают до (+2) – (+4) °С. В этих условиях пробы жидких и органических отходов до анализа могут храниться не более одних суток, твердых – не более одной недели.

Пробы отходов, поступившие в лабораторию на исследование, должны быть документально оформлены и маркированы. Необходимыми сопроводительными документами являются акт пробоотбора (Приложение 1). Маркировка отходов осуществляется в произвольной форме, но с обязательным занесением обозначений в лабораторный журнал.

7.7. Приготовление водной вытяжки из осадков сточных вод, отходов производства и потребления

Водную вытяжку из осадков сточных вод и отходов готовят из соотношения «твердая фаза : жидкость», равного 1:10. В качестве жидкости используют дистиллированную воду.

Твердые отходы. Пробу хорошо перемешивают. Для подготовки пробы отходов требуется 1 кг. Отобранные пробы разрыхляют и тщательно просматривают. При наличии частиц более 10 мм их аккуратно измельчают с помощью металлического шпателя до меньшего размера. Механически размалывать смесь недопустимо. Затем пробу высушивают до воздушно-сухого состояния как указано в п. 7.5.

После этого пробу методом квартования сокращают в 3-4 раза. На гладкой ровной поверхности (на крафт-бумаге, клеенке или полиэтиленовой пленке) перемешанную пробу разделяют на равные квадраты. Затем в шахматном порядке из квадратов отбирают порции всей толщины слоя и объединяют порции в пробу с абсолютно-сухой массой не менее 200 г. Влажность осадков и отходов определяют по п. 7.5.

Для получения вытяжки используют воздушно-сухую пробу, масса которой в перерасчете на абсолютно-сухую пробу должна составлять 100±1 г. После выщелачивания 100 г такой пробы будет получено около 900 $см^3$ водной вытяжки. Это необходимо учитывать при расчете количества отбираемой порции.

Жидкие отходы и осадки сточных вод. Жидкие и содержащие менее 1 % взвешенного вещества отходы и осадки сточных вод не подвергают выщелачиванию, а сразу исследуют на токсичность после фильтрации через фильтр «белая лента» или после центрифугирования.

Выполнение процедуры подготовки экстракта выщелачивания. В сосуд, содержащий отход или осадок сточных вод с абсолютно-сухой массой 100±1 г, добавляют дистиллированную воду в соотношении «сухая масса : жидкость» 1:10 (наиболее удобно использовать 1000 $см^3$ воды на 100 г отхода в расчете на абсолютно-сухую массу). При меньшем количестве пробы соответственно снижается и объем дистиллированной воды.

Полученную смесь в течение 7–8 часов слабо перемешивают на аппарате для встряхивания жидкости, обеспечивая нахождение твердого вещества во взвешенном состоянии. Нельзя допускать измельчения частиц отходов или осадков при перемешивании. После окончания перемешивания раствор с осадком оставляют на ночь для отстаивания. После этого жидкость над осадком сифонируют.

Если после отстаивания жидкость становится прозрачной, то фильтрование не производится. При наличии в экстракте взвешенного вещества жидкость необходимо профильтровать через фильтр «белая лента» в воронке Бюхнера с применением слабого вакуума. В случае применения фильтрования это отмечают в рабочем журнале. Для освобождения водной вытяжки от взвешенных частиц возможно применение центрифугирования (10 минут при 3000 оборотах в минуту). В особых случаях, когда мутность водной вытяжки из отхода сохраняется и после фильтрации, допускается ее отстаивание в холодильнике до 5 суток. После этого жидкость над осадком сифонируют.

Влияние мутности водных экстрактов можно в значительной мере компенсировать, если при измерении оптической плотности тест-культур водоросли в контрольную кювету фотоэлектроколориметра вместо дистиллированной воды вносить анализируемый экстракт или его разбавления.

Полученный после выщелачивания экстракт исследуют на токсичность. Процедуру биотестирования начинают не позднее, чем через 6 часов после приготовления вытяжки из осадка, отхода. Если это невозможно, то допускается хранение экстракта в холодильнике не более 48 часов при температуре (+2)–(+4) °С.

Перед биотестированием измеряют pH и температуру в полученном экстракте. Водная вытяжка из осадков сточных вод или отходов должна иметь pH 7,0–8,5. При необходимости проводят коррекцию pH пробы, после которой ее аэрируют в течение 10–20 мин. Температуру пробы доводят до температуры рабочего помещения.

Если необходимо установить влияние фактора pH на результаты биотестирования токсичности водных вытяжек из отходов в тех случаях, когда величина pH выходит за пределы диапазона (7,0–8,5), токсикологический эксперимент проводят на пробах до и после их коррекции. За результат принимается токсичность исходной пробы.

Данные регистрируют в журнале. Приготовление разбавлений водной вытяжки для биотестирования проводят по п. 7.8.

При делении проб осадков сточных вод или отходов на жидкую и твердую фракции на токсичность проверяют как жидкую фракцию, так и экстракт из твердой фракции. Если какая-либо из этих частей оказалась токсичной, то токсичным считается весь отход.

7.8. Приготовление разбавлений исследуемых вод и водных вытяжек для биотестирования

Для приготовления разбавлений исследуемых вод и водных вытяжек используется дистиллированная вода. Анализируемые воды предварительно разделяют в 2 сосуда: один для разбавления, а другой для хранения раствора, если биотестирование необходимо будет повторить. Объем используемой посуды должен на 1/3 превышать необходимый объем приготавливаемого разбавления исследуемых вод. Все растворы и их разбавления готовятся при комнатной температуре. Дистиллированная и исследуемая воды должны также иметь комнатную температуру.

Пробы вод и водных вытяжек из грунтов, почв и осадков сточных вод анализируются в 100, 33, 11, 3,7 и 1,2%-ной концентрациях (ряд разбавлений, кратных трем). После получения предварительных результатов биотестирования при необходимости готовятся и анализируются дополнительные разбавления.

В процессе приготовления разбавлений пробы тщательно перемешивают.

Подготовленная к биотестированию вода в объеме 100 $см^3$ переносится в стеклянный стакан емкостью 200 $см^3$. Для получения ряда разбавлений анали-

зируемой пробы, кратных трем, в четыре аналогичных стакана добавляется по 48 $см^3$ дистиллированной воды. После этого в первый из них переносится 24 $см^3$ тестируемой воды, во второй, третий и четвертый - по 24 $см^3$, соответственно, из первого, второго и третьего стаканов. 24 $см^3$ из последнего стакана отбрасываются. Наряду с разбавленной тестируемой водой в отдельные стаканы вносится 48 $см^3$ исходной воды для тестирования и 48 $см^3$ контрольной (дистиллированной) воды. Таким образом, получается 6 следующих вариантов объемом 48 $см^3$:

1. Контрольная проба;
2. Исходная (не разбавленная) проба воды;
3. Проба, разбавленная в 3 раза;
4. Проба, разбавленная в 9 раз;
5. Проба, разбавленная в 27 раз;
6. Проба, разбавленная в 81 раз.

Если изначально известно, что исследуемые воды и вытяжки обладают гипертоксичностью, то пробы предварительно разбавляются в 9 раз. После этого также готовится ряд разбавлений, кратных трем (9, 27, 81, 243, 729 раз).

При работе с водными вытяжками из отходов следует готовить ряд разбавлений, кратных 10-ти. Для этого подготовленная к биотестированию вытяжка в объеме 100 $см^3$ переносится в стеклянный стакан емкостью 200 $см^3$. Для получения ряда разбавлений анализируемой пробы, кратных десяти, в четыре аналогичных стакана добавляется по 45 $см^3$ дистиллированной воды. После этого в первый из них переносится 5 $см^3$ водного экстракта, во второй, третий и четвертый - по 5 $см^3$, соответственно, из первого, второго и третьего стаканов. 5 $см^3$ из последнего стакана отбрасываются. Наряду с разбавленной тестируемой водой в отдельные стаканы вносится 45 $см^3$ исходной вытяжки для тестирования и 45 $см^3$ контрольной (дистиллированной) воды. Таким образом, получается 6 следующих вариантов объемом 45 $см^3$:

1. Контрольная проба;
2. Исходная (неразбавленная) водная вытяжка;
3. Вытяжка, разбавленная в 10 раза;
4. Вытяжка, разбавленная в 100 раз;
5. Вытяжка, разбавленная в 1000 раз;
6. Вытяжка, разбавленная в 10000 раз.

7.9. Приготовление тест-культуры водоросли

Перед биотестированием культура водоросли *Chlorella vulgaris*, выращенная на 50%-ной среде Тамия (см. Приложение 2) в культиваторе КВ-05, фильтруется через 4 слоя марли или вату и разбавляется до оптической плотности 0,125±0,005 50%-ной средой Тамия. Регистрация оптической плотности культуры тест-объекта проводится с помощью измерителя плотности суспензии ИПС-03. Он позволяет проводить регистрацию оптической плотности в круглых 2-см

кюветах («пенициллинках»), в которых выращивается тест-культура водоросли при биотестировании токсичности воды.

Общий объем засеваемой суспензии водоросли данной плотности должен быть не менее 20 $см^3$ на каждый используемый в работе многокюветный культиватор КВМ-05. Если одновременно планируется проведение биотестирования нескольких проб, то количество культиваторов КВМ-05 должно соответствовать их числу, а объем тест-культуры водоросли необходимо увеличить кратно числу анализируемых проб воды.

8. ПРОВЕДЕНИЕ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Для биотестирования используют альгологически чистую культуру водорослей *Chlorella vulgaris* Beijer, находящуюся в экспоненциальной стадии роста (через одни сутки после пересева в культиватор КВ-05). Для поддержания экспоненциальной стадии роста водорослей пересев осуществляется ежедневно (см. Приложение 2).

Тест-культура водоросли, приготовленная согласно п. 7.9, вносится по 2 $см^3$ в 6 стаканов с 48 $см^3$ контрольной и тестируемых проб воды или вытяжки из отходов. В результате такого (25-кратного) разбавления засеваемой культуры содержание элементов питания в тестируемой воде будет соответствовать 2% среде Тамия, а исходная оптическая плотность тест-культуры водоросли будет равна 0,005.

При работе с водными вытяжками из отходов в 6 стаканов с 45 мл экстрактов из отходов, разбавленных кратно 10-ти, тест-культура водоросли вносится по 1,9 $см^3$.

Содержимое каждого стакана разливается по 6 $см^3$ во флаконы-реакторы (по 4 флакона на каждый вариант тестируемой воды, включая контрольную пробу). При работе с автоматической пипеткой с рабочим объемом 1–5 $см^3$ допустимо вносить во флаконы по 5,5 $см^3$ тестируемой воды.

Ростовые характеристики культуры водоросли хлорелла определяются во многокюветном культиваторе КВМ-05. Прибор позволяет в одинаковых и контролируемых условиях по температуре, интенсивности света, снабжению CO_2 (0,03%) и перемешиванию одновременно выращивать 24 пробы культуры водорослей. При оптимальном режиме (Т=36±0,5 °С, средней интенсивности света 60 $Вт/м^2$) увеличение оптической плотности контрольной культуры водоросли и, следовательно, численности клеток за 22 часа составляет порядка 30 раз ($D_{конечная}$ = 0,150±0,03). Таким образом, за это время действие загрязняющих веществ, содержащихся в пробах, проявится примерно в пяти поколениях клеток водоросли. Если после 22 часов культивирования оптическая плотность суспензии превышает указанную величину, то следует сократить время биотестирования на 1–2 часа.

Все 24 заправленных флакона закрываются чистыми полиэтиленовыми пробками, в которых для обеспечения оптимального газообмена со средой и предотвращения излишнего испарения культуральной жидкости сделаны

отверстия диаметром 6 мм. Перед использованием пробки необходимо залить кипящей водой, выдержать в ней 10 минут, а затем, слив воду, просушить фильтровальной бумагой. После этого флаконы с пробками строго по вариантам устанавливаются в предварительно включенный в сеть культиватор КВМ-05. Флаконы загружаются в приостановленную кассету по ходу ее вращения, т.е. против часовой стрелки. В конце первого часа эксперимента после стабилизации температуры во флаконах проверяется ее значение в контрольном варианте. Для этого термометр вводится через отверстие в пробке внутрь одного из контрольных флаконов. Чтобы точнее и быстрее произвести замер температуры, необходимо сделать несколько помешивающих движений в измеряемой среде. Если температура оказалась ниже или выше рекомендованной (36±0,5°С), прибор необходимо настроить на поддержание требуемой температуры с помощью регулятора. Измерение температуры надо проводить в одном из флаконов контрольного варианта, не выключая культиватор.

9. ПОЛУЧЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ИХ ОБРАБОТКА

9.1. Снятие результатов токсикологического эксперимента

Через 22 часа культивирования необходимо выключить культиватор КВМ-05 из сети и провести измерение оптической плотности суспензии водоросли во всех флаконах. Для этого флаконы надо извлечь из культиватора и разместить в штативе. Затем, поочередно устанавливая флаконы в измеритель ИПС-03, провести замеры их оптической плотности. Эксперимент можно считать успешным, если величины оптической плотности в контрольных флаконах были не ниже 0,120. Если оптическая плотность тест-культуры в этих флаконах регулярно превышает величину 0,180, следует на 1–2 часа сократить время культивирования.

При замере оптической плотности суспензии водоросли непосредственно в тех флаконах, в которых выращиваются пробы с тест-культурой хлореллы, из-за неоднородности самих флаконов возможно возрастание ошибки измерения при малых величинах плотности. Поэтому надежные результаты при работе с взвесями водорослевой культуры, находящимися в «пенициллиновых» флаконах, можно получить только при оптических плотностях выше 0,050.

О степени токсического воздействия тестируемой воды на водоросли судят по разнице величины оптической плотности тест-культуры в контрольных и опытных вариантах после 22 часов выращивания в культиваторе КВМ-05. С этой целью для каждого разведения по результатам четырех параллельных определений вычисляют среднее значение оптической плотности.

Если для одного из флаконов конкретного варианта опыта получено явно выпадающее значение оптической плотности (чаще всего из-за недостаточной чистоты флакона), то оно может быть отброшено, а средняя величина плотности определяется из трех оставшихся значений.

Рассчитывают относительную (в %) разницу средней величины оптической плотности для каждого разведения по сравнению с контролем (*I*):

$$I = \frac{(\overline{D}_k - \overline{D}_0)}{\overline{D}_k} \times 100, \qquad (4)$$

где $\overline{D}_k$ и $\overline{D}_0$ – средние значения оптической плотности в контроле и в опыте, соответственно.

Критерием токсичности пробы воды является снижение средней величины оптической плотности по сравнению с контрольным вариантом на 20% и более в случае подавления роста тест-культуры или ее повышение на 30% и более – при стимуляции ростовых процессов.

9.2. Величина токсичной кратности разбавления (ТКР)

В случае, если критерий токсичности в виде 20% подавления роста превышен, рассчитывается ТКР вод и водных вытяжек по формуле 5. Если превышен критерий токсичности в виде 30% стимулирования роста, то расчет ТКР проводится по формуле 6. При этом значение индекса *I* для варианта с подавлением роста приводится со знаком (+), а при стимуляции - со знаком (–).

Если в ряду разбавлений имеются отклонения в оптической плотности как в ту, так и другую сторону, качество воды устанавливается по наибольшей величине разбавления, для которой превышен критерий токсичности. Если критерий токсичности не превышен ни при одном разведении воды, включая ее исходный неразбавленный вариант, проба считается нетоксичной.

$$ТКР = 10^{\frac{(\lg P_б - \lg P_м)\times(I_м - 0{,}2)}{I_м - I_б} + \lg P_м}, \qquad (5)$$

$$ТКР = 10^{\frac{(\lg P_б - \lg P_м)\times(I_м - 0{,}3)}{I_м - I_б} + \lg P_м} \qquad (6)$$

где $P_б$ – величина разбавления (наибольшая), при которой индекс отклонения был ниже критерия токсичности; $P_м$ – величина разбавления (меньшая), при которой индекс отклонения был выше критерия токсичности; $I_б$ и $I_м$ – величины соответствующих этим разбавлениям индексов *I*, выраженные в долях.

В качестве $P_б$ и $P_м$ используется та пара наибольших разбавлений, между которыми имеет место переход индекса *I* (формула 4) величины установленного критерия токсичности.

Пример №1: значения индекса *I* для 1, 3, 9, 27 и 81-кратного разбавления тестируемой воды составили, соответственно: 42, 33, 22, 13 и 2 %. В долях данные значения составили 0,42; 0,33; 0,22; 0,13; и 0,02, соответственно. Анализ этих данных показывает, что переход через критерий токсичности в виде 20% подавления роста (в долях это 0,2) имеет место между разбавлениями тестируемой воды в 3 ($P_м$) и 9 ($P_б$) раз. Тогда, руководствуясь формулой (5), сначала рассчитывается показатель степени выражения, а затем величина ТКР:

$$\frac{(\lg 27-\lg 9)\times(0{,}22-0{,}2)}{0{,}22-0{,}13}+\lg 9=\frac{(1{,}43-0{,}95)\times 0{,}02}{0{,}09}+0{,}95=1{,}05$$

$ТКР = 10^{1,05} = 11$ раз

Пример №2: значения индекса *I* для 1, 3, 9, 27 и 81-кратного разбавления тестируемой воды составили, соответственно: 24, –5, –36, –22 и –8. В долях это 0,24; –0,05; –0,36; –0,22 и –0,08, соответственно. В этом случае переход через критерий токсичности в виде 30% стимуляции роста (в долях это 0,3) имеет место между разбавлениями тестируемой воды в 9 ($P_м$) и 27 ($P_б$) раз. Тогда, руководствуясь формулой (6), рассчитывается степенной показатель выражения и величина ТКР:

$$\frac{(\lg 27-\lg 9)\times(0{,}36-0{,}3)}{0{,}36-0{,}22}+\lg 9=\frac{(1{,}43-0{,}95)\times 0{,}06}{0{,}14}+0{,}95=1{,}16$$

$ТКР = 10^{1,16} = 14$ раз

Аналогичным образом проводится расчет токсической кратности разбавления и для других кратностей разведений тестируемых вод и водных вытяжек.

10. КОНТРОЛЬ ПОГРЕШНОСТИ МЕТОДИКИ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

10.1. Контроль качества культуры водоросли хлорелла

Контроль качества культуры водоросли хлорелла проводится один раз в квартал. Он осуществляется посредством определения ее чувствительности к "модельному" токсиканту – бихромату калия ($K_2Cr_2O_7$). Для этого во флаконы культиватора КВМ-05 вместо разведений тестируемой воды вносят растворы $K_2Cr_2O_7$ в концентрациях 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2 мг/дм^3. При хорошем состоянии культуры водоросли и правильно поставленном эксперименте после 22 часов культивирования 50%-ное подавление прироста (снижение индекса *I* (формула 4) до 50%) должно наблюдаться в диапазоне концентраций бихромата

калия 0,4–1,6 мг/дм^3. При этом оптическая плотность культуры водоросли в контрольном варианте за этот период должна достигнуть величины 0,15±0,03. Этот же показатель может быть использован для текущего контроля состояния тест-культуры водоросли.

Определение диапазона реагирования тест-организма на модельный токсикант проводится в соответствии с процедурой биотестирования, описанной в п. 8 в четырех повторностях для каждой концентрации токсиканта.

Исходный раствор бихромата калия готовится в концентрации 1 г/дм^3. Этот раствор может храниться в холодильнике 3–4 месяца. Рабочие растворы эталонного токсиканта для проведения токсикологического анализа готовятся перед анализом посредством разбавления исходного раствора и в дальнейшем не хранятся.

Если концентрация бихромата калия, вызвавшая 50% подавление снижение роста, находится в интервале 0,4–1,6 мг/дм^3, то чувствительность культуры водоросли хлорелла соответствует необходимым требованиям, и она может быть использована для биотестирования.

При несоответствии этому результату следует проверить точность приготовления исследуемых растворов и условия проведения биотестирования. Если ошибки при проведении опытов исключены, необходимо сменить культуру тест-организма, т.е. взять новую культуру водоросли в учреждениях, где она имеется или осуществить пересев водоросли с соблюдением условий стерильности.

10.2. Обработка (вычисление) результатов измерений (определений)

За результат определения в пробе принимают среднее арифметическое значение ($\overline{D}$) результатов четырех параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать значения, рассчитанного по формуле (8):

$$\overline{D} = \frac{D_1 + D_2 + D_3 + D_4}{4} \qquad (7)$$

$$\left| D_{\max(4)} - D_{\min(4)} \right| \le r \times 0{,}01 \times \overline{D} \qquad (8)$$

где r – относительное значение предела повторяемости для четырех результатов параллельных определений, приведенное в таблице 1, %.

При невыполнении условия (8) целесообразно выяснить причины появления неприемлемых результатов параллельных определений и устранить их.

10.3. Оформление результатов измерений (определений)

Результаты определений регистрируют в протоколе испытаний, который оформляют в соответствии с ГОСТ ИСО/МЭК 17025 – 2009.

Примечание: при необходимости (в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 5725-6, раздел 5.2) для результата измерения $\overline{D}$ указывается количество параллельных определений и способ установления результата измерений.

10.4. Оценка приемлемости результатов, получаемых в условиях воспроизводимости

Расхождение между результатами измерений, полученными в двух лабораториях $|\overline{D}_1 - \overline{D}_2|$, не должно превышать величины, рассчитанной по формуле (9).

$$|\overline{D}_1 - \overline{D}_2| \le R \times 0{,}01 \times \overline{\overline{D}}, \qquad (9)$$

где $\overline{D}_1$, $\overline{D}_2$ – результаты измерений, полученные в условиях воспроизводимости; $\overline{\overline{D}}$ – среднее арифметическое значение результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости; R – относительное значение предела воспроизводимости, приведенное в таблице 1, %.

При выполнении этого условия приемлемы оба результата измерений и в качестве окончательного может быть использовано их общее среднее значение.

При невыполнении условия приемлемости результатов, полученных в условиях воспроизводимости, могут быть использованы методы оценки приемлемости результатов измерений согласно раздела 5 ГОСТ Р ИСО 5725-6.

10.5. Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории

10.5.1. Контроль качества результатов измерений при реализации методики в лаборатории предусматривает контроль стабильности результатов измерений (на основе контроля стабильности среднеквадратического отклонения повторяемости, среднеквадратического отклонения внутрилабораторной прецизионности).

10.5.2. Оперативный контроль процедуры измерений проводят на основе контроля внутрилабораторной прецизионности.

10.5.3. Контроль внутрилабораторной прецизионности осуществляют путем сравнения результатов измерений определяемого компонента в пробе, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности. Расхождение между результатами измерений $|\overline{D}_1 - \overline{D}_2|$ не должно превышать величины, рассчитанной по формуле (10):

$$|\overline{D}_1 - D_2| \le R_л \times 0{,}01 \times \overline{\overline{D}}, \qquad (10)$$

где $\overline{D}_1$, $\overline{D}_2$ – результаты, полученные в условиях внутрилабораторной прецизионности, %; $\overline{\overline{D}}$ – среднее арифметическое значение результатов измерений полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности, в %; $R_л$ – относительное значение предела внутрилабораторной прецизионности, в %

Значение $R_т$ может быть приведено в Протоколе установленных показателей качества результатов анализа при реализации методики выполнения измерений в лаборатории.

При невыполнении условия (10) контрольную процедуру повторяют. При повторном невыполнении условия (10) выясняют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам, и устраняют их.

10.5.4. Периодичность контроля исполнителем процедуры выполнения измерений, а также реализуемые процедуры контроля стабильности результатов выполняемых измерений регламентируют в документах системы менеджмента качества лаборатории.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ГОСТ 12.0.004-90 «ССБТ. Организация обучения безопасности труда. Общие положения».

ГОСТ 12.1.004-91 «ССБТ. Пожарная безопасность. Общие требования».

ГОСТ 12.1.005-88 «ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны».

ГОСТ 12.1.007-76 «ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности».

ГОСТ 12.1.008-76 «ССБТ. Биологическая безопасность. Общие требования».

ГОСТ 12.4.016-83 «ССБТ. Одежда специальная защитная. Номенклатура показателей качества».

ГОСТ 12.4.020-82 «ССБТ. Средства индивидуальной защиты рук. Номенклатура показателей качества».

ГОСТ 12.4.034-2001 «ССБТ. Средства индивидуальной защиты органов дыхания. Классификация и маркировка».

ГОСТ 17.1.5.04-81 «Охрана природы. Гидросфера. Приборы и устройства для отбора, первичной обработки и хранения проб природных вод. Общие технические условия».

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

ГОСТ 17.4.3.01-83 «Охрана природы. Почвы. Общие требования к отбору проб».

ГОСТ 17.4.4.02-84 «Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа».

ГОСТ 12071-2000 «Грунты. Отбор, упаковка, транспортирование и хранение образцов».

ГОСТ 27753.1-88 «Грунты тепличные. Методы отбора проб».

ГОСТ 28168-89 «Почвы. Отбор проб».

ГОСТ 31861-2012 «Вода. Общие требования к отбору проб».

ГОСТ 31862-2012 «Вода питьевая. Отбор проб».

ГОСТ Р 12.1.019-2009 «Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты».

ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике».

ГОСТ ИСО/МЭК 17025 – 2009 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий».

Григорьев Ю.С., Андреев А.А., Кравчук И.С., Гекк П.И. Способ биотестирования токсичности вод и водных растворов. Патент на изобретение № 2482474, опубл. Бюл. изобр. № 14 от 20.05.2013.

Жмур Н.С., Орлова Т.Л. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей. ФР.1.39.2007.03223. Москва, "Акварос" 2007, 44 стр.

СНиП 21-01-97 «Пожарная безопасность зданий и сооружений».

СП 2.1.7.1386-03 «Определение класса опасности токсичных отходов производства и потребления».

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».

ПНД Ф 12.4.2.1-99 «Отходы минерального происхождения. Рекомендации по отбору и подготовке проб. Общие положения».

ПНД Ф 12.15.1-08 «Методические указания по отбору проб для анализа сточных вод».

Р 52.24.353-2012 «Отбор проб поверхностных вод суши и очищенных сточных вод».

ПРИЛОЖЕНИЕ 1 *(рекомендуемое)*

Форма акта отбора проб

Акт отбора проб № ___

1	Дата и время отбора		
2	Цель пробоотбора		
3	Место отбора (наименование точки отбора)		
4	Объект отбираемой пробы	Природная вода, питьевая вода, сточная вода, грунт, почва, осадки сточных вод, отходы *(нужное подчеркнуть)*	
5	Вид пробы	Разовая, среднесуточная, точечная, объединенная, *(нужное подчеркнуть)*	
6	Вид отбора пробы	Параллельный, последовательный *(нужное подчеркнуть)*	
7	Используемый пробоотборник		
8	Номер на емкости		
9	Материал емкости	Полиэтилен, стекло *(нужное подчеркнуть)*	
10	Наличие и способ опломбирования емкости		
11	Проба отобрана для проведения анализа	На токсичность методом биотестирования	
12	Условия отбора	t°, °C	pH
Примечание			

Отбор проб проведен в присутствии _____ _____
подпись расшифровка подписи

Исполнитель _____ _____
подпись расшифровка подписи

ПРИЛОЖЕНИЕ 2 *(обязательное)*

Выращивание культуры водоросли хлорелла

Выращивание культуры водоросли производится в культиваторе КВ-05. В качестве реактора используется прозрачная бутыль из бесцветного стекла емкостью 400 $см^3$, применяемая в медицине при переливании препаратов. В реактор заливается суспензия водоросли в объеме 100±5 $см^3$. Для обеспечения углекислым газом, необходимого для осуществления процесса фотосинтеза, емкость с суспензией непрерывно вращается вокруг своей продольной оси. В результате вращения в культуральной среде поддерживается близкое к равновесному содержание CO_2 за счет активного растворения углекислоты из воздуха.

Во время культивирования суспензия водоросли облучается светом лампы накаливания 40 Вт, 220В, установленной в приборе над реактором. Постоянная температура среды, равная 36,0±0,5 °С, поддерживается автоматическим включением и выключением встроенного вентилятора по команде блока термостабилизации прибора.

Таблица 2

Питательная среда Тамия для культивирования водоросли хлорелла

Компоненты среды	Концентрация компонента в 50%-ной среде Тамия, г/$дм^3$	Концентрация компонента в 2%-ной среде Тамия, г/$дм^3$	Добавление компонента при приготовлении	
			концентрированных растворов, г/200$см^3$	50%-ной среды Тамия, $см^3$/$дм^3$
KNO3	2,5	0,1	20	25
$MgSO_4 \times 7H_2O$	1,25	0,05	10	25
KH_2PO_4	0,625	0,025	5	25
Железо лимоннокислое	0,003	0,00012 (120 мкг)	0,6 (растворять при кипячении)	1
Микроэлементы:			*	
- раствор А				1
- раствор Б				1

*Растворы А и Б готовятся отдельно, раствор А (H_3BO_3 – 2,86 г/$дм^3$; $MnCl_2 \times 4H_2O$ – 1,81 г/$дм^3$; $ZnSO_4 \times 5\ H_2O$ – 0,222 г/$дм^3$) и раствор Б (MoO_3 – 17,64 мг/$дм^3$; NH_4VO_3, – 22,96 мг/$дм^3$, растворять при нагревании). Затем отдельно стерилизуют каждый раствор 30 мин кипячением, охлаждают, охлаждают до температуры рабочего помещения и плотно закрывают притертой пробкой. Оба раствора можно хранить в холодильнике при температуре от (+2) до (+4) °С до трех месяцев.

Культура водоросли выращивается на 50%-ной питательной среде Тамия, состав которой представлен в таблице 2. Питательная среда и растворы всех со-

лей готовятся на дистиллированной воде. При систематическом использовании питательную среду удобнее готовить не из навесок солей, а из их концентрированных растворов (см. табл. 2). При приготовлении 1 $дм^3$ 50%-ной питательной среды Тамия эти растворы последовательно вносятся в указанном объеме в 0,5 $дм^3$ дистиллированной воды. Затем добавляются заранее приготовленные растворы микроэлементов и лимоннокислого железа, а общий объем среды доводится дистиллированной водой до 1 $дм^3$. Растворы солей и микроэлементов, а также приготовленная питательная среда хранятся в холодильнике при (+2) – (+4) °С не более 3 месяцев.

Засев водоросли в культиватор КВ-05 производится с начальной оптической плотностью 0,005±0,001. Для этого в 100±5 $см^3$ 50 %-ной питательной среды вносится 2,5±0,1 $см^3$ суспензии водоросли с оптической плотностью 0,200±0,010, профильтрованной через 3-4 слоя марли или вату. Культура выращивается в полустационарном режиме, который достигается ее ежедневным пересевом в свежую среду. Такой режим культивирования позволяет без соблюдения условий стерильности поддерживать альгологически чистую культуру водоросли. При перерывах в работе свежевыращенную культуру водоросли можно хранить в холодильнике при температуре (+2) – (+4) °С в течение 2-4 месяцев.

При возобновлении работ по биотестированию хранящуюся культуру водоросли следует засеять указанным выше способом и использовать для биотестирования не ранее, чем через 1 сутки выращивания в культиваторе КВ-05.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3 *(рекомендуемое)*

Регистрация результатов измерения ОП тест-культуры водоросли хлорелла

(Пример записи в рабочем журнале результатов измерений)

№ пробы	Время биотестирования, час	Степень разбавления тестируемых вод, количество раз	№ повторности	Оптическая плотность	Среднее значение оптической плотности	Процентное отклонение от контроля	Наличие токсического действия пробы: оказывает, не оказывает	Предел повторяемости для 4-х результа-тов параллельных измерений, n=4, в %
Контроль	22	0	1 2 3 4	0,152 0,140 0,161 0,147	0,150	0	-	14
1	22	1 (без разбавления)	1 2 3 4	0,091 0,082 0,096 0,080	0,087	42	оказывает	18
2	22	3	1 2 3 4	0,099 0,103 0,110 0,095	0,101	33	оказывает	15
3	22	9	1 2 3 4	0,110 0,120 0,121 0,119	0,117	22	оказывает	9
4	22	27	1 2 3 4	0,125 0,130 0,131 0,139	0,131	13	не оказывает	11
5	22	81	1 2 3 4	0,140 0,155 0,145 0,149	0,147	2	не оказывает	10

ПРИЛОЖЕНИЕ 4 *(рекомендуемое)*

Характеристика тест-объекта

В качестве тест-организма используется одноклеточная зеленая водоросль *Chlorella vulgaris* Beijer.

Отдел:	Chlorophyta
Класс:	Euchlorophyceae
Порядок:	Chlorococcales
Семейство:	Chlorellaceae
Подсемейство:	Chlorelloideae
Род:	Chlorella Beijer
Вид:	Chlorella vulgaris Beijer

Клетки водоросли шаровидные или эллиптические диаметром 2–10 мкм (иногда больше), с тонкой оболочкой без слизи, одним или двумя ядрами и одним чашеобразным хлоропластом. Размножение бесполое – автоспорами, образующимися в результате деления содержимого материнской клетки. Количество автоспор от 2 до 32 в зависимости от условий выращивания. Деление происходит, как правило, один раз в сутки, однако в условиях интенсивной культуры она способна и к более активному размножению (4–8 делений в сутки). Такой интенсивный рост обеспечивает термофильный штамм этой водоросли, для которого оптимальной для культивирования является температура 36,0 ± 0,5 °С.

В данных условиях регулярно пересеваемая культура водоросли хлорелла за счет опережающего роста ее клеток может на протяжении длительного времени сохраняться альгологически чистой без применения специальных приемов очистки и стерилизации.

ПРИЛОЖЕНИЕ 5 *(рекомендуемое)*

Форма записи результатов биотестирования в рабочем журнале

1	Дата, время отбора проб	15 марта 2014 г., 13:00
2	Наименование объекта	Городские очистные сооружения сточная вода
3	Место отбора пробы	После вторичных отстойников
4	Вид отобранной пробы	среднесуточная
5	Время хранения пробы до начала биотестирования	4 ч
6	Используемые тест-организмы, возраст, условия выращивания	*Chlorella vulgaris*, суточная культура, выращенная в культиваторе КВ-05 на 50% среде Тамия
7	Место биотестирования и условия	Многокюветный культиватор водорослей КВМ-05, температура 36±0,3 °С, начальная оптическая плотность тест-культуры водорослей 0,005, питательная среда Тамия (2%)
8	Продолжительность биотестирования	22 часа
9	Метод биотестирования	Измерение оптической плотности тест-культуры водоросли *Chlorella vulgaris* после выращивания на контрольной и опытной воде
10	Повторности для каждой концентрации	4
11	Степень разбавления сточных вод	Разбавления в 1 (без разбавления) 3, 9, 27, 81 раз
12	t, pH в исследуемой воде	21 °С, pH 7,2
13	Величина токсической кратности разбавления (ТКР)	11 раз

ПРИЛОЖЕНИЕ 6 *(рекомендуемое)*

Протокол биотестирования

Наименование организации
Наименование объекта
Биотестируемая среда
Условия отбора и транспортировки проб
Кем взяты пробы
Дата отбора проб
Дата доставки проб
Используемая методика измерений

РЕЗУЛЬТАТЫ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

№ п/п	Дата биотестирования	Место отбора проб	Тестируемая проба	Оценка тестируемой пробы	Величина токсической кратности разбавления (ТКР)
				Оказывает токсическое действие (указать кратность разведения) или не оказывает	

Биотестирование проводил _____ _____
подпись расшифровка подписи

Начальник организации _____ _____
подпись расшифровка подписи

ПРИЛОЖЕНИЕ 7

УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
Центр метрологии и сертификации «Сертимет»

СВИДЕТЕЛЬСТВО

ОБ АТТЕСТАЦИИ МЕТОДИКИ ИЗМЕРЕНИЙ

№ 88-19374-078-01.00076-2014

***Методика измерений оптической плотности культуры водоросли хлорелла (Chlorella vulgaris* Beijer) для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления**

разработанная ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет», 660041, г. Красноярск, пр.Свободный,79

предназначенная для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления

и регламентированная в документе организации «***Методика измерений оптической плотности культуры водоросли хлорелла (Chlorella vulgaris* Beijer) для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления***», утвержденном в 2014 году на 36 страницах.

Методика измерений аттестована в соответствии с ФЗ № 102 от 26 июня 2008 г. «Об обеспечении единства измерений» и ГОСТ Р 8.563-2009.

Аттестация осуществлена по результатам экспериментальных исследований и метрологической экспертизы материалов по разработке методики измерений.

В результате аттестации установлено, что методика измерений соответствует предъявленным к ней метрологическим требованиям и обладает основными метрологическими характеристиками, приведенными в приложении.

Приложение: метрологические характеристики методики измерений на 1 листе.

Дата выдачи свидетельства 3 октября 2014 г.

Метрологическая аттестация методики измерений проведена Центром метрологии и сертификации «Сертимет» Уральского отделения Российской академии наук (Аттестат аккредитации в Реестре аккредитованных метрологических служб № 01.00076).

Руководитель Центра «Сертимет» УрО РАН,
эксперт-метролог СДСЭМ _____ Л.А. Игнатенкова

Россия, 620990, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 91
Тел./факс (343) 362-33-97

СертиМет

ПРИЛОЖЕНИЕ 8

Лист 1 из 1

ПРИЛОЖЕНИЕ

к свидетельству № 88-16374-078-01.00076-2014

об аттестации методики измерений

оптической плотности культуры водоросли хлорелла (Chlorella vulgaris Beijer*)*

для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления

на 1 листе

(обязательное)

Условия биотестирования указаны в таблице 1, показатели точности измерений приведены в таблице 2.

Таблица 1 – Условия биотестирования

Объект токсикологического анализа	Пробы питьевых, пресных природных и сточных вод, водные вытяжки из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления
Тест-культура	Водоросль хлорелла *(Chlorella vulgaris* Beijer*)* – термофильный штамм одноклеточной зеленой водоросли с величиной оптической плотности (0,125±0,005) ед. в 50 % среде Тамия
Модельный токсикант	Раствор бихромата калия ($K_2Cr_2O_7$) с массовой концентрацией от 0,4 до 1,6 мг/дм^3 в дистиллированной воде
Контрольная проба	2 см^3 тест-культуры водоросли хлорелла и 48 см^3 дистиллированной воды (pH 7,0-8,5)
Общие требования к процедуре биотестирования	Количество контрольных проб - 4; количество опытных проб – 4; время наблюдения – 22 часа

Таблица 2 – Диапазоны измерений определяемой характеристики, значения показателей повторяемости, воспроизводимости

Диапазон измерений оптической плотности культуры водоросли хлорелла, единицы оптической плотности	**Показатель повторяемости** (относительное среднеквадратическое отклонение повторяемости), σ_r, %	**Показатель воспроизводимости** (относительное среднеквадратическое отклонение воспроизводимости), σ_R, %	**Предел повторяемости** (относительное значение допускаемого расхождения между четырьмя результатами параллельных определений), r, %	**Предел воспроизводимости** (относительное значение допускаемого расхождения между двумя результатами, полученными в двух лабораториях), R, %
от 0.05 до 0,2 включ.	8	13	29	36

Руководитель Центра «Сертимет» УрО РАН,
эксперт-метролог СДСЭМ _____ Л.А. Игнатенкова

СертиМет

Методика разработана в ФГАОУ ВПО
«Сибирский федеральный университет»
Григорьевым Юрием Сергеевичем
660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79
Тел.: (391) 206-21-34, факс: 244-86-25
E-mail: gr2897@gmail.com



gost.e-ecolog.ru