ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 56236— 2014 (ИСО 6341:2012)

ВОДА

Определение токсичности по выживаемости пресноводных ракообразных *Daphnia magna Straus*

(ISO 6341:2012, Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea)* — Acute toxicity test, MOD)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2016

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН Федеральным государственным унитарным предприятием «Всероссийский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства и океанографии» совместно с Обществом с ограниченной ответственностью «Протектор» на основе собственного перевода на русский язык стандарта, указанного в пункте 4.

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» ноября 2014 г. № 1627-ст.

4 Настоящий стандарт является модифицированным по отношению к международному стандарту ИСО 6341:2012 «Качество воды. Обнаружение угнетения подвижности *Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea)* — Тест на острую токсичность» (ISO 6341:2012 «Water quality — Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea)* — Acute toxicity test», MOD) путем:

- введения дополнительных положений, фраз и слов в текст настоящего стандарта для учета потребностей национальной экономики Российской Федерации и особенностей российской национальной стандартизации, выделенных в тексте настоящего стандарта курсивом, за исключением наименований тест-организмов;
- исключения:

термина «Контроль партии», так как термин является самоопределяющимся.

второго и третьего абзацев подраздела 6.3 и справочного приложения А в части применения культивационной среды Элендта М4 и способа ее приготовления, указанного в приложении А, в связи с ограниченной возможностью применения этой среды для анализа проб, содержащих металлы.

Текст международного стандарта не вошедший в настоящий стандарт приведен в дополнительном приложении ДА.

- изменения структуры. Сравнение структуры настоящего стандарта со структурой указанного международного стандарта приведено в дополнительном приложении ДБ;

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного стандарта для приведения в соответствие с ГОСТ Р 1.5–2012 (пункт 3.5).

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

6 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Ноябрь 2016 г.

*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, уведомления 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

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

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 2
3 Термины и определения 3
4 Отбор проб 3
5 Метод А 4
6 Метод В 15
Приложение А (рекомендуемое) Примеры определения средней эффективной концентрации *(разбавления)* 18
Приложение В (обязательное) Методы культивирования тест-организмов 24
Приложение С (справочное) Информация о результатах проведенных межлабораторных испытаний (*метод В)* 30
Приложение D (справочное) Пример определения минимального неэффективного разбавления (LID) для сточной воды (метод В)
Приложение Е (рекомендуемое) Приготовление культивационной воды для культивирования *Daphnia magna* Straus и воды для разбавления (метод В) 32
Приложение ДА (справочное) Текст международного стандарта ИСО 6341:2012, не вошедший в настоящий стандарт 33
Приложение ДБ (справочное) Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного стандарта 36
Библиография 38

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ВОДА

Определение токсичности по выживаемости пресноводных ракообразных *Daphnia magna Straus*

Water. Determination of toxicity by survival of freshwater crustaceans Daphnia magna Straus

Дата введения — 2016—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на *природные пресные воды (поверхностные и подземные)*, питьевые воды (*централизованных систем и нецентрализованного питьевого водоснабжения)*, сточные воды (в том числе очищенные) при минерализации не более 6,0 г/дм^3 и устанавливает методы лабораторного *биологического тестирования (далее* — тестирование) для определения их токсичности с использованием *пресноводных ракообразных Daphnia magna Straus (*далее — тест-организмов):

- *по выживаемости* тест-организмов *при тестировании в условиях переменного воздействия света и постоянной температуры (метод А);*

- *по* иммобилизации (угнетению подвижности) тест-организмов при тестировании в условиях переменного воздействия света *и постоянной* температуры (*метод В);*

Методы применяют также для определения токсичности растворимых в воде веществ, отработанных буровых растворов, водных вытяжек донных отложений, твердых промышленных отходов, грунтов и почв.

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

- *среднюю эффективную кратность разбавления ($ЭКР_{50}$) пробы, вызывающую гибель или иммобилизацию 50 %* тест-организмов, *а также безвредную кратность разбавления пробы ($ЭКР_{10}$), вызывающую отклонение тест-параметров — выживаемости или иммобилизации — за 48 ч (96 ч) не более 10 %* относительно контрольной пробы;

- среднюю эффективную концентрацию ($ЭК_{50}$) растворов веществ, вызывающую *гибель* или иммобилизацию 50 % тест-организмов, и безвредную концентрацию ($ЭК_{10}$) растворов веществ, вызывающую *отклонение тест-параметров — выживаемости или иммобилизации — за 48 ч не более 10 %* относительно контрольной пробы.

При определении токсичности анализируемых объектов с минерализацией выше 6,0 г/дм^3 испытания проводят по ГОСТ 31959.

Примечания

1 При определении токсичности и токсикологических показателей анализируемых проб природных, питьевых и сточных вод, отработанных буровых растворов, водных вытяжек твердых промышленных отходов, донных отложений, грунтов и почв по методу А устанавливают продолжительность тестирования 96 ч.

2 При определении токсичности и токсикологических показателей проб объектов исследования по методу В устанавливают продолжительность тестирования 48 ч.

3 Среднюю эффективную кратность разбавления ($ЭКР_{50}$) за 96 ч тестирования обозначают как 96 ч $ЭКР_{50}$, среднюю эффективную концентрацию ($ЭК_{50}$) за 48 ч тестирования — как 48 ч $ЭК_{50}$.

4 Тестирование должен выполнять обученный персонал.

Издание официальное

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

В помещении лаборатории, где проводят тестирование:

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

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

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

ГОСТ 17.1.5.05–85 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 Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического и гельминтологического анализа

ГОСТ 112–78 Термометры метеорологические стеклянные. Технические условия

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

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

ГОСТ 2493–75 Реактивы. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия

ГОСТ 3118–77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

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

ГОСТ 4148–78 Реактивы. Железо (II) сернокислое 7-водное. Технические условия

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

ГОСТ 4198–75 Реактивы. Калий фосфорнокислый однозамещенный. Технические условия

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

ГОСТ 4217–77 Реактивы. Калий азотнокислый. Технические условия

ГОСТ 4220– 75 Реактивы. Калий двухромовокислый. Технические условия

ГОСТ 4234–77 Реактивы. Калий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328–77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4461–77 Реактивы. Кислота азотная. Технические условия

ГОСТ 4523–77 Реактивы. Магний сернокислый 7-водный. 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 27753.1–88 Грунты тепличные. Методы отбора проб

ГОСТ 27753.2-88 Грунты тепличные. Метод приготовления водной вытяжки

ГОСТ 28168–89 Почвы. Отбор проб

ГОСТ 29227–91 (ИСО 835-1–1981) 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 Р 56237–2014 (ИСО 5667-5:2006) Вода питьевая. Отбор проб

ГОСТ 31959–2012 (ИСО 14669:1999) Вода. Методы определения токсичности по выживаемости морских ракообразных

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

ГОСТ Р 53857–2010 Классификация опасности химической продукции по воздействию на окружающую среду. Основные положения

ГОСТ Р 53858–2010 Классификация опасности смесевой химической продукции по воздействию на окружающую среду. Основные положения

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 **контрольный раствор** (control solution): Культивационная вода, используемая для выращивания тест-организмов.

3.2 **иммобилизация** (immobility): Неспособность тест-организмов плавать в течение 15 с, после легкого встряхивания, даже если они все еще могут двигать свои антенны.

3.3 **$ЭК_{50}$** (EC_{50}): Эффективная концентрация, которая вызывает гибель или иммобилизацию 50 % тест-организмов по окончании тестирования.

3.4 **неонат** (neonate): Новорожденный или только что вылупившийся тест-организм.

Примечание — В настоящем стандарте новорожденным считают организм младше 24 ч.

3.5 **партия проб** (test party): Серия повторностей.

*3.6 **Эффективная кратность разбавления; ЭКР** (effective multiplicity of dilution): Кратность разбавления анализируемой пробы (например, сточной воды) культивационной водой (водой для разбавлений) при подготовке анализируемой пробы, которая приводит к заданному проценту гибели или иммобилизации тест-организмов за 48 или 96 ч относительно контрольной пробы.*

*3.7 **безвредная кратность разбавления**: Кратность разбавления анализируемой пробы, при которой отклонение тест–параметров — выживаемости или иммобилизации за 48 ч (96 ч) составляет не более 10 % относительно контрольной пробы.*

*3.8 **токсичность** (toxicity): Свойство воды (водной вытяжки, раствора вещества), обусловленное наличием в ней токсических веществ, характеризующих способность воды нарушать жизнедеятельность тест организмов.*

4 Отбор проб

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

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

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

4.2 Отбор проб донных отложений проводят в соответствии с требованиями ГОСТ 17.1.5.01 массой не менее 2 кг.

Срок хранения проб донных отложений — не более 12 ч после их отбора до проведения тестирования.

Допускается хранение отобранных проб до проведения их тестирования:

- не более 48 ч — при температуре от 0 °С до 4 °С;
- не более 2 мес при температуре минус 18 °С.

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

Отобранные пробы отработанных буровых растворов хранят в емкостях — холодильниках при температуре от 0 °С до 4 °С не более 2 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 2 кг.

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

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

4.6 Отбор проб грунтов проводят по ГОСТ 12071, ГОСТ 27753.1; почв — по ГОСТ 17.4.3.01, ГОСТ 17.4.4.02, ГОСТ 28168, [3], массой не менее 2 кг.

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

4.7 Для отбора проб природной воды, 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, грунтов и почв используют емкости из темного стекла или нержавеющей стали, при этом не допускается использовать емкости с хромовым покрытием.

Для отбора проб веществ используют емкости из полиэтилена, полиэтилентерефлата, 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

5.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в регистрации выживаемости пресноводных ракообразных тест-организмов Daphnia magna Straus в анализируемой пробе исследуемого объекта относительно контрольной пробы, определении ее токсичности и токсикологических показателей при тестировании в течение 48 или 96 ч.

Продолжительность тестирования 48 ч указана для определения токсичности и токсикологических показателей анализируемых проб веществ.

Продолжительность тестирования 96 ч указана для определения токсичности и токсикологических показателей анализируемых проб природной и сточной воды, *отработанных буровых растворов, твердых промышленных отходов, донных отложений, грунтов и почв.*

5.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы, материалы

Климатостат *любого типа,* обеспечивающий поддержание температуры (*20* ± 2) °С и белое люминесцентное освещение в диапазоне 500 — 1000 лк.

Весы неавтоматического действия по ГОСТ Р 53228 высокого класса точности с ценой деления (дискретностью отсчета) не более 0,01 г, 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 измерение 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 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

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

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

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

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

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

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

Лампа люминесцентная обеспечивающая освещение в пределах от 500 до 1000 лк

Мешалка магнитная.

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

Центрифуга лабораторная медицинская.

Сушильный электрический шкаф общелабораторного назначения.

Аквариумный микрокомпрессор любого типа.

Шпатели металлические по ГОСТ 19126.

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.*

Эксикаторы по ГОСТ 25336.

Пробирки стеклянные вместимостью 10 см^3 по ГОСТ 25336.

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

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

Сито с отверстиями диаметром 1 мм, 1800–2200 мкм.

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

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

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

Вода для культивирования тест-организмов и разбавления объектов испытания (культивационная вода) по 5.3.2.

Макроводоросли (например, элодея или роголистник темно–зеленый), используемые для приготовления культивационной воды.

Примечание — Элодея (Elodea Canadensis Rich) — представитель погруженных растений, широко распространенный в стоячих водах умеренной зоны. Размножается вегетативным путем за счет образования густо облиственных боковых отростков, побегов из подземных частей (корневищ) или из нижних частей летних побегов. Теневынослива. Температурная граница выживаемости лежит в пределах от 5 °С до 41,5 °С.

Для культивирования растения отбирают из естественной популяции условно чистого водоема в конце мая — начале июня, когда появляется много молодых, наиболее жизнеспособных растений.

У элодеи отбирают зеленые верхушечные побеги длиной 8 — 10 см. без боковых отростков и корней, не имеющие видимых повреждений.

Отобранные растения транспортируют в сосудах с водой, взятой из того же водоема.

Питательная среда *(среда Прата или другая, например, Успенского №1), приготовленная в соответствии с требованиями В.3.3 (приложение В).*

Примечания

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

2 Питательную среду используют для культивирования водорослей, которые используют для корма при культивировании тест-организмов.

Тест-организмы: пресноводные ракообразные вида *Daphnia magna Straus*. Культивирование и подготовка к тестированию тест-организмов — см. приложение В.

Калий азотнокислый по ГОСТ 4217, х. ч.

Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный по ГОСТ 2493, х. ч.

Кальций хлористый, 2-водный, х. ч., с массовой долей основного вещества не менее 98 %

Магний сернокислый 7-водный по ГОСТ 4523, х. ч.

Натрий углекислый кислый по ГОСТ 4201.

Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, х. ч.

Хлорид железа 6-водный по ГОСТ 4147, х. ч.

Кислота азотная по ГОСТ 4461, х. ч.

Кислота соляная по ГОСТ 3118, х. ч.

Аммоний ванадиевокислый (NH_4VO_3) с массовой долей основного вещества не менее 98 %

Калий углекислый (или двууглекислый) (KCO_3 или K_2CO_3) с массовой долей основного вещества не менее 98 %

Калий фосфорнокислый однозамещенный с массовой долей основного вещества не менее 98 %.

Примечание — *Допускается применять другие средства измерений, вспомогательное оборудование, расходные материалы и реактивы с метрологическими и техническими характеристиками не хуже указанных в настоящем стандарте.*

5.3 Подготовка к тестированию

5.3.1 Подготовка посуды

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

Для проведения тестирования используют только стеклянную посуду.

5.3.1.2 Стеклянную посуду для тестирования осторожно промывают 10 %-ным раствором азотной кислоты и выдерживают 2 — 3 ч при комнатной температуре, затем тщательно промывают водопроводной водой, обрабатывают 10 %-ным раствором углекислого кислого натрия, 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 углекислого кислого натрия, 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 1 ч при температуре 150 °С.

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

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

5.3.2 Приготовление культивационной воды для тест-организмов

Для культивирования тест-организмов Daphnia magna Straus используют водопроводную воду.

Водопроводную воду отбирают из крана таким способом, чтобы избежать ее загрязнения. Для этого воду спускают 15 мин, затем отбирают в стеклянные емкости и отстаивают в течение 2 сут в открытых сосудах.

Для подготовки культивационной воды используют стеклянные аквариумы (объемом 20 — 30 л). После отстаивания воду аэрируют в течение 7 сут при помощи микрокомпрессоров, затем помещают в аквариумы емкостью 20 — 30 л и добавляют две-три веточки макроводорослей (см. 5.2).

Для культивирования Daphnia magna Straus допускается использовать также природную воду из незагрязненных водоемов (например, артезианских колодцев).

Культивационная вода должна соответствовать следующим требованиям:

- pH — от 7,0 до 8,3;
- *жесткость общая — 80 — 250 мг /дм^3 по $CaCO_3$ (от 1,6 до 5,0 °Ж);*
- концентрация растворенного кислорода — не менее 6 мг O_2/дм^3;
- *температура* — (20 ± 2)° С;
- *минерализация — не выше 6,0 г/дм^3.*

5.3.3 Проверка физиологической чувствительности тест-организмов

Периодически *(не реже одного раза в месяц), а также непосредственно перед тестированием,* синхронизированную культуру околосуточных тест-организмов проверяют на физиологическую чувствительность. *Для этого определяют* среднюю эффективную концентрацию (24 ч $ЭК_{50}$) модельного токсиканта (двухромовокислого калия) в следующей последовательности.

5.3.3.1 Готовят исходный раствор модельного токсиканта массовой концентрацией 1 г/дм^3 следующим способом: в мерную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят 1 г двухромовокислого калия и растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды (см. 5.2), затем доводят содержимое колбы до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают.

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

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

- готовят растворы двухромовокислого калия массовой концентрацией от 0,1 до 2,0 мг/дм^3 следующим способом: в семь емкостей вместимостью не менее 400 см^3 каждая мерным цилиндром вносят по 300 см^3 культивационной воды (5.3.2), затем добавляют исходный раствор двухромовокислого калия массовой концентрацией 1 г/дм^3 (5.3.3.1) соответственно: в первую емкость — 0,03 см^3, во вторую — 0,075 см^3, в третью– 0,15 см^3, в четвертую — 0,3 см^3, в пятую — 0,45 см^3,в шестую — 0,6 см^3, в седьмую — 0,75 см^3 и перемешивают. При этом в каждой емкости массовая концентрация приготовленного раствора модельного токсиканта (двухромовокислого калия) составляет соответственно: 0,1; 0,25; 0,50; 1,0; 1,5; 2,0 и 2,5 мг/дм^3;

- затем для каждой приготовленной концентрации модельного токсиканта (двухромовокислого калия) отбирают три емкости вместимостью 150 см^3 каждая и вносят анализируемые растворы следующим способом: в каждую емкость добавляют по 100 см^3 конкретного раствора модельного токсиканта (двухромовокислого калия), после чего помещают в них по 10 экземпляров околосуточных тест-организмов.

5.3.3.3 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 (5.3.2), при этом используют не менее трех емкостей.

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

5.3.3.4 Подсчитывают число выживших тест-организмов аналогично подсчету тест-организмов при оценке токсичности анализируемых проб по 5.5.1 и определяют значение 24 ч $ЭК_{50}$ модельного токсиканта (двухромовокислого калия), при этом:

- если значение 24 ч $ЭК_{50}$ данного модельного токсиканта находится в диапазоне от 0,9 до 2,5 мг/дм^3, то считают, что подготовленные тест-организмы пригодны для тестирования;

- если значение 24 ч $ЭК_{50}$ 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 те-

стированию и, при необходимости, повторяют тестирование с использованием обновленной культуры дафний.

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

Примечание — Значение 24 ч $ЭК_{50}$ раствора модельного токсиканта указывают в протоколе испытаний, имея в виду, что это значение в установленном диапазоне концентраций характеризует токсичность модельного токсиканта только для использованных тест-организмов, характеризует их физиологическую чувствительность, что позволяет (или не позволяет) проводить тестирование с данными тест-организмами.

5.3.3.5 Если по результатам тестирования не удалось получить конкретное значение 24 ч $ЭК_{50}$, то для определения 24 ч $ЭК_{50}$ модельного токсиканта используют пробит-анализ. Аналогичный пример приведен в А.3 приложения А.

5.3.4 Подготовка проб

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

5.3.4.1 Подготовка исходных проб природной и питьевой воды

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

Не допускается для фильтрования использовать фильтр «синяя лента».

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

5.3.4.2 Подготовка исходных проб сточной воды

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

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

Из отобранных проб отработанных буровых растворов, твердых промышленных отходов, донных отложений, грунтов и почв, готовят водные вытяжки, затем измеряют pH-метром значение pH и оксиметром — концентрацию растворенного кислорода подготовленных водных вытяжек.

5.3.4.3.1 Подготовка водных вытяжек из проб отработанных буровых растворов

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

- pH пробы отработанного бурового раствора выше 9,0 или ниже 6,0;

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

- проба отработанного бурового раствора имеет неприятный запах.

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

После окончания перемешивания смесь 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 колбу и перемешивают в течение 5 мин, после чего используют ее для подготовки анализируемой пробы.

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

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

5.3.4.3.2 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 обна-

ружения частиц размером более 10 мм их измельчают с помощью металлического шпателя до размера менее 10 мм. Не допускается измельчать смесь с помощью механизированных устройств.

Измельченную пробу отходов высушивают при температуре (20 ± 5) °С до воздушно-сухого состояния в вытяжном шкафу или в хорошо проветриваемом помещении.

Водную вытяжку из высушенной пробы отходов готовят в соотношении 1:10 (твердые промышленные отходы и дистиллированная вода, соответственно) следующим способом:

В колбу (стакан) 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.

Примечания

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

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

После окончания перемешивания 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 тестируют без разбавления, а также при разбавлении 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.

5.3.4.3.3 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 колбу (стакан) и заливают дистиллированной водой (см.5.2) в соотношении 1 : 4 по объему, перемешивают с использованием орбитального шейкера (или качалки-мешалки) в течение 2 ч. После окончания перемешивания смесь выдерживают в течение 1 ч при температуре (20 ± 5) °С, а затем в течение 12 — 14 ч выдерживают при температуре от 2 °С до 4 °С. Затем жидкость над осадком осторожно переливают в другую колбу и фильтруют, после чего используют для подготовки анализируемой пробы.

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

5.3.4.3.4 Подготовка водных вытяжек из проб грунтов и почв

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

Водную вытяжку из пробы грунта (почвы) готовят следующим способом: в колбу вместимостью 1000 см^3 вносят 100 — 200 г высушенной подготовленной пробы грунта (почвы), 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 колбу и фильтруют.

Оставшуюся часть осадка в колбе встряхивают до взмучивания взвешенных частиц пробы и фильтруют через обеззоленные фильтры «белая лента» с применением вакуумного водяного (или электрического) насоса при вакууме не более 2666,448 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 колбу, фильтруют и только после этого используют для приготовления анализируемой пробы.

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

5.3.4.4 Подготовка исходных растворов веществ

Исходные растворы веществ, в зависимости от заданной концентрации, готовят в мерной колбе 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 параллель-но 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 колбу вместимостью 1000 $см^3$ (или 100, 50, 25 $см^3$) вносят 1 г вещества (или другое его количество, в зависимости от заданной концентрации раствора), затем осторожно добавляют небольшое количество дистиллированной воды (см. 5.2) и перемешивают до полного растворения вещества, затем содержимое колбы доводят до метки дистиллированной водой, снова перемешивают. Перед тестированием приготовленный раствор выдерживают при температуре (20 ± 5) °С не менее 2 ч.

Измеряют pH-метром значение pH и оксиметром концентрацию растворенного кислорода в исходном растворе вещества.

5.3.4.5 Исходные пробы (5.3.4.1 — 5.3.4.3) и исходные растворы веществ (5.3.4.4) должны иметь следующие характеристики:

а) Значение pH 7,0 — *8,3*

Если значение pH исходной пробы (раствора) выше указанного предела, то в пробу (раствор) добавляют раствор соляной кислоты молярной концентрацией 1 моль/$дм^3$, если ниже — то раствор гидроокиси натрия молярной концентрацией 1 моль/$дм^3$ так, чтобы добавленный объем не превышал 5 % от объема пробы.

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

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

Для исходных проб природной и питьевой воды проводят тестирование при измеренных по 5.3.4.1 значениях pH.

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

b) Концентрация растворенного кислорода не ниже 6 мг O_2/$дм^3$

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

c) Минерализация менее 6,0 г/$дм^3$.

5.3.4.6 Подготовка анализируемых проб

Анализируемой пробой природной воды является подготовленная по 5.3.4.1 исходная проба природной воды.

Анализируемые пробы сточной воды *для тестирования* готовят *следующим способом: проводят разбавление исходной пробы сточной воды: в конические колбы вместимостью 250 $см^3$* вносят исходную пробу сточной воды *(5.3.4.2)* и *воду для разбавлений в следующих объемах:*

- 100 $см^3$ исходной пробы сточной воды (проба без разбавления);

- 50 см^3 исходной пробы сточной воды и 50 см^3 воды для разбавлений (кратность разбавления — 50 %, в два раза);

- 10 см^3 исходной пробы сточной воды и 90 см^3 воды для разбавлений (кратность разбавления — 10 %, в 10 раз);

- 1 см^3 исходной пробы сточной воды и 99 см^3 воды для разбавлений (кратность разбавления — 1 %, в 100 раз);

- 0,1 см^3 исходной пробы сточной воды и 99,9 см^3 воды для разбавлений (кратность разбавления — 0,1 %, в 1000 раз).

Анализируемые пробы отработанных буровых растворов, донных отложений, твердых промышленных отходов, грунтов и почв для тестирования готовят из их водных вытяжек (5.3.4.3) путем разбавления водных вытяжек водой для разбавлений *аналогично подготовке анализируемых проб сточной воды.*

Анализируемые пробы вещества *для тестирования* готовят *следующим способом*: в емкости вместимостью 150 см^3 каждая вносят по 100 см^3 воды для разбавлений, *затем* добавляют рассчитанные объемы исходного раствора вещества *(5.3.4.4)* для получения заданных концентраций вещества, *отвечающих требованиям,* установленным в 5.3.4.5.

5.3.4.7 Измеряют и регистрируют pH анализируемой пробы.

***5.3.5** Подготовку тест-организмов к тестированию проводят в соответствии с требованиями В.2 (приложение В) с учетом требований 5.3.3.*

5.4 *Проведение* тестирования

Тестирование проводят в два этапа: предварительное и окончательное.

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

5.4.1 Предварительное тестирование

Предварительное тестирование проводят для установления диапазона *разбавлений (*концентраций*) проб,* в пределах которого необходимо провести окончательное тестирование *для определения значения 48 ч $ЭКР_{50}$ (96 ч $ЭКР_{50}$) или 48 ч $ЭК_{50}$ 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 пробы.*

Процедура тестирования — по 5.4.3.

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

5.4.2 Окончательное тестирование

*По результатам предварительного тестирования (5.4.1) по установлению диапазона разбавлений (*концентраций*) подготавливают анализируемые пробы для окончательного тестирования аналогично подготовке анализируемых проб по 5.3.4 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 способом, чтобы обеспечить два уровня снижения выживаемости *тест-организмов* ниже и выше предполагаемого значения $ЭК_{50}$ (*$ЭКР_{50}$*).

Для окончательного тестирования применяют не менее трех емкостей на каждую *заданную кратность разбавления (*концентрацию*).*

Процедура тестирования *— по 5.4.3.*

Пример проведения окончательного тестирования и установление значения средней эффективной концентрации 48 ч $ЭК_{50}$ для вещества приведен в А.2.2 (приложение А).

Примечание — Исходя из статистических данных, схема тестирования может быть изменена, например уменьшено количество емкостей с анализируемыми пробами для каждого разбавления (концентра-

ции) 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 *(5.4.1 и 5.4.2) вместимостью 150 см*^{3}, вносят *по 100 см*^{3} анализируемой пробы, *затем в каждую емкость помещают* по 10 шт. околосуточных тест-организмов.

5.4.3.2 Для каждой анализируемой пробы (*разбавлений,* концентраций) подготавливают контрольную пробу *следующим способом:* в емкости *вместимостью 150 см*^{3} вносят *по 100 см*^{3} *воды для разбавлений (5.3.2)* и *помещают по 10 шт. односуточных* тест-организмов.

Примечание — Плотность посадки тест-организмов — 1 шт. на 10 см^3.

5.4.3.3 Емкости с пробами, подготовленными по 5.3.4.1–5.3.4.6 помещают в климатостат.

5.4.3.4 Тестирование *(в зависимости от анализируемой пробы)* проводят в течение 48 ч *или 96 ч (см.5.1)* в климатостате при температуре (20 ± 2) ^{0}С и попеременном воздействии света и темноты:

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

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

5.4.3.6 После окончания тестирования:

- измеряют pH-метром pH в каждой емкости с анализируемой и контрольной пробами.
- измеряют оксиметром значение концентрации растворенного кислорода в каждой емкости с анализируемой и контрольной пробами;
- визуально осматривают в каждой емкости состояние тест-организмов. Любые обнаруженные отклонения регистрируют.

5.4.4 Результаты тестирования считают достоверными, если соблюдаются следующие условия:

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

b) Значение 24 ч $ЭК_{50}$ модельного токсиканта находится в пределах, указанных в 5.3.3.4.

Если условия по перечислениям a) и b) 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 дафний (5.5.3.5) 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 A, % определяют по гибели тест-организмов для каждого заданного разбавления (концентрации) анализируемой пробы относительно контрольной пробы после 48 ч (96 ч) тестирования и рассчитывают по формуле

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

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 *По результатам, полученным по 5.5.2.1, в процентах для каждого заданного разбавления (концентрации) анализируемой пробы определяют конкретное значение средней эффективной кратности разбавления (концентрации) пробы, вызывающее 50 %-ную гибель тест-организмов 96 ч* $ЭКР_{50}$ *(96 ч* $ЭКР_{50}$*) или 48 ч* $ЭК_{50}$ *в зависимости от анализируемой пробы. Пример определения 48 ч* $ЭК_{50}$ *приведен в А.2.2. (приложение А).*

При необходимости определяют:

- минимальную *кратность разбавления* (концентрацию) пробы, соответствующую 100 %-ной гибели тест-организмов;

- максимальную *кратность разбавления* (концентрацию) пробы, соответствующую 0 %-ной гибели тест-организмов за 48 ч (96 ч).

5.5.3.2 Если по результатам тестирования, *полученным по 5.5.3.1* не удалось определить *конкретное* значение средней эффективной *кратности разбавления (*концентрации*) пробы,* вызывающее 50 %-ную *гибель тест-организмов* за 48 ч *(96* ч), то для определения этого значения используют пробит-анализ.

Пример использования пробит-анализа приведен в А3, приложение А.

5.5.4 Определение степени токсичности анализируемых проб

5.5.4.1 Если значение токсичности анализируемых проб, рассчитанное по 5.5.2.1, формула (1), составляет не более 10 %, то эффективную кратность разбавления (эффективную концентрацию) анализируемой пробы, при которой выживаемость тест-организмов снизилась относительно контрольной пробы не более чем на 10 % за 48 ч тестирования (или 96 ч тестирования в зависимости от исследуемого объекта), относят к безвредной кратности разбавления (безвредной концентрации).

5.5.4.2 Степень токсичности исследуемых объектов оценивают:

- природной и питьевой воды — по таблице 1;

- донных отложений — по таблице 2;

- отработанных буровых растворов — по таблице 3;

- водных растворов веществ — по таблице 4 (в том числе химической продукции, смесевой химической продукции — по ГОСТ Р 53857, ГОСТ Р 53858 соответственно);

- 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 и питьевой воды

Степень токсичности проб природной и питьевой воды		*Значение токсичности для проб природной и питьевой воды без разбавления А, %*
общая	*детализированная*	
Токсичность отсутствует	*Нетоксичная*	*До 10 включ.*
Не обладает острой	*Слаботоксичная*	*Св. 10 до 25 включ.*
токсичностью	*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 водных вытяжек 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 эффективной кратности разбавления 96 ч $ЭКР_{50}$, приведенному в таблице 3.		

Таблица 3 — Степень токсичности проб водных вытяжек отработанных буровых растворов, загрязненных проб донных отложений

Степень токсичности проб водных вытяжек отработанных буровых растворов (донных отложений)	*Значение эффективной кратности разбавления проб водных вытяжек отработанных буровых растворов (донных отложений) 96 ч $ЭКР_{50}$, разы*
Нетоксичные	*1,0*
Слаботоксичные	*Менее 100*
Среднетоксичные	*От 100 до 1000*
Высокотоксичные	*От 1000 до 10000*
Гипертоксичные	*Св. 10000*

Таблица 4 — Степень токсичности проб водных растворов веществ

Степень токсичности проб водных растворов веществ	*Значение эффективной концентрации проб вещества 48 ч $ЭК_{50}$, 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*

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:

а) ссылку на настоящий стандарт с указанием метода определения;

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

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

d) подробное описание тестирования:

- дату начала тестирования и продолжительность;

- для природной воды, сточных вод, водных вытяжек отработанных буровых растворов, твердых промышленных отходов, донных отложений, грунтов, почв — кратность разбавления, способ отбора 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);

e) токсичность исследуемого объекта с указанием степени токсичности и результатов определения токсичности, средней эффективной кратности разбавления 96 ч $ЭКР_{50}$, средней эффективной концентрации 48 ч $ЭК_{50}$ в зависимости от анализируемой пробы, метод расчета (при необходимости);

f) обнаруженные негативные эффекты (например, вялость тест-организмов, 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 $ЭКР_{50}$ (96 ч $ЭКР_{50}$) , 48 ч $ЭК_{50}$ (48 ч $ЭК_{50}$) и диапазон разбавлений (концентраций) пробы, соответствующий 0% -ной и 100 % -ной гибели 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 В

6.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в регистрации иммобилизации пресноводных ракообразных тест-организмов *Daphnia magna* Straus в анализируемой пробе *исследуемого объекта относительно контрольной пробы,* определении ее *токсичности и* токсикологических показателей при тестировании в течение 48 ч.

Тестирование проводят попеременно в темноте и в режиме светового дня (16 ч свет/ 8 ч темнота) при температуре (20 ± 2) °С и равномерном белом освещении в диапазоне от 500 до 1000 лк.

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

Помещение с контролируемым температурным режимом или климатическая камера.

Примечание — Тестирование допускается проводить в инкубаторе при температуре (20 ± 2) °С в тест-контейнерах.

Тест-контейнеры и емкости из химически инертного материала и достаточной вместимостью (например, стеклянные пробирки и стаканы).

Пипетки для отбора тест-организмов достаточным диаметром для захвата *тест-организмов*, позволяющие захватить лишь малое количество среды.

Микропипетки из инертного пластика с луковицей на конце.

Емкости для отбора проб.

Сита (сетки 1,0 и 0,3 мм), которые могут быть использованы для перемещения взрослых *тест-организмов* в маточную культуру и позволяют отделить молодь от взрослых.

Тест-организмы: неонаты *Daphnia magna Straus.*

Примечание — Методы культивирования дафний приведены *в В.*4 *(приложение В).*

Модельный токсикант — по 5.2.

Примечание — Двухромовокислый калий ($K_2Cr_2O_7$) является канцерогенным веществом, которое может быть токсично при вдыхании; использование коммерчески доступных растворов с заданной концентраци-

ей $K_2Cr_2O_7$ для приготовления исходного раствора эталонного вещества может снизить риск вдыхания токсичной пыли в лаборатории.

Культивационная вода, приготовленная в соответствии с требованиями приложения Е.

Калий хлористый по ГОСТ 4234, х. ч.

Магний сернокислый 7-водный по ГОСТ 4523, х. ч.

Натрий углекислый однозамещенный по ГОСТ 4201, х. ч

Кислота борная по ГОСТ 9656, х. ч.

6.3 Отбор проб для тестирования — по разделу 4.

6.4 Подготовка к тестированию — *аналогично 5.3 с использованием* культивационной воды (Е.2, приложение Е) *и* тест-организмов (В.2., приложение В).

Примечание — Проверку физиологической чувствительности тест-организмов по отношению к модельному токсиканту (двухромовокислому калию) проводят по 5.3.3 в условиях тестирования по 6.5. При этом используют данные, приведенные в таблице А.4 (приложение А) и соответствующие статистические методы математического анализа для определения 24 ч $ЭК_{50}$ модельного токсиканта.

Значения 24 ч $ЭК_{50}$ модельного токсиканта должно находиться в пределах 0,6–2,1 мг/дм^3.

6.5 Проведение тестирования

6.5.1 Проводят тестирование по 5.4, с использованием тест-организмов по В.2 (приложение В).

Тестирование проводят в течение (48 ± 2) ч при температуре (20 ± 2)° С в помещении с регулируемой температурой (или в терморегулируемой камере) при переменном *воздействии* равномерного белого освещения в диапазоне 500 –1000 лк (16 ч свет / 8 ч темнота).

При проведении тестирования рекомендуется использовать *одинаковые емкости.*

6.5.2 При предварительном тестировании анализируемой пробы используют по одной емкости *для каждой заданной кратности разбавления (концентрации) пробы (включая контрольную).*

Пример проведения предварительного тестирования пробы сточной воды и установления *диапазона кратности разбавлений (концентраций) пробы, в пределах которого необходимо проводить окончательное тестирование,* приведен в А.4.1 приложения А.

6.5.3 Окончательное тестирование проводят с анализируемыми пробами, которые приготовлены с использованием коэффициента между *разбавлениями* (концентрациями) не более 3,2. Тестирование проводят в четырех емкостях как в анализируемой, так и в контрольной пробе.

Пример проведения окончательного тестирования пробы сточной воды для определения *значения средней эффективной кратности разбавления* 48 ч $ЭКР_{50}$ приведен в А.4.2 приложения А.

Примечание — В случае, если ожидаются крутые кривые концентрации/ответа, рекомендуется использовать коэффициент между разбавлениями не более 2,2 (например, 1,0; 1,8; 3,2; 5,6 и 10,0 мг/дм^3).

6.5.4 Для приготовления контрольной пробы используют культивационную воду (см. приложение Е).

6.5.5 При необходимости определяют 24 ч $ЭК_{50}$ (24 ч $ЭКР_{50}$), а также концентрации вещества *(разбавлений)*, соответствующие 0 %-ной и 100 %-ной иммобилизации тест–организмов за 48 ч.

6.6 Процедура тестирования — по 5.4.3 со следующими уточнениями:

6.6.1 В серию емкостей для тестирования вносят равные объемы анализируемой пробы. *Объем анализируемой пробы должен быть таким, чтобы при использовании необходимого количества тест–организмов их плотность не превышала одного организма на 10 см^3 пробы.* Допускается максимальная плотность посадки — один тест-организм на 2 см^3 анализируемой пробы.

6.6.2 Для каждой серии определений (разбавлений или концентраций) подготавливают *контрольную пробу* в отдельных емкостях, содержащую объем культивационной *воды,* равный объему анализируемого раствора одной из концентраций *вещества (разбавлений) и не менее пяти тест-организмов.*

6.6.3 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.

6.6.4 Тестирование трудно растворимых веществ проводят по 5.4.3 с использованием 20 тест-организмов и при одной концентрации, которая соответствует массовой концентрации 100 мг/дм^3 или концентрации, являющейся максимальной для растворения данного вещества.

6.6.5 После тестирования и подсчета неподвижных тест-организмов измеряют концентрацию растворенного кислорода и pH в анализируемых и контрольных пробах. Если концентрация растворенного кислорода ниже 2 мг O_2/дм^3, тестирование повторяют.

6.7 Обработка результатов — по 5.5 при *определении токсичности и токсикологических показателей анализируемых проб* за 48 ч.

6.8. При необходимости определяют минимальное неэффективное разбавление (LID).

Пример определения минимального неэффективного разбавления (LID) для сточной воды приведен в приложении D.

6.9 Оформление результатов — по 5.6.

При этом результаты испытаний считают достоверными если:

- иммобилизация тест-организмов в контрольных емкостях менее или равна 10 %;
- Значение 24 ч $ЭК_{50}$ модельного токсиканта находится в пределах 0,6 — 2,1 мг/дм^3.

6.10 Информация о результатах проведенных межлабораторных испытаний (метод В) приведена в приложении С.

Приложение А
(рекомендуемое)

Примеры определения средней эффективной концентрации *(разбавления)*

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

Результаты определения физиологической чувствительности околосуточных Daphnia magna Straus 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.			Среднеариф-метическое значение количества выживших тест-организмов, шт.	Процент гибели тест-организ-мов, %
		№ 1	№ 2	№ 3		
	0 (контрольная)	10	10	10	10	0
	0,10	10	10	10	10	0
24	0,25	9	9	9	9	10
	0,50	8	7	8	8	20
	1,00	6	5	6	6	40
	1,50	4	5	3	4	60
	2,00	1	1	1	1	90
	2,50	0	0	0	0	100

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

Получают значение 24 ч $ЭК_{50}$ для указанного модельного токсиканта, равное 1,26 мг/дм^3, которое входит в диапазон концентраций, указанный в 5.3.3.4 настоящего стандарта. Следовательно, использованные тест-организмы пригодны для тестирования.

А.2 Примеры определения средней эффективной концентрации вещества при тестировании по методу А

А.2.1 Пример проведения предварительного тестирования по 5.4.1 настоящего стандарта для выбора диапазона концентраций вещества, в пределах которого необходимо провести окончательное тестирование, приведен в таблице А.2.

Таблица А.2

Продолжительность тестирования, ч	*Массовая концентрация вещества, мг/дм^3*	*Количество выживших тест-организмов в емкостях, шт.*		*Среднеарифметическое значение количества выживших тест-организмов, шт.*	*Процент гибели тест-организмов, %*
		№ 1	*№ 2*		
	0 (контрольная проба)	*10*	*10*	*10*	*0*
	0,1	*10*	*10*	*10*	*0*
48	*1,00*	*9*	*9*	*9*	*10*
	10,0	*6*	*4*	*5*	*50*
	100,0	*1*	*1*	*1*	*90*
	1000,0	*0*	*0*	*0*	*100*

Из данных таблицы А.2 следует, что диапазон концентраций вещества, в пределах которого необходимо проводить окончательное тестирование, составляет от 1,0 до 100 мг/дм^3.

А.2.2 Пример проведения окончательного тестирования по 5.4.2 настоящего стандарта приведен в таблице А.3.

Таблица А.3

Продолжительность тестирования, ч	Массовая концентрация вещества, мг/дм^3	Количество выживших тест-организмов в емкостях, шт.			Среднеарифметическое значение количества выживших тест-организмов, шт.	Процент гибели тест-организмов, %
		№ 1	№ 2	№ 3		
	0 (контрольная проба)	10	10	10	10	0
	1,0	8	10	9	9	10
48	2,5	9	8	7	8	20
	5,0	6	7	8	7	30
	10,0	5	6	4	5	50
	100,0	1	1	1	1	90

Из данных таблицы А.3 видно, что 50 %-ной гибели тест-организмов соответствует массовая концентрация вещества, равная 10,0 мг/дм^3 при тестировании в течение 48 ч (48 ч $ЭК_{50}$).

Если значение массовой концентрации вещества, которое соответствует 50 %-ной гибели тест-организмов при тестировании в течение 48 ч, не зарегистрировано (таблица А.4), то его определяют, используя для обработки результатов тестирования пробит-анализ аналогично А.3.

Таблица А.4

Продолжительность тестирования, ч	Массовая концентрация вещества, мг/дм^3	Количество выживших тест-организмов в емкостях, шт.			Среднеарифметическое значение количества выживших тест-организмов, шт.	Процент гибели тест-организмов, %
		№ 1	№ 2	№ 3		
	0 (контрольная проба)	10	10	10	10	0
	1,0	10	10	10	10	0
48	2,5	9	8	7	8	20
	5,0	5	6	7	6	40
	10,0	5	4	3	4	60
	100,0	1	1	1	1	90

А.3 Примеры обработки результатов тестирования с использованием пробит-анализа (метод А)

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

Таблица А.5

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

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

Таблица А.6

Кратность разбавления анализируемой пробы сточной воды С, %	*Десятичный логарифм кратности разбавления (lg С)*	*Процент гибели тест-организмов, %*	*Значения пробитов по таблице А.5*
3,12	*0,494*	*0*	–
6,25	*0,796*	*0*	–
12,50	*1,097*	*10*	*3,72*
25,00	*1,398*	*40*	*4,75*
50,00	*1,699*	*80*	*5,84*
100,00	*2,000*	*95*	*6,64*
Примечание — Данные, приведенные в настоящей таблице, получены в результате тестирования анализируемой пробы сточной воды по методу А в течение 96 ч.			

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

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

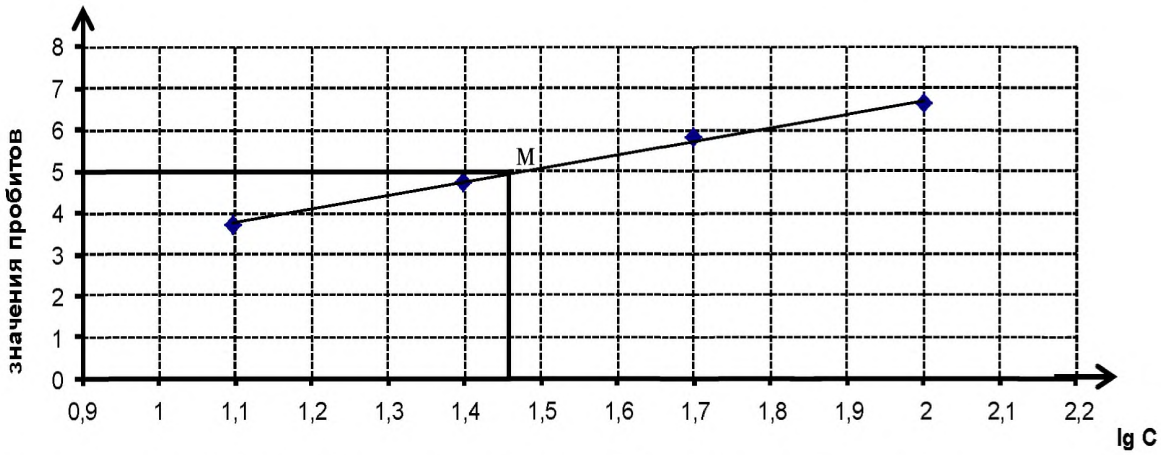


Рисунок А.1 — График линейной зависимости значений пробитов от десятичного логарифма кратности разбавлений анализируемой *пробы* сточной воды

А.3.4 На графике (рисунок А.1) на оси ординат из точки, соответствующей значению пробита пять, что определяет 50 %-ную гибель тест-организмов, 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 1,46, соответствующее 96 ч $ЭКР_{50}$.

Используя таблицу антилогарифмов, определяют значение кратности разбавления 96 ч $ЭКР_{50}$, соответствующее 50 %-ной гибели тест-организмов за 96 ч, которое равно 28,84 %.

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

А.4 Примеры определения средней эффективной кратности разбавления сточной воды при тестировании по методу В

А.4.1 Пример проведения предварительного тестирования пробы сточной воды по 6.5.2 для выбора диапазона кратности разбавлений пробы, в пределах которого необходимо провести окончательное тестирование, приведен в таблице А.7.

Таблица А.7

Кратность разбавления анализируемой пробы сточной воды С, %	Количество не потерявших подвижность тест-организмов, шт., после тестирования в течение	
	24 ч	48 ч
0 (контрольная проба)	-	5
90	-	0
35	-	0
10	-	0
3,5	-	0
1	-	0
0,35	-	5
0,1	-	5
0,035	-	5
0,01	-	5

Из данных таблицы А.7 следует, что диапазон кратности разбавлений сточной воды, в пределах которого необходимо проводить окончательное тестирование, составляет от 0,1 % до 1,0 %.

А.4.2 Пример проведения окончательного тестирования по 6.5.3 настоящего стандарта приведен в таблице А.8.

Таблица А.8

Продолжительность тестирования, ч	Кратность разбавления анализируемой пробы сточной воды С, %	Количество не потерявших подвижность тест-организмов в емкостях, шт.				Общее количество не потерявших подвижность тест-организмов, шт.	Процент иммоби-лизации тест-организмов, %
		№ 1	№ 2	№ 3	№ 4		
	0 (контрольная проба)	5	5	5	5	20	0
	0,35	5	5	3	4	17	15
48	0,48	2	3	4	3	12	40
	0,62	3	1	1	2	7	65
	0,80	1	0	2	1	4	80
	1,0	0	1	0	0	1	95

А.4.3 По результатам тестирования в течение 48 ч, приведенным в таблице А.8, 50 %-ной иммобилизации (обездвиживания) тест-организмов не зарегистрировано. В этом случае для обработки результатов тестирования применяют графический метод определения значения 48 ч $ЭКР_{50}$, как указано ниже.

А.4.4 Используя данные таблицы А.8 на логарифмической шкале Гаусса (см. рисунок А.2) по оси абцисс откладывают кратность разбавления сточной воды (φ) в процентах, а по оси ординат — соответствующие значения иммобилизации тест-организмов (у) в процентах. По полученным точкам (A, B, C, D, E) путем графической интерполяции строят график зависимости φ от у (рисунок А.2).

На оси ординат откладывают точку, соответствующую значению 48 ч $ЭКР_{50}$ и из нее проводят прямую, параллельную оси абсцисс до пересечения с прямой AE и находят точку N. Точке N на оси абсцисс соответствует значение φ=0,55%, т.е. эффективная кратность разбавления сточной воды 48 ч $ЭКР_{50}$ равна 0,55 %.

Допускается использовать пробит анализ (см. приложение А) и другие статистические методы математического анализа для определения 48 $ЭК_{50}$ по методу В.

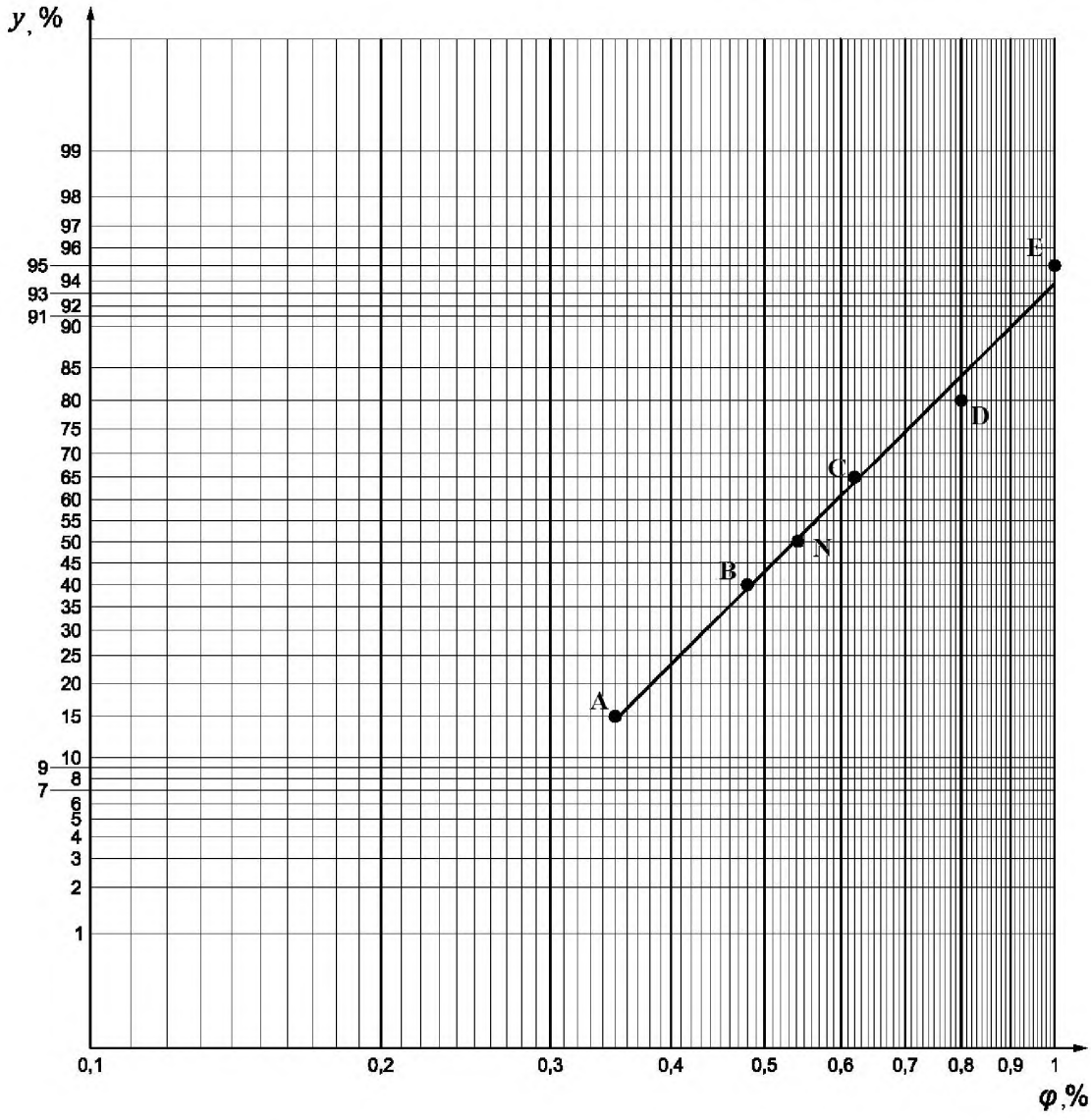


Рисунок А.2 — График зависимости числа иммобилизации тест-организмов φ в процентах от кратности разбавления сточной воды у в процентах.

Приложение В
(обязательное)

Методы культивирования тест-организмов

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

В.1.1 Исходный материал для культивирования тест-организмов Daphnia magna Straus получают в лабораториях, занимающихся тестированием, имеющих культуру требуемой видовой принадлежности. Чувствительность культур к модельному токсиканту должна соответствовать установленному в настоящем стандарте диапазону $ЭК_{50}$ за 24 ч (методы А и В).

Тест-организмы культивируют и содержат в климатостате, в инкубаторе или в помещении с регулируемой температурой (20 ± 2) °С.

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 *Daphnia magna Straus* необходимо защищать от воздействия прямого солнечного света.

Тест-организмы и культивационная вода, в которой проводят их культивирование, должны содержаться в емкостях только из стекла или *полимерного материала, изготовленного без использования пластификатора.*

Примечания

1 Тест-организмы — пресноводные ракообразные *Daphnia magna* Straus: имеют широкое географическое распространение, обладают коротким жизненным циклом и требуют минимум пространства и оборудования для культивирования и проведения тестирования. Тест-организмы можно культивировать постоянно в лабораторных условиях.

2 Развитие ракообразных Daphnia magna Straus проходит через три стадии: новорожденный организм, молодь и взрослые особи. При температуре 20 °С развитие только что вылупившихся новорожденных организмов до взрослой стадии проходит через 7 сут. Новорожденные дафнии выпускаются непосредственно из яйцевого мешка женской особью Daphnia magna Straus в течение 1–2 сут.

В.1.2 Вода для культивирования тест-организмов *по 5.3.2 и* 5.2 настоящего стандарта *(далее — культивационная вода)* должна соответствовать условиям тестирования [см. 5.3.2 и Е.1 (приложение Е)].

В.1.3 Емкости, применяемые для культивирования тест-организмов, должны быть оснащены свободными или перфорированными крышками, чтобы уменьшить испарение, но обеспечить газообмен.

В.1.4 Емкости тщательно моют при каждой замене культивационной воды.

В.1.5 В качестве корма используют культуры пресноводных одноклеточных водорослей Scenedesmus qvadricauda или Chlorella vulgaris (десятисуточную).

В.2 Условия подготовки к тестированию Daphnia magna Straus.

В.2.1 Оборудование и процедура получения молоди

Для тестирования используют околосуточных Daphnia magna Straus (синхронизированная культура), которых получают в лаборатории следующим способом:

- в стакан вместимостью 500 $см^3$ с культивационной водой из емкости с маточной культурой помещают 40 шт. взрослых особей Daphnia magna Straus, кормят по В 2.3 и выдерживают 1 — 2 сут.

Примечание — Культивационную воду готовят по 5.3.2 или приложению Е;

- через одни сутки новорожденные организмы, по мере их выклева в течение суток, отбирают трубочкой и помещают в чистый стакан с культивационной водой;

- затем околосуточную молодь (синхронизированную культуру) используют *в эксперименте.*

В.2.2 Регулирование плотности популяции

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

В течение 1 — 8 ч накопившиеся новорожденные тест-организмы переносят пипеткой в отдельный сосуд с культивационной водой и используют для тестирования.

Предварительную адаптацию к культивационной воде неонатов Daphnia magna Straus не проводят.

В.2.3 Кормление

Околосуточную молодь Daphnia magna Straus при тестировании не кормят.

В.3 Условия культивирования маточной культуры *Daphnia magna* Straus по методу А

В.3.1 Для культивирования маточной культуры *Daphnia magna Straus* используют небольшие стеклянные емкости (например, кристаллизаторы) объемом 1-3 $дм^3$, плотность посадки 20–25 особей на 1 $дм^3$.

Емкости для культивирования заполняют на ¾ объема культивационной водой и помещают туда самок дафний среднего размера с выводковыми камерами, заполненными эмбрионами и неплотно прикрывают пластинами из стекла или оргстекла толщиной не менее 6 мм (от попадания пыли и для уменьшения испарения). Для пересадки в емкости для культивирования допускается отбирать взрослых самок с использованием фильтрования культуры через крупное сито с отверстиями размеров ячеек 1800–2200 мкм.

Маточную культуру Daphnia magna Straus поддерживают в одной или двух емкостях. Ежедневно с поверхности воды емкостей, в которых культивируют тест-организмы, марлевой салфеткой снимают дрожжевую и бактериальную пленку. После этого воду вместе с рачками осторожно переливают в чистую емкость так, чтобы накопившийся осадок остался на дне. В чистую емкость добавляют свежую культивационную воду.

Таким способом, ежедневно проводят очистку поверхности воды и дна емкости, в которой культивируются рачки. Кормление маточной культуры дафний осуществляют ежедневно в соответствии с требованиями п. Б.3.3. Содержание растворенного кислорода в воде емкости должно быть не менее 6 мгO_2/дм^3, что достигается приготовлением культивационной воды по 5.3.2 и регулярной пересадкой дафний в свежую культивационную воду. Аэрирование воды в емкостях с дафниями при культивировании не допускается.

Один или два раза в неделю осуществляют пересадку маточной культуры в свежую культивационную воду. Частоту пересадки определяют плотностью маточной культуры и содержанием растворенного кислорода в культивируемых емкостях (плотность маточной культуры 20-25 особей на 1 дм^3 культивационной воды).

Не допускается использование молоди маточной культуры для тестирования.

Появившуюся молодь в необходимом количестве отсаживают в отдельные емкости от поколения к поколению. Когда вновь народившиеся тест-организмы начинают размножаться, материнские особи удаляют. Каждое поколение маркируют и на емкости ставят дату рождения. Одновременно в лаборатории содержат культуры двух поколений.

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

Длительное культивирование тест-организмов в лабораторных условиях позволяет устанавливать пределы изменчивости основных биологических показателей в зависимости от сезона. В оптимальных условиях содержания выживаемость тест-организмов не зависит от времени года. Средние значения плодовитости за 30 сут составляют от 60 до 170 экземпляров молоди на одну самку (за это время получают 7–8 пометов). Могут наблюдаться повторяющиеся снижения плодовитости тест-организмов в зимний (ноябрь–январь) и летний (июнь–июль) периоды. Длительность культивирования тест-организмов в лаборатории в оптимальных условиях даже в течение 10 лет не влияет на результаты опытов.

Этот вид является бетамезосапробом, перенося осолонение до 6 г/дм^3. Оптимальное содержание кислорода для тест-организмов составляет 7–8 мг O_2/дм^3 *однако тест-организмы способны переносить снижение концентрации кислорода до 2* мг O_2/дм^3.

В.3.2 Адаптация Daphnia magna Straus к среде с повышенной минерализацией

При необходимости биотестирования проб воды или различных водных вытяжек из проб отработанных буровых растворов, донных отложений, твердых промышленных отходов, грунтов и почв с общим содержанием солей свыше 3 г/дм^3 выращивают культуру Daphnia magna Straus, *адаптированную к повышенной минерализации среды. Для этого в воду, в которой культивируют Daphnia magna* Straus, *минерализация которой известна, постепенно порциями добавляют хлористый натрий. В начале его вносят из расчета 500 мг/дм^3. Затем постепенно через неделю минерализацию воды повышают на 250 мг/ дм^3 и повторяют каждую неделю до тех пор, пока содержание солей в среде не достигнет нужного уровня (но не свыше 6 г/дм^3 с учетом начальной минерализации). В дальнейшем достигнутый уровень минерализации среды поддерживают постоянно.*

Эта же среда служит контролем при тестировании и в качестве воды для разбавлений. Адаптированную культуру Daphnia magna Straus *к повышенному содержанию солей 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.*

В.3.3 Кормление

Тест-организмы *Daphnia magna* Straus кормят двумя видами одноклеточных водорослей, выращиваемых в лабораторных условиях, Scenedesmus qvadricauda *и Chlorella vulgaris.* Эти водоросли выращивают с использованием асептической технологии, чтобы исключить заражение культуры бактериями, водорослями и простейшими организмами. Для выращивания водорослей *Scenedesmus qvadricauda и Chlorella vulgaris* используют питательную среду Прата.

Исходные растворы № 1 — № 4 для приготовления питательной среды Прата готовят на дистиллированной воде из реактивов, вносимых в количествах, приведенных в таблице В.1.

Исходные растворы хранят при температуре 0 ^{0}С — 4 ^{0}С не более года.

Питательную среду Прата готовят следующим способом: в мерную стеклянную колбу вместимостью 1000 см^3 вносят дистиллированную воду до метки, затем переливают в колбу вместимостью 2000 см^3 и добавляют по 1 см^3 исходных растворов № 1, № 2 и № 3 (см. таблицу В.3), перемешивают, плотно закрывают ватно-марлевой пробкой и колпачком, затем кипятят на водяной бане в течение 15 мин, после чего содер-

жимое охлаждают. После охлаждения через 24 ч добавляют 1 см^3 исходного раствора № 4, снова перемешивают, плотно закрывают ватно-марлевой пробкой и колпачком.

Т а б л и ц а В.1 — Состав питательной среды Прата для метода А

Номер исходного раствора	Наименование реактива	Массовая концентрация реактива в исходном растворе, мг/дм^3	Массовая концентрация реактива в питательной среде, мг/дм^3
1	Калий азотнокислый по ГОСТ 4217 (KNO_3)	100000	100,0
2	Магний сернокислый 7-водный по ГОСТ 4523 ($MgS0_47H_20$)	10000	10,0
3	Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный по ГОСТ 2493 ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)	10000	10,0
4	Хлорид железа 6-водный по ГОСТ 4147 ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	1000	1,0

Приготовленную питательную среду Прата хранят в условиях, исключающих воздействие света, при температуре (20 ± 5) °С не более одного года.

Культивирование водорослей для кормления тест-организмов проводят следующим способом: в колбу объемом 500 см^3 с питательной средой (объем среды — 300 см^3) добавляют 15 см^3 суспензии водорослей из маточной культуры и выращивают водоросли [при температуре (20 ± 2) °С и освещенности 3000 лк] в течение 10 сут. Через 10 сут, когда плотность клеток обычно достигает максимума (10^7 клеток/см^3 — для *Scenedesmus qvadricauda и Chlorella vulgaris), культуры водорослей сгущают* (концентрируют) с помощью центрифуги и размешивают до состояния суспензии, разбавляя дистиллированной водой. Таким способом получают суспензию водорослей, предназначенную для корма тест-организмов, плотность которой достигает примерно $5 \cdot 10^7$ клеток/см^3 для *Scenedesmus qvadricauda и Chlorella vulgaris.* Суспензию водорослей, предназначенную для кормления тест-организмов, хранят в холодильнике *при температуре от 0 °С до 4 °С не более* 7 сут.

В качестве дополнительного корма для маточных культур дафний используют сухие пекарские дрожжи. Для приготовления суспензии берут 1 г сухих дрожжей и растворяют в 100 см^3 дистиллированной воды. Затем полученную суспензию вносят в аквариум с дафниями 1–2 раза в неделю из расчета 3 см^3 (1 %-ной суспензии) на 1 дм^3. Суспензию дрожжей хранят в холодильнике не более 3 сут.

Допускается использовать и другие питательные среды (*например, Успенского №1 или Тамия). Характеристики используемых питательных сред приведены в таблице В.2.*

Т а б л и ц а В.2. — Характеристики используемых питательных сред для культивирования кормовых водорослей (метод А)

Номер исходного раствора	*Наименование реактива*	*Массовая концентрация реактива в питательной среде Успенского №1, Г/дм^3*	*Массовая концентрация реактива в питательной среде Тамия, Г/дм^3*
1	*Калий азотнокислый по ГОСТ 4217 (KNO_3)*	*0,025*	*5,00*
2	*Магний сернокислый 7-водный по ГОСТ 4523 ($MgS0_4 \cdot 7H_20$)*	*0,025*	*2,50*
3	*Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный по ГОСТ 2493 ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)*	-	-
4	*Калий фосфорнокислый однозамещенный 3-водный по ГОСТ 4198 ($KH_2PO_4 \cdot 3H_2O$)*	*0,025*	*1,25*
5	*Калий углекислый или (двууглекислый калий) (KCO_3 или K_2CO_3)*	*0,0345*	-

Окончание таблицы В.2

Номер исходного раствора	*Наименование реактива*	*Массовая концентрация реактива в питательной среде Успенского №1, Г/дм^3*	*Массовая концентрация реактива в питательной среде Тамия, Г/дм^3*
6	*Железо сернокислое 7-водное по ГОСТ 4148 ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)*	-	*0,003*
7	*Железо (III) хлорид 6-водный по ГОСТ 4147 ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)*	-	-
8	*Кальций азотнокислый 4-водный по ГОСТ 4142 ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4 H_2O$)*	*0,144*	-
Микроэлементы	*Раствор № 1*	-	-
	Раствор № 2	-	-

Примечания

1 Состав раствора № 1: борная кислота (H_2BO_3)– 2,86 г/дм^3; хлористый марганец 4-водный ($MnCl_2 \cdot 4 H_2O$) — 1, 81г/дм^3; сернокислый цинк 7-водный ($ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$) — 0,222 г/дм^3. Раствор №2: окись молибдена (MoO_3) — 17, 64 мг/дм^3; аммоний ваннадиевокислый (NH_4VO_3) – 22,96 мг/дм^3. Объем каждого из добавляемых растворов №1 и №2 в питательную среду составляет 1 см^3.

2 Питательные среды для водорослей готовят на дистиллированной воде. Растворы солей микроэлементов можно добавлять во все среды независимо от того, указано это в прописи или нет.

В.4 Условия культивирования Daphnia magna Straus (метод В)

Общие рекомендации для культивирования тест-организмов

В.4.1 Исходная плотность культуры должна быть в пределах 25—50 организмов в 1 дм^3.

Примечание — Исходная плотность культуры должна быть на уровне культуры,используемой в опыте. Например плотность культуры 25 тест-организмов в 1 дм^3 можно использовать для проведения опытов с 5 тест-организмами в 200 см^3 опытного раствора.

Культуру *Daphnia magna Straus* следует кормить одноклеточными *водорослями* (*Scenedesmus qvadricauda или Chlorella vulgaris)* из лабораторной культуры. Водоросли для корма должны быть в экспоненциальной фазе роста. Культивируемые для кормления *Daphnia magna* Straus одноклеточные водоросли можно использовать до тех пор, пока они не будут проявлять признаков нарушения (деградации) популяции. Кормовые водоросли не следует хранить долгое время при комнатной температуре, т. к. это приведет к ухудшению состояния культуры водорослей. Ее следует хранить в холодильнике в темноте или даже можно заморозить и кормить дафний до тех пор, пока не ухудшится их состояние и снизится репродукция. Нельзя допускать передозировку при кормлении. Культура *Daphnia magna Straus* должна получать 0,1—0,2 мг углерода в расчете на 1 организм в день. Для того чтобы избежать попадания среды культивирования водорослей в культуру дафний, рекомендуется отделить водоросли от культуральной среды и перенести их в среду культивирования дафний.

При выращивании маточной культуры *Daphnia magna Straus* необходимо поддерживать постоянный режим культивирования. Среду следует менять, не менее чем 2—3 раза в неделю. Переносят взрослых особей в чистый сосуд с новой средой и отделяют вылупившиеся тест-организмы от взрослых особей. Удаляют шкурки тест-организмов, сбрасываемые при линьке, мертвых или обесцвеченных животных, а также остатки корма.

Культивирование *Daphnia magna Straus* осуществляют при рассеянном дневном свете или искусственном освещении с периодичностью свет — темнота соответственно 16 и 8 ч. Температуру воздуха поддерживают в пределах (20 ± 2) °С, в воздухе не должны присутствовать токсичные для дафний пары и пыль.

В.4.2 Культивирование *Daphnia magna Straus* для получения покоящихся (зимних) яиц

В.4.2.1 Жизненный цикл *Daphnia magna* Straus (рисунок В. 1)

В природе дафнии могут размножаться как бесполым, так и половым путем.

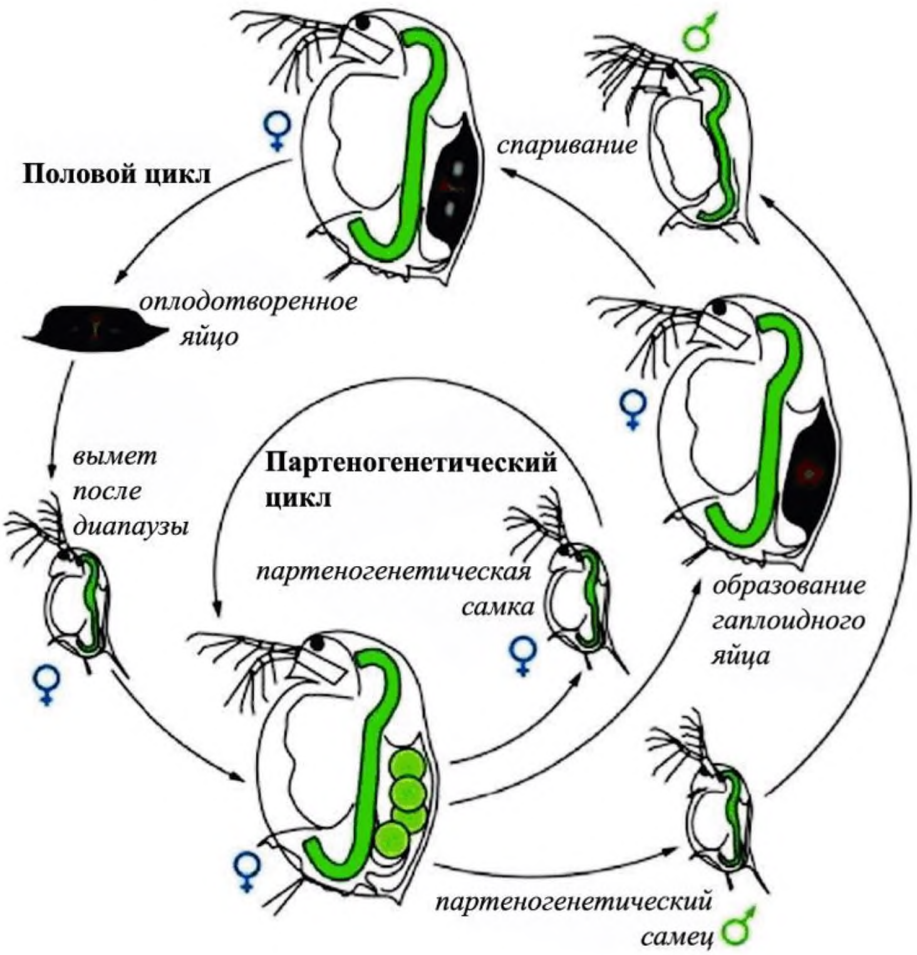


Рисунок В.1 — Цикл развития *Daphnia magna Straus*

Однако в интенсивных культурах дафнии размножаются только бесполым способом, при этом рождаются только (диплоидные) самки. Взрослые дафнии выметывают партеногенетические яйца, которые развиваются в дорзальной (спинной) выводковой камере, из которых получается живое потомство. В процессе роста молодь дафний проходит последовательные ювенильные стадии (рисунок В.1) и только после этого дафнии начинают продуцировать яйца.

При определенных условиях внешней среды (которые в научной литературе называют «стрессовые») дафнии переходят от бесполого к половому способу размножения, в результате чего образуются (гаплоидные) самцы, а также (гаплоидные) яйца, которые оплодотворяются самцами.

В дальнейшем у самок образуется защитное дорзальное седлышко (эфиппиум), в котором размещаются два оплодотворенных яйца (покоящиеся или зимние яйца).

В.4.2.2 — Жизненный цикл *Daphnia magna Straus*

При очередной линьке эфиппиум отделяется вместе с яйцами и падает на дно. Зимние яйца обычно проходят стадию покоя (она может занимать несколько месяцев), в течение которой яйца не реагируют ни на какие внешние воздействия, стимулирующие эмбриональное развитие и рождение неонатов.

В.4.2.3 Культивирование *Daphnia magna Straus* для получения покоящихся (зимних) яиц

Экстремальные условия, стимулирующие половой способ размножения дафний, моделируют в лабораторных условиях на зимних яйцах. Эфиппиумы сохраняют и обеспечивают получение необходимого биологического материала к моменту проведения токсикологических опытов.

Для культивирования дафний с целью получения зимних яиц используют любые емкости подходящего объема в зависимости от количества требуемых для опыта эфиппиумов.

Культивирование и кормление дафний осуществляют таким же способом, как при выращивании лабораторной культуры. Получают зимние яйца из той же популяции дафний.

При хорошем кормлении плотность популяции в культурах постепенно увеличивается, достигая значения 1000-2000 дафний/дм^3.

Переход от бесполого к половому размножению обеспечивается двумя факторами: плотностью популяции (повышенная численность) и недостатком корма.

Точные значения этих двух факторов и длительность перехода от бесполого к половому размножению полностью зависят от специфических конкретных условий культивирования и определяются экспериментальным путем.

Начало полового размножения можно определить с помощью регулярных микроскопических наблюдений за культурами, в которых появятся самцы (они меньше самок), а также самки с эфиппиумами.

После того, как самки сбросили свои эфиппиумы, последние можно собрать на дне сосуда для культивирования.

Эфиппиумы следует хранить в холодильнике (при 4 °С) в темноте в трубках с водопроводной или природной водой.

С учетом фазы покоя зимние яйца после вымета хранят в течение 3 мес, чтобы получить жизнеспособное потомство. Живые неонаты получают даже спустя 1–2 года при условии, что зимние яйца хранили при оптимальных условиях.

В.4.2.4 Выклев неонатов из эфиппиумов

Два основных фактора для запуска процесса эмбрионального развития оплодотворенных яиц — это свет и температура.

В лабораторных условиях продолжительность развития оплодотворенных яиц до появления неонатов составляет 72 ч.

Для получения неонатов эфиппиумы переносят в чашку Петри с той же культивационной средой, которая описана выше для культивирования дафний. Чашку Петри с тест-организмами инкубируют 72 ч при температуре (20 ± 1) °С и интенсивности освещения примерно 6000 люкс.

В.4.2.5 Контроль качества

Неонаты дафний, вылупившиеся из зимних яиц, должны полностью соответствовать требованиям, которые предъявляют к тест-организмам, полученным из лабораторных культур.

Для контроля их соответствия указанным требованиям проверяют чувствительность неонатов, полученных из эфиппиумов, к бихромату калия, при этом значение 24 ч $ЭК_{50}$ должно быть в диапазоне 0,6–2,1 мг/дм^3.

Приложение С
(справочное)

Информация о результатах проведенных межлабораторных испытаний (*метод В)*

С.1. В 1978 г. под контролем комиссии Европейских стран проводились испытания следующих веществ (в качестве токсикантов):

- тетрапропиленбензолсульфонат (ТПБС № 1);
- тетрапропиленбензолсульфонат (ТПБС № 2);
- 2,4,5-трихлор ... (соль калия 2,4,5-Т).

*Результаты межлабораторных испытаний указанных веществ (рассмотренные в соответствии с ИСО 5725), приведены в таблице С.1.

Таблица С.1

Вещество	Число участвующих лабораторий	Число исключенных лабораторий	Число использованных результатов	Средняя 24 ч $ЭК_{50}$, мг/дм3	Стандартное отклонение			
					в условиях повторяемости		в условиях воспроизводимости	
					Абсолютное значение, мг/дм^3	Относительное значение, %	Абсолютное значение, мг/дм^3	Относительное значение, %
$K_2Cr_2O_7$	36	2	1 697	1,12	0,06	5	0,56	50
ТПБС № 1	36	4	108	27,45	3,95	14,4	8,32	30
ТПБС № 2	31	4	84	27,02	3,24	12	9,51	35
Соль калия 2,4,5-Т	32	4	72	772,25	64,5	8,3	277,8	35,9

Примечание — Данные *для Daphnia magna Straus* приведены по результатам *тестирования* в течение 24 ч.

* ИСО 5725-2:2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений.

Приложение D
(справочное)

Пример определения минимального неэффективного разбавления (LID) для сточной воды (метод В)

D.1 Уровень разбавления *D*, сточной воды, соответствующий максимальной кратности разбавления, при которой не наблюдается ингибирование или отмечается незначительный эффект в изменении контролируемых параметров тест-организмов, не выходящий за пределы вариабельности опыта, выражается как минимальное неэффективное разбавление (LID). Уровень разбавления *D* представляет собой обратное значение объемной доли сточной воды в анализируемом объеме [например, если соотношение содержания сточной воды и воды для разбавления составляет 1 : 4 (25 % объемной доли), то уровень разбавления *D*=4)].

При тестировании для определения LID используют по 10 дафний в каждой емкости каждого разбавления и в контрольной пробе.

D.2 Приготовление пробы сточной воды и подготовка к тестированию

Пробы готовят в соответствии с 5.3.4.2 настоящего стандарта.

Пробу гомогенизируют.

Готовят серии необходимых разбавлений проб в соответствии с таблицей D.1.

Разбавления проб готовят в соответствии с геометрическими прогрессиями (*D*=2, 4, 8, 16, и т. д. и D=3, 6, 12, 24 и т. д).

Т а б л и ц а D.1 — Приготовление серий разбавлений

Разбавление	Уровень разбавления *D*	Объем пробы сточной воды, $см^3$	Объем воды для разбавления, $см^3$
Контрольная проба	—	—	100
Анализируемая проба	—	—	—
1 : 1	1	100	—
1 : 2	2	50	50
1 : 3	3	33,33	66,67
1 : 4	4	25,0	75,00
1 : 6	6	16,67	83,33
1 : 8	8	12,5	87,50
1 : 12	12	8,33	91,67
1 : 16	16	6,25	93,75
1 : 24	24	4,17	95,83
1 : 32	32	3,13	96,87

D.3 Процедура тестирования

Проводят тестирование в соответствии с требованиями 5.4., 6.5.2. и 6.5.3 настоящего стандарта.

D.4 Обработка результатов

Обработку результатов проводят по 5.5.3, аналогично определению $ЭКР_{50}$($ЭК_{50}$).

Определяют минимальное значение *D* (LID), при котором примерно 90 % тест-организмов подвижны. Этот уровень разбавления оценивают как результат.

Приложение Е
(рекомендуемое)

Приготовление культивационной воды для культивирования *Daphnia magna* Straus и воды для разбавления (метод В)

Е.1 Приготовление культивационной воды и воды для разбавления

Природную воду (поверхностную или грунтовую) или дехлорированную воду из-под крана используют как 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. Природную воду используют для культивирования и разбавления (таблица Е.1), если вода соответствует следующим требованиям:

- pH — (7,3–8,3) ед. pH;
- жесткость общая — (225±50,0) мг/дм^3 по $CaCO_3$ (4,5±1,0) °Ж;
- концентрация растворенного кислорода — не менее 7 мг O_2/дм^3;
- *температура* — (20 ± 2) °С;
- *минерализация — не выше 6,0 г/дм^3.*

Допускается использовать в качестве воды для разбавления анализируемых объектов воду, приготовленную с использованием дистиллированной воды, имеющей удельную электрическую проводимость не более 10 мкСм/см, из растворов, состав которых приведен в таблице Е.1

Т а б л и ц а Е.1 Приготовление воды для разбавления

Наименование реактива		Масса реактива на 1 дм^3 дистиллированной воды, г
1	хлористый кальций 2-водный ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), х. ч.	11,76
2	сернокислый магний 7-водный ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), х. ч.	4,93
3	бикарбонат натрия ($NaHCO_3$)	2,59
4	хлористый калий (KCl)	0,23

Воду для разбавления анализируемых объектов готовят путем смешивания указанных в таблице Е.1 растворов : в емкость вместимостью 1 дм^3 вносят по 25 см^3 каждого из растворов и доливают до метки дистиллированной водой с удельной электрической проводимостью не более 10 мкСм/см.

Приготовленная вода должна соответствовать следующим требованиям: pH (7,8 ± 0,5) ед. pH, жесткость (225 ± 50) мг/дм^3 по $CaCO_3$ (4,5 ± 1,0) °Ж; молярное соотношение Ca/Mg близкое 4 : 1; концентрация растворенного кислорода примерно 7 мг O_2/дм^3.

Приготовленную воду аэрируют до того, как содержание растворенного кислорода достигнет предела насыщения и pH стабилизируется. Измеряют pH и при необходимости доводят pH до 7,8 ± 0,5 путем добавления раствора гидроксида натрия (NaOH = 1 моль/дм^3) или соляной кислоты (HCl = 1моль/дм^3). Воду для растворения, приготовленную указанным способом, до применения не аэрируют.

Приложение ДА
(справочное)

Текст международного стандарта ИСО 6341:2012, не вошедший в настоящий стандарт

В настоящий стандарт не включены:

- термин 3.1 в связи с тем, что он является самоопределяющимся.

«3.1. **Контроль партии**: Серия повторов, содержащих контрольный раствор»;

6.3, второй и третий абзацы, в части применения культивационной среды Элендта М4 и способа ее приготовления, указанных в приложении А, в связи с ограниченной возможностью применения для анализа проб, содержащих металлы.

«Для культуры *Daphnia magna* *Straus* в лаборатории можно также использовать Среду М4 (см. приложение А).

Примечание 1 — Среду М4 (приложение А) не следует использовать в качестве воды для разбавления анализируемых проб, содержащих двухвалентные ионы металлов. Вещество ЕДТА, содержащееся в этой среде, может уменьшить их бионакопление, что приведет к уменьшению токсичности. По той же самой причине среду М4 не следует использовать в качестве воды для разбавления анализируемых проб неизвестного состава».

Полный текст приложения А приведен ниже:

« Приговление среды Элендта М4

А.1 Общие положения

В этом приложении содержатся сведения о приготовлении среды М4 на основе маточных растворов.

А.2 Микроэлементы

Используя вещества и микроэлементы, указанные в таблице А.1 и таблице А.2 и чистую воду (6.2) готовят маточный раствор № 1 и маточный раствор № 2, составы которых приведены в таблице 1 и таблице 2 соответственно.

Таблица А.1 — Состав маточного раствора №1

Маточный раствор №1 (отдельные вещества)	Концентрация в чистой воде, мг/дм^3	Концентрация по отношению к среде М4	Объем маточного раствора, добавляемого при приготовлении среды, см^3/дм^3
H_3BO_3	57190	20000 раз	1,0
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	7210	20000 раз	1,0
LiCl	6120	20000 раз	1.0
RbCl	1420	20000 раз	1,0
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$	3040	20000 раз	1,0
NaBr	320	20000 раз	1,0
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	1260	20000 раз	1,0
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	335	20000 раз	1,0
$ZnCl_2$	260	20000 раз	1,0
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	200	20000 раз	1,0

Окончание таблицы А.1

Маточный раствор №1 (отдельные вещества)	Концентрация в чистой воде, мг/дм^3	Концентрация по отношению к среде М4	Объем маточного раствора, добавляемого при приготовлении среды, см^3/дм^3
KI	65	20000 раз	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20000 раз	1,0
NH_4VO_3	11,5	20000 раз	1,0
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$[a)]	5000	2000 раз	–
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ [b)]	1991	2 000 раз	–

а) Растворы Na_2EDTA и $FeSO_4$ готовят отдельно.

б) Растворяют 5000 мг $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ в чистой воде (6.2) и доводят до 500 см^3 чистой водой. Растворяют 1991 мг $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ в чистой воде (6.2) и доводят до 500 см^3 чистой водой. Смешивают эти растворы и сразу автоклавируют.

Хранят раствор в темноте.

Т а б л и ц а А.2 — Состав маточного раствора № 2

Маточные растворы	Концентрация в чистой воде, мг/дм^3	Концентрация (по отношению к среде М4)	Объем маточного раствора, добавляемого при приготовлении среды М4, см^3/дм^3
Маточный раствор № 2 (комбинированные микроэлементы)	—	20 раз	50
	Маточные растворы макроэлементов (отдельные вещества)		
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293 800	1 000 раз	1,0
$MgSO_2 \cdot 7H_2O$	246 600	2 000 раз	0,5
KCl	58 000	10 000 раз	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000 раз	1,0
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	5 000 раз	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000 раз	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000 раз	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000 раз	0,1
Комбинированный витаминный маточный раствор	—	10 000 раз	0,1

Комбинированный витаминный маточный раствор готовят, добавляя витамины к 1 дм^3 чистой воды (6.2), по таблице А.3.

Т а б л и ц а А.3. — Состав витаминного маточного раствора

Витамин	Концентрация, мг/дм^3	Концентрация по отношению к среде М 4
Тиамингидрохлорид	750	10000 раз
Цианокобаламин (В12)	10	10000 раз
Биотин	7,5	10000 раз

Хранят комбинированный витаминный маточный раствор в замороженном виде в небольших количествах. Добавляют к среде непосредственно перед использованием.

А.3 Приготовление среды М4

Для того, чтобы избежать осаждение солей при приготовлении окончательного варианта среды добавляют маточные растворы в небольших количествах к 500 — 800 см^3 чистой воды (6.2) и затем доводят объем до 1 дм^3».

Приложение ДБ
(справочное)

Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного стандарта

Таблица ДБ.1

<table>
<tr><td colspan="3">Структура настоящего национального стандарта</td><td colspan="3">Структура международного стандарта ИСО 6341:2012</td></tr>
<tr><td colspan="3" rowspan="2">Раздел 1</td><td colspan="3">Раздел 1</td></tr>
<tr><td colspan="3">Раздел 4</td></tr>
<tr><td colspan="3">Раздел 2</td><td colspan="3">Раздел 2</td></tr>
<tr><td colspan="3">Раздел 3</td><td colspan="3">Раздел 3</td></tr>
<tr><td colspan="3">Раздел 4</td><td colspan="3">Подраздел 8.1</td></tr>
<tr><td colspan="3">Раздел 5</td><td colspan="3">–</td></tr>
<tr><td>Раздел</td><td>Подраздел</td><td>Пункт</td><td>Раздел</td><td>Подраздел</td><td>Пункт</td></tr>
<tr><td rowspan="13">6</td><td>6.1</td><td>–</td><td>5</td><td>–</td><td>–</td></tr>
<tr><td rowspan="2">6.2</td><td rowspan="2">–</td><td>6</td><td>6.1, 6.2, 6.4, 6.5, 6.6</td><td>–</td></tr>
<tr><td>7</td><td>7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7</td><td>–</td></tr>
<tr><td>6.3</td><td>–</td><td>8</td><td>8.1</td><td>–</td></tr>
<tr><td>6.4</td><td>–</td><td>8</td><td>8.2</td><td>–</td></tr>
<tr><td rowspan="5">6.5</td><td>6.5.1</td><td rowspan="5">9</td><td>9.2</td><td rowspan="5">–</td></tr>
<tr><td>6.5.2</td></tr>
<tr><td>6.5.3</td><td rowspan="3">9.3</td></tr>
<tr><td>6.5.4</td></tr>
<tr><td>6.5.5</td></tr>
<tr><td rowspan="5">6.6</td><td>6.6.1</td><td rowspan="5">9</td><td rowspan="5">9.1</td><td rowspan="5">–</td></tr>
<tr><td>6.6.2</td></tr>
<tr><td>6.6.3</td></tr>
<tr><td>6.6.4</td></tr>
<tr><td>6.6.5</td></tr>
</table>

Окончание таблицы ДБ.1

Структура настоящего национального стандарта			Структура международного стандарта ИСО 6341:2012		
	6.7	–	10	10.1,10.2	–
	6.8	–	11	–	–
	6. 9	–	9	9.5	–
		–	12	–	–
	6.10	–	С1, Приложение С	–	–
Приложения		–	Приложения		A
		A			B
		B			C
					D
		C			E
		D			F
		E*			–
		ДА			–
		ДБ			–
Таблица		A.7	Таблица		B.1
		A.8			B.2
		D.1			F.1
Рисунок		A.1	Рисунок		–
		A.2			B.1
		B.1			D.1

*Включение в настоящий стандарт данного приложения, соответствующего тексту подраздела 6.3 МС ИСО 6341:2012 обусловлено удобством пользования информацией и необходимостью приведения настоящего стандарта в соответствие с требованиями ГОСТ 1.5

Библиография

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

[3] Методика ПНД Ф 12.1:2:2.2:2.3.2–03* — Отбор проб почв, грунтов, осадков биологических очистных сооружений, шламов промышленных сточных вод, донных отложений искусственно созданных водоемов, прудов-накопителей и гидротехнических сооружений. Экологический Центр аналитичес-кого контроля, М., 2003

УДК 63: 544:632:006.354 ОКС 13.060.01 01 3300 ОКП 01 3100

Ключевые слова: природная вода, питьевая вода, сточная вода, отработанные буровые растворы, твердые промышленные отходы, водные вытяжки, водные растворы, испытание, выживаемость, пресноводные ракообразные, токсичность, биологическое тестирование

Подписано в печать 24.11.2016. Формат 60х84⅛.
Усл. печ. л. 5,12. Тираж 9 экз. Зак. 2975.
Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

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

gost.e-ecolog.ru