ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 53886— 2010 (ИСО 14669:1999)

ВОДА

Методы определения токсичности по выживаемости морских ракообразных

ISO 14669:1999
Water quality — Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea)
(MOD)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2012

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

Сведения о стандарте

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

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

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 сентября 2010 г. № 287-ст

4 Настоящий стандарт является модифицированным по отношению к международному стандарту ИСО 14669:1999 «Качество воды. Токсикологические испытания по отношению к морским ракообразным (Copepoda, Crustacea)» (ISO 14669:1999 «Water quality — Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea)») путем:

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

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

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

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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

© Стандартинформ, 2012

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

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Отбор проб 2
4 *Метод определения токсичности исследуемых объектов по выживаемости эвригалинного рачка вида Artemia salina* L. (Branchiopoda, Crustacea) *(метод А)* 3
5 Метод определения токсичности *исследуемых объектов* по выживаемости морских ракообразных видов *Acartia tonsa* Dana, *Tisbe battagliai* Volkmann-Rocco, *Nitocra spinipes* Boeck (Copepoda, Crustacea) *(метод Б)* 12
Приложение А (рекомендуемое) Примеры определения средней летальной концентрации *(разбавления)* 15
Приложение В (обязательное) Методы культивирования тест-организмов 20
Приложение С (справочное) Информация о результатах проведенных межлабораторных испытаний *для метода Б* 25
Приложение ДА (справочное) Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного стандарта 26
Приложение ДБ (справочное) Сведения о соответствии ссылочных национальных и межгосударственных стандартов международным стандартам, использованным в качестве ссылочных в примененном международном стандарте 28
Библиография 30

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ВОДА

Методы определения токсичности по выживаемости морских ракообразных

Water.
Methods of determination of toxicity by survival of marine crustaceans

Дата введения — 2012—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на природные морские воды и воды эстуариев, а также сточные воды с *минерализацией* от *6 до 33 г/дм*^{3} и устанавливает методы *лабораторного биологического тестирования* (далее — тестирование) с определением их токсичности по выживаемости морских ракообразных:

- *эвригалинного рачка вида Artemia salina* L. (Branchiopoda, Crustacea) *(метод А);*
- видов *Acartia tonsa* Dana, *Tisbe battagliai* Volkmann-Rocco, *Nitocra spinipes* Boeck (Copepoda, Crustacea) *(метод Б).*

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

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

- *среднюю летальную кратность разбавления (ЛКР$_{50}$) пробы, вызывающую гибель 50 % морских ракообразных (далее — тест-организмов),* и безвредную кратность разбавления пробы *(ЛКР$_{10}$),* вызывающую гибель не более 10 % тест-организмов за *72 ч (96 ч) тестирования (метод А);* за 48 ч тестирования *(метод Б)*;
- среднюю летальную концентрацию (ЛК$_{50}$) растворов веществ, вызывающую гибель 50 % тест-организмов, и безвредную концентрацию (ЛК$_{10}$) растворов веществ, вызывающую гибель не более 10 % тест-организмов *за 72 ч тестирования (метод А) и* за 48 ч тестирования *(метод Б).*

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

В помещении лаборатории, где проводят тестирование:

- окружающая среда (атмосфера) не должна содержать пара или пыли, токсичных для тест-организмов;
- *температура окружающего воздуха должна быть от 19 °С до 24 °С;*
- *относительная влажность воздуха — 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 Р ИСО/МЭК 17025—2006 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

Издание официальное

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

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

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

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

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

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

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

ГОСТ 3118—77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 3765—78 Реактивы. Аммоний молибденовокислый. Технические условия

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

ГОСТ 4166—76 Реактивы. Натрий сернокислый. Технические условия

ГОСТ 4168—79 Реактивы. Натрий азотнокислый. Технические условия

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

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

ГОСТ 4220—75 Реактивы. Калий двухромовокислый. Технические условия

ГОСТ 4233—77 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4234—77 Реактивы. Калий хлористый. Технические условия

ГОСТ 4328—77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4461—77 Реактивы. Кислота азотная. Технические условия

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

ГОСТ 4529—78 Реактивы. Цинк хлористый. Технические условия

ГОСТ 6709—72 Вода дистиллированная. Технические условия

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

ГОСТ 9656—75 Реактивы. Кислота борная. Технические условия

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

ГОСТ 12026—76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 19126—2007 Инструменты медицинские металлические. Общие технические условия

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

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

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

3 Отбор проб

3.1 Отбор проб *воды и донных отложений* проводят в соответствии с требованиями *ГОСТ Р 51592, ГОСТ 17.1.5.05, [1], [2] и [3]. При этом объем пробы воды должен быть не менее 500 см^3; масса пробы донных отложений — не менее 2 кг.*

Примечание — Отбор проб сточных вод проводят до этапа хлорирования.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.6 Продолжительность и условия хранения отобранной пробы указывают в протоколе испытаний.

3.7 Консервацию отобранных проб не проводят.

4 Метод определения токсичности исследуемых объектов по выживаемости эвригалинного рачка вида Artemia salina L. (Branchiopoda, Crustacea) *(метод А)*

4.1 Сущность метода

Сущность метода заключается в регистрации гибели науплиев эвригалинного рачка вида Artemia salina L. (Branchiopoda, Crustacea) в анализируемой *пробе исследуемого объекта, определении ее токсичности и токсикологических показателей при тестировании в течение 72 ч (96 ч).*

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

Примечание — Допускается проводить определение средней летальной *кратности разбавления* проб *сточной воды* (концентрации *вещества*), вызывающей гибель 50 % тест-организмов при увеличенной продолжительности тестирования до 96 ч [96 ч $ЛКР_{50}$ (96 ч $ЛК_{50}$)].

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

Среднюю летальную кратность разбавления ($ЛКР_{50}$) за 72 ч тестирования обозначают как 72 ч $ЛКР_{50}$, за 96 ч тестирования — соответственно 96 ч $ЛКР_{50}$; среднюю летальную концентрацию ($ЛК_{50}$) за 72 ч тестирования как 72 ч $ЛК_{50}$.

Примечание — *Примеры определения средней летальной кратности разбавления (концентрации) приведены в приложении А.*

4.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы, материалы

Климатостат, *оснащенный лампами дневного света, обеспечивающий освещенность 3000—10000 лк и поддержание температуры (20 ± 2) °С.*

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

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

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

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

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

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

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

Пипетка Пастера вместимостью 1,5 см^3.

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

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

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

Мешалка магнитная.

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

Центрифуга лабораторная медицинская.

Сушильный электрический шкаф общелабораторного назначения.

Аквариумный микрокомпрессор любого типа, например АЭН-4.

Шпатели металлические по ГОСТ 19126.

Холодильник бытовой, обеспечивающий поддержание температуры 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».

Установка для фильтрования любого типа.

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

Эксикаторы по ГОСТ 25336.

Пробирки стеклянные по ГОСТ 25336 вместимостью 10 см^3.

Чашки Петри по ГОСТ 25336 вместимостью 50 см^3.

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

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

Сухие яйца Artemia salina L., коммерческие готовые.

Тест-организмы: *Artemia salina L.*

Примечание — *Тест-организмы получают путем замачивания сухих яиц в морской воде в лабораторных условиях и подготавливают выклюнувшихся науплиев к тестированию в соответствии с требованиями, указанными в приложении В. Жизненный цикл Artemia salina* L. *состоит из науплиальных стадий (от ортонауплиуса до метанауплиуса — 72 ч; молоди, взрослых особей — 21 сут).* Стадия жизненного цикла тест-организма по состоянию на начало тестирования должна быть указана в протоколе испытаний.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 или деионизированная.

Примечание — Для получения дистиллированной (деионизированной) воды используют аппараты только из стекла или кварца.

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

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

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

Калий хлористый по ГОСТ 4234, х. ч.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233, х. ч.

Натрий сернокислый по ГОСТ 4166, х. ч.

Натрий углекислый кислый по ГОСТ 4201, х. ч.
Кальций хлористый, х. ч., безводный.
Магний хлористый 6-водный по ГОСТ 4209, х. ч.
Натрия гидроокись по ГОСТ 4328, х. ч.
Кислота азотная по ГОСТ 4461, х. ч.
Кислота борная по ГОСТ 9656, х. ч.
Кислота соляная по ГОСТ 3118, х. ч.

4.3 Подготовка к тестированию

4.3.1 Подготовка посуды

4.3.1.1 Емкости для отбора проб и тестирования должны быть химически чистыми.

Для проведения тестирования используют только стеклянную посуду.

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

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

4.3.1.3 Емкости для отбора проб и посуду для тестирования сушат на воздухе при комнатной температуре, затем стеклянную посуду, за исключением мерной, помещают в сушильный шкаф и выдерживают в течение 1 ч при температуре 150 °С.

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

4.3.2 Приготовление искусственной морской воды

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

Таблица 1

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

Минерализация (соленость) приготовленной из указанных реактивов искусственной морской воды составляет 33 г/дм^3 (33 ‰). При необходимости, для уменьшения минерализации (солености), искусственную морскую воду разбавляют дистиллированной водой.

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

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

Искусственная морская вода должна соответствовать следующим требованиям:

- *значение pH в пределах 8,0—8,3;*
- *содержание растворенного кислорода не менее 7 мг O_2/дм^3;*
- *температура (20 ± 2) °С.*

Искусственную морскую воду хранят в емкости из темного стекла с притертой крышкой (используют емкости до 10 дм^3) при комнатной температуре не более года.

4.3.3 Проверка физиологической чувствительности тест-организмов

Периодически *(не реже одного раза в месяц), а также непосредственно перед тестированием проб,* тест-организмы (*выклюнувшиеся* науплии) проверяют на физиологическую чувствительность.

Для этого определяют среднюю летальную концентрацию модельного токсиканта (72 ч $ЛК_{50}$) для тест-организмов, как указано ниже.

4.3.3.1 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, растворяют в небольшом количестве дистиллированной (деионизированной) воды, доводят объем до метки, перемешивают и маркируют.

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

4.3.3.2 Готовят анализируемые растворы модельного токсиканта двухромовокислого калия массовой концентрацией от 1,0 до 10 мг/дм^3 следующим способом: в пять мерных колб вместимостью 200 см^3 вносят исходный раствор двухромовокислого калия массовой концентрацией 1 г/дм^3 (см. 4.3.3.1) соответственно в первую колбу — 0,2 см^3, во вторую — 0,5 см^3, в третью —1,0 см^3, в четвертую — 1,5 см^3, в пятую — 2,0 см^3, доводят содержимое каждой колбы до метки морской водой (см. 4.2 или 4.3.2) и перемешивают. При этом массовая концентрация двухромовокислого калия в каждом растворе составляет соответственно 1,0; 2,0; 5,0; 7,5 и 10,0 мг/дм^3.

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

В качестве контрольной пробы используют морскую воду (см. 4.2 или 4.3.2).

4.3.3.3 Проводят тестирование в течение 72 ч по 4.4 аналогично тестированию анализируемых проб. При этом используют не менее трех чашек Петри на каждую концентрацию анализируемого раствора (см. 4.3.3.2).

4.3.3.4 На основании полученных результатов определяют по 4.5 значение 72 ч $ЛК_{50}$ модельного токсиканта (двухромовокислого калия) для науплиев Artemia salina L.

При этом:

- если значение 72 ч $ЛК_{50}$ указанного модельного токсиканта находится в диапазоне 6,5—8,0 мг/дм^3, то используемые тест-организмы пригодны для тестирования;
- если значение 72 ч $ЛК_{50}$ указанного модельного токсиканта не входит в указанный диапазон, то проверяют соблюдение правильности процедуры тестирования, условия подготовки тест-организмов к тестированию и, при необходимости, повторяют тестирование с использованием новых тест-организмов, выращенных из новой партии яиц (см. приложение В).

Примечание — Значение 72 ч $ЛК_{50}$ 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, а также характеризует их физиологическую чувствительность, что позволяет проводить тестирование с использованием указанных тест-организмов.

4.3.3.5 Если в результате тестирования не удалось получить конкретное значение 72 ч $ЛК_{50}$, то для определения 72 ч $ЛК_{50}$ используют пробит-анализ. Пример приведен в приложении А.

4.3.4 Подготовка проб

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

4.3.4.1 Подготовка исходных проб природной морской воды и воды эстуариев

Отобранные пробы природной морской воды и воды эстуариев фильтруют через мембранные фильтры с порами диаметром 3,5 мкм или через обеззоленные фильтры «белая лента».

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

Не допускается для фильтрования использовать фильтр «синяя лента».

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

Измеряют минерализацию (соленость), pH и концентрацию растворенного кислорода отфильтрованной пробы воды.

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

4.3.4.2 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».

Измеряют минерализацию (соленость), pH и концентрацию растворенного кислорода отфильтрованной пробы сточной воды.

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

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

Подготовка водных вытяжек из проб отработанных буровых растворов

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

- *pH пробы отработанного бурового раствора более 9,0;*
- *на стенках сосуда с пробой отработанного бурового раствора появились черные пятна;*
- *проба отработанного бурового раствора имеет неприятный запах.*

После перемешивания пробу отработанного бурового раствора смешивают с морской водой (см. 4.2) в соотношении соответственно 1:9 по объему и снова перемешивают с применением смесителя со скоростью вращения 17 $с^{-1}$ (1000 об/мин) в течение 5 мин.

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

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

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

Подготовка водных вытяжек из проб твердых промышленных отходов

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

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

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

В стеклянную емкость вместимостью 1500 $см^3$ вносят 100 г сухой массы пробы твердых промышленных отходов, добавляют 1000 $см^3$ морской воды (см. 4.2) и перемешивают в течение 6—7 ч с использованием магнитной мешалки (или орбитального шейкера) с минимальной скоростью перемешивания, при которой проба твердых промышленных отходов поддерживается во взвешенном состоянии.

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

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

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

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

Подготовка водных вытяжек из проб донных отложений

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

После просеивания навеску пробы донных отложений вносят в стеклянную емкость и заливают морской водой (см. 4.2) в соотношении соответственно 1:4 по объему, перемешивают с использованием орбитального шейкера (или качалки-мешалки) в течение 2 ч. После окончания перемешивания смесь выдерживают в течение 1 ч при температуре (20 ± 5) °С, ставят в холодильник и выдерживают при температуре от 2 °С до 4 °С в течение 12—14 ч, затем водную вытяжку над осадком осто-

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

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

4.3.4.4 Подготовка исходных растворов веществ

Исходные растворы веществ в зависимости от заданной концентрации готовят в стеклянной мерной емкости путем растворения определенного количества пробы вещества в определенном объеме морской воды *(см. 4.2).*

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

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.

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

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

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

4.3.4.5 Исходные пробы (см. 4.3.4.1—4.3.4.3) и исходные растворы веществ (см. 4.3.4.4) должны иметь следующие характеристики:

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

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

b) Значение pH 8,0—*8,3*

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

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

с) Концентрация растворенного кислорода должна быть *не ниже 7 мг $O_2/дм^3$. Если концентрация растворенного кислорода пробы ниже указанного значения, пробу аэрируют при помощи аквариумного компрессора.*

4.3.4.6 Подготовка анализируемых проб

Анализируемые пробы природной морской воды и воды эстуариев готовят следующим способом: в пять конических колб вместимостью 150 $см^3$ вносят по 100 $см^3$ отфильтрованной исходной пробы (см. 4.3.4.1). При необходимости, если анализируемая проба природной морской воды при тестировании по 4.4 показала высокую токсичность, проводят разбавление ее исходной пробы (см. 4.3.4.1) в два, пять, 10 и более раз искусственной морской водой (см. 4.3.2), соленость которой должна соответствовать солености исходной пробы.

Анализируемые пробы сточной воды готовят следующим способом: в пять конических колб вместимостью 150 $см^3$ вносят подготовленную по 4.3.4.2 исходную пробу сточной воды и морскую воду (см. 4.2), соленость которой должна соответствовать солености исходной пробы сточной воды в объемах:

- *100 $см^3$ исходной пробы (проба без разбавления);*
- *50 $см^3$ исходной пробы и 50 $см^3$ морской воды (кратность разбавления: 50 %, в два раза);*
- *10 $см^3$ исходной пробы и 90 $см^3$ морской воды (кратность разбавления: 10 %, в 10 раз);*

- *1 см³ исходной пробы и 99 см³ морской воды (кратность разбавления: 1 %, в 100 раз);*
- *0,1 см³ исходной пробы и 99,9 см³ морской воды (кратность разбавления: 0,1 %, в 1000 раз).*

Анализируемые пробы отработанных буровых растворов, твердых промышленных отходов и донных отложений готовят из водных вытяжек (см. 4.3.4.3) путем их разбавления морской водой (см. 4.2) аналогично подготовке анализируемых проб сточной воды.

Анализируемую пробу раствора вещества готовят *следующим способом: в пять конических колб вместимостью 150 см³ вносят по 100 см³* морской воды *(см. 4.2),* добавляют *в колбы рассчитанные* объемы исходного раствора вещества *(см. 4.3.4.4)* для получения заданных концентраций (см. 4.4.1, 4.4.2).

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

4.3.5 Подготовка тест-организмов к тестированию

Подготовку тест-организмов к тестированию проводят в соответствии с требованиями приложения В с учетом требований 4.3.4.

4.4 Проведение тестирования

Тестирование проводят в два этапа: предварительное и окончательное.

4.4.1 Предварительное тестирование

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

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

При предварительном тестировании применяют не менее двух чашек Петри на *каждое анализируемое разбавление* (концентрацию) *пробы и используют* не менее 40 тест-организмов.

Предварительное тестирование *проводят по 4.4.3.*

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

4.4.2 Окончательное тестирование

По результатам предварительного тестирования (см. 4.4.1) выбирают диапазон *разбавлений (*концентраций) анализируемых проб для окончательного тестирования. *При этом* используют коэффициент между разбавлениями (концентрациями), как правило, 2,0 *или 2,5.*

Окончательное тестирование проводят по 4.4.3. При этом *используют не менее пяти разбавлений (концентраций) анализируемых проб, применяют не менее трех чашек Петри для каждого разбавления (концентрации) и не менее 60 тест-организмов.*

Пример проведения окончательного тестирования и установления значений средней летальной концентрации 72 ч $ЛК_{50}$ для вещества приведен в приложении А.

4.4.3 Процедура тестирования

4.4.3.1 Для каждой серии *разбавлений* (концентраций) *анализируемых проб* используют контрольную пробу, содержащую объем морской воды (см. 4.2 или 4.3.2), равный объему анализируемого раствора одного из разбавлений (одной из концентраций) пробы.

Контрольная проба, *а также вода для замачивания яиц Artemia salina* L. должны соответствовать *минерализации (солености)* анализируемой пробы.

4.4.3.2 Перед началом тестирования *в емкости вместимостью 200 см³ вносят по 150 см³ анализируемой пробы заданного разбавления (концентрации) (см. 4.3.4.6)* и измеряют концентрацию растворенного кислорода и pH. Измеряемые характеристики должны соответствовать указанным в *4.3.4.5. Аналогичную процедуру проводят* для контрольной пробы (см. 4.4.3.1).

Примечание — Объем (150 см³) каждого разбавления (концентрации) пробы достаточен для розлива в три чашки Петри по 40 см³ при проведении тестирования.

4.4.3.3 В каждую *чашку Петри (см. 4.4.1 и 4.4.2)* вместимостью 50 см³ вносят 40 см³ *анализируемой* пробы (*см. 4.3.4.6), соответствующей требованиям 4.4.3.2,* затем помещают по *20 экземпляров тест-организмов.* Тест-организмы рекомендуется переносить пипеткой с достаточно широким внутренним диаметром (пипеткой Пастера), чтобы не повредить их. Аналогичную процедуру проводят и для контрольных проб (см. 4.4.3.1). *Посадку тест-организмов начинают с контрольных проб. При этом плотность посадки не должна превышать 1 тест-организм на 2,0 см³ раствора.*

В анализируемые пробы тест-организмы помещают, начиная с меньших концентраций веществ (больших разбавлений проб).

После окончания посадки тест-организмов в чашки Петри с анализируемыми пробами каждого разбавления (концентрации) пипетку Пастера промывают морской водой.

Не допускается во время тестирования кормить тест-организмы *и менять растворы.*

4.4.3.4 Тестирование проводят *в климатостате (см. 4.2)* при температуре (20 ± 2) °С в течение *3—4 сут, имитируя* светлый период — 16 ч и темный период — 8 ч.

Примечание — *Допускается* проводить тестирование в помещении с регулируемой температурой, инкубаторе или на водяной бане, обеспечивающих указанный режим тестирования.

4.4.3.5 Подсчитывают каждые сутки через 24, 48, *72 ч (96 ч)* в каждой *чашке Петри* количество живых тест-организмов, *при этом пипеткой удаляют мертвые тест-организмы.* Для подсчета *тест-организмов* используют микроскоп. Мертвыми считают тест-организмы, которые в период подсчета не плавают или не двигают отростками в течение 10 с *после легкого постукивания по чашке Петри. Для каждой анализируемой пробы заданного разбавления (концентрации), в том числе контрольной, регистрируют количество выживших тест-организмов после 24, 48, 72 ч (96 ч) тестирования.* Регистрируют также *любые* отклонения внешнего вида или поведения тест-организмов по сравнению с тест-организмами в контрольной пробе.

4.4.3.6 После подсчета выживших тест-организмов измеряют в анализируемых и контрольных пробах концентрацию растворенного кислорода и pH.

4.5 Обработка результатов

4.5.1 По результатам тестирования для каждой анализируемой пробы заданного разбавления (концентрации), в том числе контрольной, рассчитывают среднеарифметическое значение выживших тест-организмов.

4.5.2 Степень токсичности А, %, для каждого анализируемого разбавления (концентрации) пробы *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.;*

$\bar{x}_{ан}$ — *среднеарифметическое значение количества выживших тест-организмов в анализируемой пробе, шт.*

4.5.3 Характеристику токсичности проб природной морской воды и воды эстуариев устанавливают в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2

Характеристика токсичности проб природной морской воды и воды эстуариев	*Степень токсичности А, %*
Нетоксичная	*От 0 до 10 включ.*
Слаботоксичная	*» 10 » 25 »*
Среднетоксичная	*» 25 » 35 »*
Токсичная	*» 35 » 50 »*
Высокотоксичная	*» 50 » 100 »*

4.5.4 Характеристику токсичности проб сточной воды, веществ, водных вытяжек отработанных буровых растворов, твердых промышленных отходов, донных отложений устанавливают следующим образом:

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

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

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

4.5.5 По результатам подсчета (см. *4.4.3.5)* для каждого анализируемого *разбавления* (концентрации) пробы суммируют количество выживших тест-организмов в чашках Петри и рассчитывают процент гибели тест-организмов после *72 ч (96 ч)* тестирования по отношению к общему количеству использован-

ных тест-организмов, затем определяют среднюю летальную *кратность разбавления пробы 72 ч $ЛКР_{50}$ (96 ч $ЛКР_{50}$)*, для растворов веществ — среднюю летальную концентрацию 72 ч $ЛК_{50}$.

Примечания

1 Если для расчета процента гибели тест-организмов используют среднеарифметическое значение (см. 4.5.1), то за общее количество использованных тест-организмов принимают количество тест-организмов, внесенных в одну чашку Петри для каждого анализируемого разбавления (концентрации) пробы.

2 Если в контрольной пробе не наблюдалась гибель тест-организмов (см. 4.5.7), то допускается для расчета процента гибели тест-организмов использовать формулу (1).

При необходимости определяют:

- минимальную концентрацию пробы, соответствующую 100 %-ной смертности тест-организмов, и максимальную концентрацию пробы, соответствующую 0 %-ной смертности тест-организмов за 72 ч (96 ч);

- *безвредную кратность разбавления (концентрации) пробы, вызывающую гибель не более 10 % тест-организмов;*

- максимальную концентрацию пробы вещества, при которой проводилось тестирование.

4.5.6 Если по результатам тестирования не удалось определить конкретное значение средней летальной кратности разбавления (концентрации) пробы (см. 4.5.5), вызывающей 50 %-ную гибель тест-организмов за 72 ч (96 ч), то для определения этого значения используют пробит-анализ. Пример приведен в приложении А.

4.5.7 Результаты тестирования считают достоверными, если соблюдаются следующие условия:

a) *процент* гибели тест-организмов в контрольных пробах не более 10 %;

b) токсичность модельного токсиканта находится в пределах, указанных в 4.3.3.4.

4.6 Оформление результатов тестирования

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

a) ссылку на настоящий стандарт с указанием метода определения;

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

c) методы подготовки проб:

- для *природной морской* воды, *воды эстуариев* или сточных вод — условия и продолжительность хранения проб и, при необходимости, условия, в которых проводились отстаивание, фильтрование, а также размораживание *пробы*;

- для веществ *и водных вытяжек* — способ приготовления исходных и анализируемых проб (растворов);

d) информацию, относящуюся к *тестированию*, включая вид, источник, возраст и стадию жизненного цикла тест-организма, *условия культивирования*, источник и характеристику морской воды;

e) результаты окончательного определения *средней летальной кратности разбавления 72 ч $ЛКР_{50}$ или 96 ч $ЛКР_{50}$ (средней летальной концентрации* 72 ч $ЛК_{50}$*)*, метод расчета *(при необходимости);*

f) минимальную концентрацию пробы вещества *(минимальную кратность разбавления пробы)*, соответствующую 100 %-ной смертности, и максимальную концентрацию *(максимальную кратность разбавления)*, соответствующую 0 %-ной смертности тест-организмов за 24, 48, 72 и 96 ч;

g) любые отклонения в поведении или внешнем виде тест-организмов в условиях тестирования;

h) обстоятельства и условия, не предусмотренные настоящим стандартом, способные повлиять на результат *тестирования;*

i) значения pH и концентрацию растворенного кислорода в анализируемых и контрольных пробах в начале и конце тестирования.

4.6.2 Значения *72 ч $ЛКР_{50}$ (96 ч $ЛКР_{50}$)*, 72 ч $ЛК_{50}$ и диапазон разбавлений (концентраций) пробы, соответствующий 0 %-ной и 100 %-ной смертности выражают:

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

- в миллиграммах (или микрограммах) на кубический дециметр — для растворов веществ.

5 Метод определения токсичности *исследуемых объектов* по выживаемости морских ракообразных видов *Acartia tonsa* Dana, *Tisbe battagliai* Volkmann-Rocco, *Nitocra spinipes* Boeck (Copepoda, Crustacea) *(метод Б)*

5.1 Сущность метода

Сущность метода заключается *в регистрации гибели* морских ракообразных видов *Acartia tonsa* Dana, *Tisbe battagliai* Volkmann-Rocco, *Nitocra spinipes* Boeck (Copepoda, Crustacea) в анализируемой пробе исследуемого объекта, определении ее токсичности *и токсикологических показателей* при тестировании *в течение* 48 ч.

*Среднюю летальную кратность разбавления за 48 ч тестирования, вызывающую гибель 50 % тест-организм*ов, обозначают *48 ч ЛКР$_{50}$*; среднюю летальную концентрацию как — 48 ч ЛК$_{50}$.

Примечание — Допускается проводить определение средней летальной *кратности разбавления* проб *сточной воды* (концентрации *вещества*), вызывающей гибель 50 % тест-организмов, за 24 ч [24 ч ЛКР$_{50}$ (24 ч ЛК$_{50}$)], *или* при увеличенной продолжительности тестирования до 96 ч [96 ч ЛКР$_{50}$ (96 ч ЛК$_{50}$)].

5.2 Средства измерений, вспомогательное оборудование, реактивы, материалы — по 4.2 *со следующими дополнениями*:

Контейнеры для *тестирования* из химически инертных материалов [например, стеклянные химические стаканы (*или чашки Петри) по ГОСТ 25336*] и одноразовые чашки *Петри* из твердого полимерного материала *с ячейками для культур организмов*.

Примечание — Для снижения испарения анализируемых растворов рекомендуется *для контейнеров* использовать *неплотно прилегающие* широкие крышки.

Для ранних стадий жизненного цикла тест-организмов могут быть использованы специальные контейнеры, приспособленные для наблюдений с использованием микроскопа.

Тест-организмы: *морские ракообразные видов:*
- *Acartia tonsa* Dana;
- *Tisbe battagliai* Volkmann-Rocco;
- *Nitocra spinipes* Boeck.

Примечания

1 Для тестирования используют культуру тест-организмов одного из указанных видов.

2 Тест-организмы получают путем их культивирования в лабораторных условиях в соответствии с требованиями приложения В.

После откладывания яиц жизненный цикл тест-организмов состоит из стадий развития науплиев, копеподитов и взрослых особей. Возраст и стадия жизненного цикла тест-организма по состоянию на начало тестирования должны быть указаны в протоколе испытаний следующим образом:
- *Acartia tonsa* Dana: крупные копеподиты (стадия 5) или взрослые особи;
- *Tisbe battagliai* Volkmann-Rocco: копеподиды в возрасте (6 ± 2) сут;
- *Nitocra spinipes* Boeck: взрослые особи в возрасте от трех до четырех недель.

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

Морская вода (далее — вода для разбавления) по 4.2.

Примечания

1 При тестировании *по методу Б* для применяемых тест-организмов недостаточно информации о возможности использования искусственной морской воды.

2 Использование *воды для разбавления* (*природной* морской воды) с более низкой соленостью, что больше подходит для испытаний устьевой (опресненной) или жесткой воды, должно быть отражено в протоколе испытаний.

3 *Nitocra spinipes* Boeck допускается использовать при *минерализации* воды менее 1 *г/дм^3* (солености менее 1 ‰), а *Tisbe battagliai* Volkmann-Rocco — *для воды с минерализацией* до 20 *г/дм^3* (солености до 20 ‰).

Перед началом тестирования тест-организмы культивируют и выдерживают не менее 7 сут *в природной морской воде* такой же солености (*при допускаемом предельном отклонении* ± 3 ‰), что и анализируемые пробы.

4 Содержание растворенного кислорода в воде для разбавления должно быть более 7 мг O_2/дм^3, а значение pH — (8,0 ± 0,3).

5 *Природная* морская вода (вода для разбавления) должна обеспечивать выживание тест-организмов не менее 48 ч и должна быть отобрана из того же источника, что и *природная* морская вода, которая применялась для культивирования тест-организмов на протяжении жизненного цикла не менее двух поколений.

Аммоний молибденовокислый 4-водный $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$.
Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный по ГОСТ 245, х. ч.
Марганец (II) хлористый 4-водный по ГОСТ 612, х. ч.
Железо (III) хлорид 6-водный по ГОСТ 4147, х. ч.
Натрий азотнокислый по ГОСТ 4168, х. ч.
Кобальт хлористый 6-водный по ГОСТ 4525, х. ч.
Цинк хлористый по ГОСТ 4529, х. ч.
Соль динатриевая этилендиамин-N,N,N′,N′-тетрауксусной кислоты 2-водная (трилон Б) по ГОСТ 10652, х. ч.
Медь (II) сернокислая 5-водная ($CuSO \cdot 5H_2O$), х. ч.
Витамин B_{12} (цианокобаламин).
Витамин B_1.

5.3 Подготовка к тестированию

5.3.1 Подготовка посуды — по 4.3.1, при этом перед тестированием контейнеры для *тестирования (см. 5.2)* должны быть тщательно вымыты водопроводной водой и ополоснуты сначала *дистиллированной* водой, а затем морской водой (см. 5.2).

5.3.2 Подготовка исходных и анализируемых проб — *по 4.3.4.* При этом исходные растворы вещества готовят с использованием дистиллированной воды. *Минерализация* (соленость) анализируемых проб должна соответствовать *минерализации* (солености) использованной морской воды (см. 5.2).

Рекомендуется, чтобы объем приготовленной анализируемой пробы был достаточным и для определения концентрации растворенного кислорода и pH.

5.3.3 Проверка физиологической чувствительности тест-организмов

Периодически *(не реже одного раза в месяц), а также непосредственно перед тестированием* тест-организмы проверяют *на физиологическую чувствительность.* Для этого определяют *среднюю летальную концентрацию* модельного токсиканта *3,5-дихлорфенола при тестировании в течение 48 ч* (48 ч $ЛК_{50}$).

Анализируемые растворы модельного токсиканта (3,5-дихлорфенола) готовят непосредственно перед определением физиологической чувствительности тест-организмов аналогично растворам модельного токсиканта на основе двухромовокислого калия (см. 4.3.3.1 и 4.3.3.2), но для диапазона концентраций 3,5-дихлорфенола, приведенных в таблице 3.

Тестирование проводят в соответствии с требованиями 5.4 в течение 48 ч.

На основании полученных результатов аналогично 4.5.5 определяют значение 48 ч $ЛК_{50}$ *для модельного токсиканта (3,5-дихлорфенола), при этом:*

- если значение 48 ч $ЛК_{50}$ *модельного токсиканта* находится в диапазоне концентраций *3,5-дихлорфенола*, указанных в таблице 3, то используемые тест-организмы пригодны для тестирования;
- если *значение* 48 ч $ЛК_{50}$ модельного токсиканта *(3,5-дихлорфенола)* не входит в диапазон концентраций, *указанных в* таблице 3, то проверяют соблюдение выполнения условий тестирования, условия культивирования тест-организмов и, при необходимости, используют новую культуру тест-организмов.

Примечание — Значение 48 ч $ЛК_{50}$ 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, а также характеризует их физиологическую чувствительность, что позволяет проводить тестирование с использованием указанных тест-организмов.

Таблица 3

Тест-организмы	*Массовая концентрация раствора модельного токсиканта* (3,5-дихлорфенола), *мг/дм³, соответствующая*	
	50 %-ной гибели тест-организмов (48 ч $ЛК_{50}$)	(20—80) %-ной *гибели тест-организмов*
Acartia tonsa Dana	0,5—1,5	1,0
Tisbe battagliai Volkmann-Rocco	1,1—3,5	2,3
Nitocra spinipes Boeck	1,9—5,7	3,8
Примечание — Значения 48 ч $ЛК_{50}$ могут изменяться в зависимости от *минерализации* (солености) среды. Приведенные *в таблице 3 значения* относятся только к среде с *минерализацией* от 29 до 36 *г/дм³* (соленостью от 29 до 36 ‰).		

Допускается проверять *физиологическую* чувствительность тест-организмов путем определения гибели *тест-организмов* в растворе модельного токсиканта при одной концентрации, приведенной в таблице 3, после *тестирования в течение* 48 ч. Если гибель тест-организмов при этом составляет от 20 % до 80 %, то чувствительность тест-организмов является приемлемой для тестирования. Если гибель *тест-организмов* не попадает в указанный диапазон *их гибели*, то *проверяют соблюдение выполнения условий тестирования, способ культивирования тест-организмов и, при необходимости, используют новую культуру тест-организмов.*

5.4 Проведение тестирования

5.4.1 Проведение тестирования — *аналогично* 4.4, *но* с использованием тест-организмов по 5.2 и тестирования в течение 48 ч.

При необходимости определяют 24 ч $ЛК_{50}$ (24 ч $ЛКР_{50}$), а также концентрации вещества *(разбавлений)*, соответствующие 0 %-ной и 100 %-ной смертности тест-организмов за 48 ч.

Пример проведения предварительного тестирования и установления *диапазона* концентраций *вещества, в пределах которого необходимо проводить окончательное тестирование,* приведен в приложении А. Для тестирования используют по одному контейнеру для каждой концентрации анализируемого раствора.

Пример проведения окончательного тестирования для определения *значения средней летальной концентрации* 48 ч $ЛК_{50}$ приведен в приложении А. При проведении тестирования рекомендуется использовать *одинаковые контейнеры (см. 5.2).*

Процедура тестирования — по 4.4.3 со следующими уточнениями:

5.4.1.1 В серию *контейнеров* для тестирования (см. 5.2) вносят равные объемы анализируемой пробы (см. 5.3.2). Объем *анализируемой пробы* должен быть таким, чтобы при использовании необходимого количества тест-организмов их плотность не превышала одного организма на 0,5 $см^3$ пробы, *при этом* для *Acartia tonsa* Dana рекомендуемая максимальная плотность посадки — один организм на 5 $см^3$ *анализируемой пробы.*

5.4.1.2 Для каждой серии определений подготавливают *контрольную пробу* в контейнере, содержащую объем *воды для разбавления* (см. 5.2), равный объему анализируемого раствора одной из концентраций *вещества (разбавлений сточной воды).*

Если для растворения или диспергирования вещества используют растворитель, то одновременно готовят второй контрольный контейнер с *контрольной пробой* из *воды для разбавления* (см. 5.2), содержащей растворитель в максимальной используемой концентрации.

5.4.1.3 Тестирование труднорастворимых веществ проводят по 4.4.3 с использованием 20 тест-организмов и только при одной концентрации, которая соответствует массовой концентрации 100 $мг/дм^3$ или более низкой концентрации, являющейся максимальной для растворения данного вещества.

5.4.2 После подсчета выживших тест-организмов измеряют в анализируемых и контрольных пробах концентрацию растворенного кислорода и pH.

5.5 Обработка результатов — *аналогично* 4.5 *с определением токсичности и токсикологических показателей за 48 ч.*

Информация о результатах проведенных межлабораторных испытаний приведена в приложении С.

5.6 Оформление результатов — *аналогично* 4.6.

Приложение А
(рекомендуемое)

Примеры определения средней летальной концентрации *(разбавления)*

А.1 Пример определения 72 ч $ЛК_{50}$ модельного токсиканта для метода А

Результаты определения физиологической чувствительности науплиев Artemia salina L. в растворе *модельного токсиканта (калий двухромовокислый) приведены в таблице А.1.*

Таблица А.1

Продолжительность тестирования, ч	Массовая концентрация раствора модельного токсиканта, мг/дм^3	Количество выживших тест-организмов, шт., в чашках Петри			Среднеарифметическое значение количества выживших тест-организмов, шт.	Процент гибели тест-организмов, %
		№ 1	№ 2	№ 3		
72	0 (контрольная)	20	20	20	20	0
	1,0	20	20	20	20	0
	2,0	20	20	20	20	0
	5,0	16	17	15	16	20
	7,5	9	9	9	9	55
	10,0	2	3	1	2	90

По результатам тестирования, приведенным в таблице А.1, гибель 50 % тест-организмов не зарегистрирована. В этом случае для обработки результатов тестирования применяют пробит-анализ аналогично А.4.

Получают значение 72 ч $ЛК_{50}$ для указанного модельного токсиканта, равное 7,24 мг/дм^3, которое входит в диапазон концентраций, указанный в 4.3.3.4 настоящего стандарта. Следовательно, использованные тест-организмы пригодны для тестирования.

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

А.2.1 Пример проведения предварительного тестирования по 4.4.1 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 чашках Петри, шт.		Среднеарифметическое значение количества выживших тест-организмов, шт.	Процент гибели тест-организмов, %
		№ 1	№ 2		
72	0 (контрольная проба)	20	20	20	0
	0,1	20	20	20	0
	1,0	20	20	20	0
	10,0	11	9	10	50
	100,0	3	3	3	85
	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 4.4.2 настоящего стандарта приведен в таблице А.3.

Таблица А.3

Продолжительность тестирования, ч	Массовая концентрация вещества, мг/дм^3	Количество выживших тест-организмов в чашках Петри, шт.			Среднеарифметическое значение количества выживших тест-организмов, шт.	Процент гибели тест-организмов, %
		№ 1	№ 2	№ 3		
72	0 (контрольная проба)	20	20	20	20	0
	1,0	20	20	20	20	0
	2,5	17	19	18	18	10
	5,0	16	14	15	15	25
	10,0	11	10	9	10	50
	100,0	4	3	2	3	85

Из данных таблицы А.3 видно, что 50 %-ной гибели тест-организмов соответствует массовая концентрация вещества, равная 10 мг/дм^3 при тестировании в течение 72 ч (72 ч $ЛК_{50}$).

Если значение массовой концентрации вещества, которое соответствует 50 %-ной гибели тест-организмов при тестировании в течение 72 ч, не зарегистрировано (см. таблицу А.4), то его определяют, используя для обработки результатов тестирования пробит-анализ аналогично А.4.

Таблица А.4

Продолжительность тестирования, ч	Массовая концентрация вещества, мг/дм^3	Количество выживших тест-организмов в чашках Петри, шт.			Среднеарифметическое значение количества выживших тест-организмов, шт.	Процент гибели тест-организмов, %
		№ 1	№ 2	№ 3		
72	0 (контрольная проба)	20	20	20	20	0
	1,0	20	20	20	20	0
	2,5	17	16	15	16	20
	5,0	12	13	14	13	35
	10,0	9	8	7	8	60
	100,0	1	0	2	1	95

А.3 Примеры определения средней летальной концентрации вещества при тестировании *по методу Б*

А.3.1 Пример проведения предварительного тестирования по 5.4 для выбора диапазона концентраций *вещества,* в пределах которого необходимо провести окончательное тестирование, приведен в таблице А.5.

Таблица А.5

Массовая концентрация *вещества*, мг/дм^3	Количество выживших тест-организмов, *шт., после тестирования в течение*	
	24 ч	48 ч
0 (контрольная *проба)*	5	5
0,10	5	5
0,32	5	5
1,0	5	5
3,2	5	3
10	0	0
32	0	0
100	0	0

Из данных таблицы А.5 следует, что диапазон концентраций *вещества*, в пределах которого необходимо провести окончательное тестирование, составляет от 1,0 до 10 мг/дм^3.

А.3.2 Пример проведения окончательного тестирования приведен в таблице А.6.

Таблица А.6

Продолжительность *тестирования*, ч	*Массовая* концентрация *вещества*, мг/дм^3	*Количество выживших тест-организмов в контейнерах, шт.*				Общее количество выживших тест-организмов, *шт.*	*Процент гибели тест-организмов, %*
		№ 1	№ 2	№ 3	№ 4		
24	0 (контрольная *проба*)	5	5	5	5	20	0
	1,0	5	5	5	5	20	0
	1,8	5	5	5	5	20	0
	3,2	4	5	4	5	18	10
	5,6	2	3	1	2	8	60
	10	0	1	0	1	2	90
48	0 (контрольная *проба*)	5	5	5	5	20	0
	1,0	5	5	5	5	20	0
	1,8	5	4	5	3	17	15
	3,2	3	1	1	2	7	65
	5,6	0	0	1	1	2	90
	10	0	0	0	0	0	100

А.3.3 По результатам тестирования в течение 24 и 48 ч, приведенным в таблице А.6, 50 %-ная гибель тест-организмов не зарегистрирована. В этом случае для обработки результатов тестирования применяют пробит-анализ аналогично А.4 и получают следующие значения: средняя летальная концентрация пробы вещества при тестировании в течение 24 ч (24 ч $ЛК_{50}$) равна 5,4 мг/дм^3; средняя летальная концентрация пробы вещества при тестировании в течение 48 ч (48 ч $ЛК_{50}$) равна 2,9 мг/дм^3.

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

А.4.1 Если в результате тестирования не зарегистрировано конкретное значение средней летальной кратности разбавления (концентрации) пробы, то результаты тестирования обрабатывают с применением метода математической статистики — пробит-анализа. Значения пробитов, соответствующие гибели тест-организмов в диапазоне от 0 % до 99 %, приведены в таблице А.7.

Таблица А.7

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

А.4.2 Результаты тестирования по определению средней летальной кратности разбавления пробы на примере сточной воды приведены в таблице А.8.

Таблица А.8

Кратность разбавления анализируемой пробы сточной воды С, %	Десятичный логарифм кратности разбавления (lg С)	Процент гибели тест-организмов, %	Значения пробитов по таблице А.7
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 таблице А.8, получены в результате тестирования анализируемой пробы сточной воды по методу А в течение 72 ч.

А.4.3 По значениям пробитов и десятичных логарифмов кратности разбавлений (см. таблицу А.8) 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 (lgС) *на примере сточной воды* приведен на *рисунке А.1.*

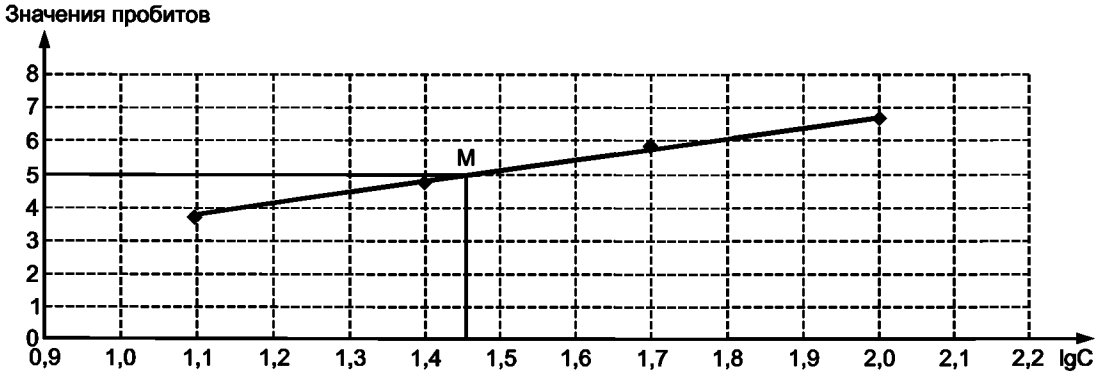


Рисунок А.1 — График линейной зависимости значений пробитов от десятичного логарифма кратности разбавлений анализируемой *пробы* сточной воды

А.4.4 На графике (см. рисунок А.1) на оси ординат из точки, соответствующей значению пробита пять, что определяет 50 %-ную гибель тест-организмов, проводят прямую параллельно оси абсцисс до пересечения с графиком. Из точки пересечения прямой с графиком (М) опускают перпендикуляр на ось абсцисс и получают значение lg С, равное 1,46, соответствующее 72 ч $ЛКР_{50}$.

Используя таблицу антилогарифмов, определяют значение кратности разбавления 72 ч $ЛКР_{50}$, соответствующее 50 %-ной гибели тест-организмов за 72 ч, которое равно 28,84 %.

Приложение В
(обязательное)

Методы культивирования тест-организмов

В.1 Условия культивирования тест-организмов

В.1.1 Исходный материал для культивирования тест-организмов получают в лабораториях, занимающихся тестированием, имеющих культуру требуемой видовой принадлежности. Чувствительность культур к модельному токсиканту должна соответствовать установленному в настоящем стандарте диапазону $ЛК_{50}$ за 48 ч (метод Б) или $ЛК_{50}$ за 72 ч (метод А).

Тест-организмы культивируют и содержат в климатостате, в инкубаторе, на водяной бане 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).

Nitocra spinipes Boeck и *Tisbe battagliai* Volkmann-Rocco необходимо защищать от воздействия прямого света. *Acartia tonsa* Dana может чувствовать себя лучше при освещенности среды с культурой тест-организмов до 2200 лк.

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

Примечания

1 Морские копеподы *Acartia tonsa* Dana, *Tisbe battagliai* Volkmann-Rocco и *Nitocra spinipes* Boeck имеют широкое географическое распространение, обладают коротким жизненным циклом и требуют минимум пространства и оборудования для культивирования и проведения тестирования. Организмы могут культивироваться постоянно в лабораторных условиях.

2 Развитие копепод (веслоногих раков) проходит через шесть науплиальных стадий и пять стадий копеподитов, после чего наступает взрослая стадия. При температуре 20 °С развитие только что вылупившихся науплиев до взрослой стадии проходит за 10—14 сут. Науплии выпускаются непосредственно из яйцевого мешка женской особью *Tisbe battagliai* Volkmann-Rocco и *Nitocra spinipes* Boeck в течение 3—4 сут, *Acartia tonsa* Dana выпускает яйца в течение 2—3 сут.

3 Приведенная в данном приложении информация предназначена для использования только в качестве общего руководства.

В.1.2 Вода для культивирования тест-организмов *по 4.2 и* 5.2 *(далее — морская вода) в зависимости от метода тестирования;* при необходимости корректируют *минерализацию* (соленость) воды в соответствии с условиями тестирования.

В.1.3 Емкости, применяемые для культивирования тест-организмов, должны быть оснащены свободными или перфорированными крышками, чтобы уменьшить испарение, но обеспечить газообмен. Потеря морской воды из-за испарения должна возмещаться путем добавления дистиллированной или деионизированной воды.

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

В.1.5 В качестве корма используют культуру морских одноклеточных водорослей (десятисуточную).

В.2 Условия подготовки к тестированию Artemia salina L.

В.2.1 Оборудование и процедура получения науплиев

Для тестирования используют науплиев Artemia salina L. *в возрасте одних суток (синхронизированная культура), которые получают в лаборатории из яиц.*

Яйца хранят в холодильнике.

Каждую новую партию яиц проверяют на выклев. Используют яйца при выклеве не ниже 80 %, что определяет в дальнейшем физиологическую чувствительность тест-организмов односуточных науплиев Artemia salina L.

Тест-организмы для тестирования получают следующим способом:

- в стакан вместимостью 500 $см^3$ помещают 0,1 г сухих яиц Artemia salina L., *заливают водопроводной питьевой водой и выдерживают 30 мин.*

Примечание — Водопроводную питьевую воду предварительно отстаивают и аэрируют в течение одних суток;

- через 30 мин, не взбалтывая содержимого стакана, сливают слой воды над яйцами, которые осели на дно стакана, удаляя таким образом всплывшие погибшие яйца и пустые оболочки. Процедуру повторяют не менее трех раз (заполняют стакан водой и сливают воду);

- отмытые яйца от пустых оболочек заливают морской водой (см. В.1.2) необходимой минерализации (солености), значением pH 8,0—8,3 и содержанием кислорода не менее 7 мгO_2/дм^3 и при слабой аэрации выдерживают до выклева.

Выклев науплиев из яиц происходит через:

- 48 ч при температуре 20 °С;

- 24 ч при температуре 25 °С.

В.2.2 Регулирование плотности популяции

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

Первых выклюнувшихся науплиев тщательно отбирают из стакана пипеткой Пастера, концентрируя их возле одной из стенок направленным источником света (новорожденные науплии имеют положительный фототаксис).

В течение одного часа в стакане накапливаются новые науплии, их также переносят пипеткой в отдельный сосуд с морской водой и используют для тестирования.

Предварительную адаптацию науплиев Artemia salina L. *к воде нужной минерализации (солености) не проводят, так как рачок эвригалинный и может переносить минерализацию (соленость) в широком диапазоне.*

Вода для замачивания яиц Artemia salina L. *должна быть той же минерализации (солености), что и анализируемая проба.*

В.2.3 Кормление

Науплии Artemia salina L. *в течение 3—4 сут после выклева из яиц не нуждаются в кормлении в связи с эндогенным питанием, поэтому при тестировании их не кормят.*

В.3 Условия культивирования *Acartia tonsa Dana*

В.3.1 Оборудование и процедура культивирования

Базовые культуры *Acartia tonsa* Dana *культивируют* в емкости с объемом *морской* воды (см. 5.2), равным 10—12 дм^3. Аэрацию обеспечивают централизованно через отверстие возле дна емкости диаметром около 1,5 мм, со скоростью приблизительно один пузырек воздуха в секунду. Это обеспечивает мягкую циркуляцию *морской* воды, помогая поддерживать водоросли, являющиеся пищей, во взвешенном состоянии; при этом удобно использовать сферические емкости или емкости с плоским дном. Использование нескольких емкостей позволяет разделять культуры по возрастам.

Морскую воду обновляют, по меньшей мере, один раз в неделю. Использованную *морскую* воду пропускают через несколько нейлоновых сит с ячейками различного размера, в зависимости от того, организмы какого возраста необходимо сохранить или отделить, в порядке, приведенном в таблице В.1.

Таблица В.1

Размер ячейки *сита*, мкм	*Характеристика стадии удерживаемого организма*
60	Удерживает все стадии
100	Удерживает все стадии, кроме яиц и науплиев в возрасте 2 сут
140	Удерживает копеподитов и взрослых особей
180	Удерживает только взрослых особей

Тест-организмы, которые необходимо сохранить для возобновления данной культуры, переносят из сита в свежую *морскую* воду (см. В.1.2). Невылупившиеся яйца собираются на дне емкости и их удаляют путем откачивания *морской* воды со дна емкости. Однако их трудно отделить от молодых науплиев, которые могут там находиться, так как на дне емкости собирается также осадок, включая остатки пищи, который *систематически удаляют.*

Обычно новые культуры возобновляют, используя молодь или взрослых особей, отделяя их во время еженедельной замены *морской* воды, с применением сит размером ячеек 180 и 60 мкм. Допускается проводить отделение молоди с меньшими интервалами времени, что позволяет получить более близкие возрастные группы, в том случае, если, например, особей выращивают для использования при тестировании. Другим способом отделения взрослых особей от молоди является перенос взрослых особей в специальную клетку, которая позволяет яйцам падать сквозь ячейки сита в контейнер с водой.

В.3.2 Регулирование плотности популяции

Как правило, нет необходимости регулировать плотность популяции, которая была начата особями в возрасте менее семи суток, до конца первой недели, когда плотность популяции обычно не превышает 25—50 особей на 1 дм^3. Когда копеподы достигают взрослой стадии, плотность, при необходимости, должна быть снижена до 25 особей на 1 дм^3. Рекомендуется избавляться от взрослых особей в возрасте 5—6 недель.

В.3.3 Кормление

Тест-организмы *Acartia tonsa Dana* питаются двумя видами одноклеточных водорослей, выращиваемых в лабораторных условиях, *Isochrysis galbana и Rhodomonas reticulata.* Эти водоросли выращивают с использованием асептической технологии, чтобы исключить заражение культуры бактериями, водорослями и простейшими организмами. Для выращивания водорослей *Isochrysis galbana* и *Rhodomonas reticulata* используют следующие питательные растворы:

a) Раствор А, *состав которого приведен в таблице В.2.* Раствор А хранят в холодильнике при температуре около 4 °С *не более года.*

Таблица В.2

Состав раствора	*Количество компонента*
Азотнокислый натрий по ГОСТ 4168 ($NaNO_3$)	100,00 г
Натрий фосфорнокислый однозамещенный одноводный ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)	20,00 г
Хлорид железа 6-водный по ГОСТ 4147 ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	1,30 г
Марганец (II) хлористый 4-водный по ГОСТ 612 ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$)	0,36 г
Борная кислота по ГОСТ 9656 (H_3BO_3)	33,60 г
Соль динатриевая этилендиамин-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты 2-водная (трилон Б) по ГОСТ 10652	45,00 г
Раствор В (см. таблицу В.4)	1,00 $см^3$
Дистиллированная вода *по ГОСТ 6709*	1 $дм^3$

b) Раствор В, *состав которого приведен в таблице В.3.* Раствор В хранят в холодильнике при температуре около 4 °С *не более года.*

Таблица В.3

Состав раствора	*Количество компонента*
Витамин B_{12}	0,02 г
Витамин B_1 (тиамин)	0,40 г
Дистиллированная вода *по ГОСТ 6709*	1 $дм^3$

c) Раствор С, состав которого *приведен в таблице В.4, используют* для приготовления раствора А. *Раствор С хранят в холодильнике при температуре около 4 °С не более года.*

Таблица В.4

Состав раствора	*Количество компонента*
Цинк хлористый по ГОСТ 4529 ($ZnCl_2$)	2,1 г
Кобальт хлористый 6-водный по ГОСТ 4525 ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	2,00 г
Аммоний молибденовокислый 4-водный ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$)	0,90 г
Медь (II) сернокислая 5-водная ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	2,00 г
Дистиллированная вода *по ГОСТ 6709*	100 $см^3$
Примечание — *В приготовленный раствор* добавляют *соляную* кислоту *молярной концентрации* 0,1 моль/$дм^3$ до тех пор, пока раствор не станет прозрачным.	

Питательную среду для выращивания водорослей готовят следующим способом:

Морскую воду фильтруют через сито с ячейкой размером 1,0 мкм и обрабатывают в автоклаве в течение 15 мин при температуре 120 °С.

В колбу, содержащую 1 $дм^3$ отфильтрованной и обработанной в автоклаве морской воды, добавляют 1,0 $см^3$ раствора А и 0,05 $см^3$ раствора В. Питательные вещества (растворы А и В) добавляют в морскую воду через стерилизующий фильтр.

Культивирование водорослей проводят в стеклянных колбах вместимостью 3 $дм^3$ при температуре (20 ± 2) °С с аэрацией среды. Естественное освещение имитируют, используя лампы дневного света, обеспечивающие освещенность от 3000 до 10000 лк, при соблюдении *следующего режима*: 16 ч — воздействие света, 8 ч — без воздействия света (в темноте).

Культивирование водорослей проводят следующим способом:

В колбу с питательной средой добавляют 15 $см^3$ суспензии водорослей из маточной культуры и выращивают водоросли в течение десяти суток. Через 10 сут, когда плотность клеток обычно достигает максимума (10^7 клеток/$см^3$ — для *Isochrysis* galbana и $5 \cdot 10^6$ *клеток/см³ — для Rhodomonas reticulata), культуры водорослей сгущают* (концентрируют) с помощью центрифуги и размешивают до состояния суспензии, разбавляя морской водой. Таким способом получают суспензию водорослей, предназначенную для корма тест-организмов, плотность которой достигает примерно $5 \cdot 10^7$ клеток/$см^3$ для *Isochrysis galbana и* $3 \cdot 10^7$ клеток/$см^3$ для *Rhodomonas reticulata.* Суспензии водорослей хранят в холодильнике *при температуре от 0 °С до 4 °С* в течение 7 сут.

В емкости для культивирования тест-организмов вносят корм: по 0,25 $см^3$ суспензии каждого вида водорослей на 1 $дм^3$ морской воды, что обеспечивает плотность клеток $2 \cdot 10^7$ клеток/$дм^3$ ($1,25 \cdot 10^7$ клеток/$дм^3$ для *Isochrysis* galbana и $0,75 \cdot 10^7$ клеток/$дм^3$ для *Rhodomonas reticulata).* Тест-организмы кормят каждый день в одинаковом объеме при условии, что пища, заданная в предыдущий день, съедена полностью.

Существует альтернативный режим, когда корм из смешанных водорослей применяют только на науплиальных стадиях, на более поздних стадиях тест-организмы кормят только водорослями *Rhodomonas reticulata.*

В.4 Условия культивирования *Tisbe battagliai* Volkmann-Rocco

В.4.1 Оборудование и процедура культивирования

Tisbe battagliai Volkmann-Rocco культивируют в емкостях, содержащих от 2 до 5 $дм^3$ морской воды (см. 5.2), без аэрации. Используют, как минимум, четыре емкости, чтобы можно было разделить тест-организмы по возрасту и обеспечить постоянное возобновление тест-организмов для тестирования.

Морскую воду, в которой выращивают тест-организмы, обновляют один раз в неделю: использованную морскую воду с тест-организмами пропускают через несколько нейлоновых сит с ячейками различного размера в зависимости от того, какого возраста тест-организмы должны быть отделены, в порядке, приведенном в таблице В.5.

Таблица В.5

Размер ячейки сита, мкм	*Характеристика стадии удерживаемого организма*
60	Удерживает все стадии
100	Удерживает все стадии, кроме науплиев в возрасте 0—2 сут
140	Удерживает копеподитов старше 5 сут и взрослых особей
180	Удерживает поздних копеподитов и взрослых *особей*
250	Удерживает большую часть взрослых *особей*

Тест-организмы, которые необходимо сохранить для возобновления данной культуры, переносят из сита в свежую морскую воду (см. В.1.2). Следует отметить, что копеподиты и взрослые особи прилипают к стенкам емкости, но их можно смыть на сито с помощью струи морской воды из пипетки или бутыли.

Для обычных целей новые культуры возобновляют путем отделения молоди от взрослых особей во время еженедельной замены морской воды с использованием сит с ячейками размером 180 и 60 мкм. Последующие отделения особей по стадиям жизненного цикла с более короткими интервалами используют для отделения тест-организмов с меньшей разницей в возрасте, если, например, эти тест-организмы выращивают для дальнейшего использования при тестировании.

В.4.2 Регулирование плотности популяции

Как правило, нет необходимости регулировать плотность популяции, которая была начата особями в возрасте менее семи суток, до конца первой недели, когда плотность популяции обычно не превышает 100 особей на 1 $дм^3$. Рекомендуется избавляться от взрослых особей в возрасте 4—5 недель.

В.4.3 Кормление

Tisbe battagliai Volkmann-Rocco питаются морскими водорослями. Успешно зарекомендовала себя одна из водорослей, *Isochrysis galbana,* хотя смесь этой водоросли с *Rhodomonas reticulata* лучше усваивается тест-организмами. Культивирование водорослей и подготовка культур — в соответствии с требованиями В.3.3.

Если для корма используют только водоросли *Isochrysis galbana,* то на 1 $дм^3$ свежей морской воды вносят 5 $см^3$ суспензии водорослей (плотность $5 \cdot 10^7$ клеток/$см^3$) (см. В.1.2), чтобы обеспечить плотность водорослей, равную $2,5 \cdot 10^8$ клеток/$дм^3$. Если используют оба вида водорослей, то на 1 $дм^3$ воды вносят 3 $см^3$ суспензии водоросли *Isochrysis galbana* и 2 $см^3$ *Rhodomonas reticulata* (плотность $3 \cdot 10^7$ клеток/$см^3$) (что обеспечивает плотность $1,5 \cdot 10^8$ клеток/$дм^3$ водоросли *Isochrysis galbana* и $0,6 \cdot 10^8$ клеток/$дм^3$ водоросли *Rhodomonas reticulata).*

Обычно тест-организмы при культивировании кормят ежедневно. При содержании взрослых тест-организмов с более высокой плотностью популяции требуется соответственно и дополнительное питание в таком же объеме (указанном выше) один или два раза в неделю, но при условии, что предыдущая порция пищи съедена. Тест-организмы, состоящие из науплиев в возрасте одной недели и копеподитов ранних стадий, обычно не требуют дополнительного питания.

В.5 Условия культивирования *Nitocra spinipes* Boeck

В.5.1 Оборудование и процедура культивирования

Nitocra spinipes Boeck культивируют в емкостях, например в кристаллизаторах вместимостью 150 $см^3$, содержащих по 100 $см^3$ морской воды (см. 5.2), без аэрации. Для обеспечения отделения культур по возрастам и обеспечения постоянного возобновления тест-организмов для тестирования требуется примерно 15 таких емкостей.

Каждую неделю необходимо обновлять культуру тест-организмов путем переноса 10—15 женских особей с видимыми яйцевыми мешками в кристаллизаторы, содержащие по 100 $см^3$ свежей морской воды. Для обновленных культур необходимо заменять 50 % морской воды через две недели. После этого заменяют 50 % морской воды не реже одного раза в неделю.

Для тестирования необходимо отбирать взрослых копепод без яичных мешков в возрасте 3—4 недели.

В.5.2 Регулирование плотности популяции

Как правило, нет необходимости регулировать плотность популяции тест-организмов при культивировании указанной культуры.

Рекомендуется избавляться от взрослых особей в возрасте 4—6 недель.

В.5.3 Кормление

Tisbe battagliai Volkmann-Rocco питаются молотым кормом для лосося, который приобретают в *готовом виде*. Шарики корма для молодых лососей диаметром около 1 мм высушивают при 50 °С в течение 24 ч. После остывания *шарики* корма измельчают в ступке, затем помещают в пробирки с завинчивающимися крышками. Пробирки с кормом стерилизуют при 120 °С в течение 24 ч. Хранят подготовленный корм так же, как корм для лосося, в морозильнике.

Для кормления тест-организмов возобновленной культуры в емкости с водой для культивирования объемом 100 $см^3$ вносят около 20 мг корма одновременно с 1 $см^3$ донных отложений из воды старой культуры. После этого кормление продолжают, внося по 10 мг корма три раза в неделю. Следует добавлять не слишком много корма, поскольку может произойти уменьшение содержания кислорода, что может вызвать ухудшение условий выращивания тест-организмов.

Приложение С
(справочное)

Информация о результатах проведенных межлабораторных испытаний *для метода Б*

С.1 Результаты тестирования, проведенные в 1991 году при межлабораторных испытаниях, приведены в таблице С.1.

Таблица С.1

Вещества и тест-организмы	Количество лабораторий	Количество использованных результатов	Среднеарифметическое значение $ЛК_{50}$, мг/дм^3	Стандартное отклонение			
				в условиях повторяемости		*в условиях* воспроизводимости	
				абсолютное, мг/дм^3	относительное, %	абсолютное, мг/дм^3	относительное, %
3,5-дихлорфенол *Acartia tonsa*	7	14	0,95	0,22	23	0,55	58
Tisbe battagliai	4	16	2,25	0,82	36	1,07	48
Двухромовокислый калий *Nitocra spinipes при минерализации* (солености):							
7—9 мг/дм^3 (7—9 ‰)	11	61	18,7	4,38	23	7,85	42
15—29 мг/дм^3 (15—29 ‰)	4	23	34,6	7,61	22	16,2	47

Примечание — Данные *для Acartia tonsa* и *Tisbe battagliai* приведены для *тестирования* в течение 48 ч; данные для *Nitocra spinipes* — для 96 ч.

Приложение ДА
(справочное)

Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного стандарта

ДА.1 Сопоставление структуры настоящего стандарта со структурой примененного в нем международного стандарта ИСО 14669:1999 приведено в таблице ДА.1. Указанное в таблице ДА.1 изменение структуры национального стандарта Российской Федерации относительно структуры примененного международного стандарта обусловлено приведением в соответствие требований, установленных в ГОСТ Р 1.7, и включением дополнительного к ИСО 14669:1999 метода определения токсичности для учета потребностей национальной экономики Российской Федерации.

Таблица ДА.1

Структура международного стандарта ИСО 14669:1999			Структура настоящего национального стандарта		
Раздел 1			Раздел 1		
Раздел 2			Раздел 2		
Раздел 3			Разделы 4; 5		
Раздел 4			Раздел 1 (4-й абзац)		
Раздел 5			Подразделы 4.2; 5.2		
Подразделы	Пункты	Подпункты	Разделы	Пункты	Подпункты
5.1	—	—	4; 5	4.2; 5.2	—
5.2	—	—	4	4.2	—
5.3	—	—	4; 5	4.2; 5.2	—
Раздел 6			Подразделы 4.2; 5.2		
Подразделы	Пункты	Подпункты	Разделы	Пункты	Подпункты
6.1	—	—	4	4.2	—
6.2	—	—		4.2	—
6.3	—	—		4.2	—
6.4	—	—	5	5.2	—
Раздел 7			Разделы 3; 4; 5		
Подразделы	Пункты	Подпункты	Разделы	Пункты	Подпункты
7.1	—	—	3	3.1	—
7.2	—	—	4	4.3	—
			5	—	5.3.2
—	7.2.1	—	4	4.3.4	4.3.4.4
—	7.2.2	—		—	4.3.4.6
Раздел 8			Подразделы 4.4; 5.4		
Подразделы	Пункты	Подпункты	Разделы	Пункты	Подпункты
8.1	—	—	4		4.4.1
8.2	—	—			4.4.2
8.3	—	—			4.4.3
8.4	—	—	5		5.4.1.3
8.5	—	—	4; 5		4.3.3; 5.3.3

Окончание таблицы ДА.1

Структура международного стандарта ИСО 14669:1999			Структура настоящего национального стандарта		
Раздел 9			Подраздел 4.5		
Подразделы	Пункты	Подпункты	Разделы	Пункты	Подпункты
9.1	—	—			4.5.5
9.2	—	—			4.5.7
9.3	—	—			4.6.2
Раздел 10			Подраздел 5.5		
Раздел 11			Подраздел 4.6		
Приложение А		А.1	Приложение А		А.3.1
		А.2			А.3.2
		А.2.1			А.3.2
		А.2.2			А.4
Приложение В		В.1	Приложение В		В.1
		В.2			В.1.2
		В.3			В.1.1
		В.4			В.1
		В.4.1			В.1.1
		В.4.2			В.3
		В.4.2.1			В.3.1
		В.4.2.2			В.3.2
		В.4.2.3			В.3.3
		В.4.3			В.4
		В.4.3.1			В.4.1
		В.4.3.2			В.4.2
		В.4.3.3			В.4.3
		В.4.4			В.5
		В.4.4.1			В.5.1
		В.4.4.2			В.5.2
		В.4.4.3			В.5.3
Приложение С		—	Приложение С		С.1
—			Приложение ДА		
—			Приложение ДБ		

Примечание — Раздел 3, подразделы 5.2, 8.3 международного стандарта состоят из значительного количества абзацев, которые в настоящем стандарте размещены в соответствующих подразделах, указанных в данной таблице.

Приложение ДБ
(справочное)

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

Таблица ДБ.1

Обозначение ссылочного национального, межгосударственного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование ссылочного международного стандарта
ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025—2006	IDT	ИСО/МЭК 17025—2005 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий»
ГОСТ Р 51592—2000	NEQ	ИСО 5667-1:1982 «Качество воды. Отбор проб. Часть 1. Руководство по составлению программы отбора проб»*
		ИСО 5667-2:1991 «Качество воды. Отбор проб. Часть 2. Руководство по методам отбора проб»*
		ИСО 5667-3:1994 «Качество воды. Отбор проб. Часть 3. Руководство по хранению и обращению с пробами»**
ГОСТ Р 53228—2008	—	—
ГОСТ 17.1.5.05—85	—	—
ГОСТ 17.4.4.02—84	—	—
ГОСТ 245—76	—	—
ГОСТ 612—75	—	—
ГОСТ 1770—74	IDT	ИСО 1042:1998 «Посуда лабораторная стеклянная. Мерные колбы с одной меткой»
		ИСО 4788:1980 «Посуда лабораторная стеклянная. Градуированные мерные цилиндры»***
ГОСТ 3118—77	—	—
ГОСТ 3765—78	—	—
ГОСТ 4147—74	—	—
ГОСТ 4166—76	—	—
ГОСТ 4168—79	NEQ	ИСО 6353-3:1987 «Реактивы для химического анализа. Часть 3. Технические условия. Вторая серия»
ГОСТ 4201—79	NEQ	ИСО 6353-3:1987 «Реактивы для химического анализа. Часть 3. Технические условия. Вторая серия»
ГОСТ 4209—77	NEQ	ИСО 6353-1:1982 «Реактивы для химического анализа. Часть 1. Общие методы испытаний»
		ИСО 6353-2:1983 «Реактивы для химического анализа. Часть 2. Технические условия. Первая серия»
ГОСТ 4220—75	—	—
ГОСТ 4233—77	NEQ	ИСО 6353-1:1982 «Реактивы для химического анализа. Часть 1. Общие методы испытаний»
		ИСО 6353-2:1983 «Реактивы для химического анализа. Часть 2. Технические условия. Первая серия»

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

Окончание таблицы ДБ.1

Обозначение ссылочного национального, межгосударственного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование ссылочного международного стандарта
ГОСТ 4234—77	NEQ	ИСО 6353-1:1982 «Реактивы для химического анализа. Часть 1. Общие методы испытаний»
		ИСО 6353-3:1987 «Реактивы для химического анализа. Часть 3. Технические условия. Вторая серия»
ГОСТ 4328—77	—	—
ГОСТ 4461—77	NEQ	ИСО 6353-2:1983 «Реактивы для химического анализа. Часть 2. Технические условия. Первая серия»
ГОСТ 4525—77	NEQ	ИСО 6353-1:1982 «Реактивы для химического анализа. Часть 1. Общие методы испытаний»
		ИСО 6353-3:1987 «Реактивы для химического анализа. Часть 3. Технические условия. Вторая серия»
ГОСТ 4529—78	—	—
ГОСТ 6709—72	—	—
ГОСТ 9147—80	—	—
ГОСТ 9656—75	—	—
ГОСТ 10652—73	NEQ	ИСО 6353-2:1983 «Реактивы для химического анализа. Часть 2. Технические условия. Первая серия»
ГОСТ 12026—76	—	—
ГОСТ 19126—2007	—	—
ГОСТ 25336—82	IDT	ИСО 1773:1976 «Посуда лабораторная стеклянная. Узкогорлые колбы для кипячения»*
		ИСО 3819:1985 «Посуда лабораторная стеклянная. Стаканы»
		ИСО 4797:1981 «Посуда лабораторная стеклянная. Колбы с коническими шлифами»**
ГОСТ 29227—91	IDT	ИСО 835-1—81 «Посуда лабораторная стеклянная. Мерные пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования»***
Примечание — В настоящей таблице использованы следующие условные обозначения степени соответствия стандартов: - IDT — идентичные стандарты; - NEQ — неэквивалентные стандарты.		

* Заменен на ИСО 1773:1997.

** Заменен на ИСО 4797:2004.

*** Заменен на ИСО 835:2007.

Библиография

*[1] ПНД Ф 12.1:2:2.2:2.3.2—03**	*«Отбор проб почв, грунтов, осадков биологических очистных сооружений, шламов промышленных сточных вод, донных отложений искусственно созданных водоемов, прудов-накопителей и гидротехнических сооружений». Экологический Центр аналитического контроля, М., 2003*
*[2] ПНД Ф 12.15.1—08**	*«Методические указания по отбору проб для анализа сточных вод». Утверждены ФГУ «Федеральный центр анализа и оценки техногенного воздействия» Ростехнадзора, от 18 апреля 2008 г.*
*[3] НВН 33-5.3.01—85**	*«Инструкция по отбору проб для анализа сточных вод». Утверждена приказом Минводхоза СССР от 13 июля 1985 г.*

* Действует до утверждения аналогичного национального стандарта.

УДК 543.63:544:632:006.354 ОКС 13.060.70 Н08 ОКП 01 3300

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

Редактор *Л.В. Коретникова*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.В. Бучная*
Компьютерная верстка *И.А. Налейкиной*

Сдано в набор 12.12.2011. Подписано в печать 16.01.2012. Формат 60 × 84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 4,18. Уч.-изд. л. 3,50. Тираж 139 экз. Зак. 53.

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 123995 Москва, Гранатный пер., 4.
gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru
Набрано во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» на ПЭВМ.
Отпечатано в филиале ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» — тип. «Московский печатник», 105062 Москва, Лялин пер., 6.

gost.e-ecolog.ru