

## **МИНИСТЕРСТВО ПРИРОДНЫХ РЕСУРСОВ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра  
природных ресурсов  
Российской Федерации  
Н.Н. Михеев

27 апреля 2001 г.

### **РУКОВОДСТВО по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов**

**РЭФИА, НИА-Природа  
Москва-2002**

Настоящее «Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов» содержит ранее и вновь разработанные методики биотестирования для определения токсичности сточных и природных пресных и морских вод, донных отложений, отработанных буровых растворов и загрязняющих веществ с использованием в качестве тест-объектов бактерий, водорослей, простейших, ракообразных и рыб.

Метод биотестирования наряду с физико-химическими методами применяется при установлении нормативных требований к качеству вод и предназначен для использования Министерством природных ресурсов Российской Федерации, его территориальными органами и подведомственными организациями, а также научно-исследовательскими, проектными и производственными организациями, имеющими разрешение на проведение работ по биотестированию в соответствии с установленными требованиями.

#### **ПРЕДИСЛОВИЕ**

Настоящее «Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов» содержит ранее и вновь разработанные методики биотестирования для определения токсичности сточных и природных (пресных и морских) вод, донных отложений, отработанных буровых растворов, сбрасываемых в море, и загрязняющих веществ.

Метод биотестирования наряду с физико-химическими методами применяется при установлении нормативных требований к качеству вод, при проведении экологического контроля за соблюдением нормативов допустимых сбросов химических веществ в водные объекты, нормативов допустимых воздействий хозяйственной и иной деятельности на водные объекты, осуществлении государственного экологического мониторинга за состоянием водных объектов в районах расположения источников антропогенного воздействия, проведении оценки изменения состояния водных экосистем, биоценозов.

Исследования в области разработки и использования метода биотестирования в водоохранной практике проводились во многих научно-исследовательских и учебных институтах. В 1980г. была признана необходимость применения биотестирования как показателя оперативной интегральной диагностики качества вод. В 1981-1986 гг. методики биотестирования были апробированы и рекомендованы для определения токсичности сточных и природных вод. По итогам апробации Всесоюзным научно-исследовательским институтом по охране вод (ВНИИВО) - головным институтом по разработке и использованию методов определения токсичности вод в 1990 г. было подготовлено и утверждено Государственным комитетом СССР по охране природы «Методическое руководство по биотестированию воды» (РД 118-02-90). В этот документ вошли методики с использованием тест-объектов - представителей основных трофических звеньев водной экосистемы:

водорослей, ракообразных и рыб. Позднее, для целей государственного экологического контроля Минприроды России, а затем Госкомэкологией России были подготовлены и утверждены методики для определения токсичности воды с использованием в качестве тест-объектов инфузорий и ракообразных (ПНД Ф Т\* 14.1:2:3:4.2-98; ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.3-99; ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.4-99), и для определения токсичности вод, почв и донных отложений - методика биотестирования по ферментативной активности бактерий (ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.1-96, 16.2:2:3:1.2.-96).

\* **Примечание:** ПНД Ф Т - федеральный природоохранный нормативный документ, регламентирующий токсикологические методы контроля.

Настоящее руководство содержит впервые разработанные методики определения токсичности донных отложений, морских вод, буровых растворов, сбрасываемых в морскую воду.

Методики прошли экспертизу в Уральском научно-исследовательском институте метрологии Госстандарта России, на основании которой дано заключение о соответствии установленных для них метрологических характеристик требованиям, предъявляемым к методикам выполнения измерений (письмо УНИИМ Госстандарта России от 30.09.99 № 224-10.0/2385).

В Руководстве учтены требования европейских стандартов и документов международных организаций (разделы «[Общие положения](#)», «[Нормативные ссылки](#)», «[Приложение В](#)»).

Для определения токсичности природных пресных вод и донных отложений сточных вод, отработанных буровых растворов и загрязняющих веществ рекомендуется применять «Методику биотестирования по снижению уровня билюминесценции бактерий *Photobacterium phosphoreum* (Cohn) Ford»; «Методику биотестирования по снижению прироста количества инфузорий *Tetrahymena pyriformis* (Ehrenberg) Schewiakoft»; «Методику биотестирования по угнетению роста пресноводных водорослей *Scenedesmus quadricauda* (Turp) Vreb»; «Методику биотестирования по гибели ракообразных *Daphnia magna* Straus»; «Методику биотестирования по гибели ракообразных *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg»; «Методику биотестирования по выживаемости и плодовитости ракообразных *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg»; «Методику биотестирования по гибели рыб *Poecilia reticulata* Peters».

Для определения токсичности морских вод и донных отложений, сточных вод разной степени солености и отработанных буровых растворов, сбрасываемых в морские воды, рекомендуется использовать «Методику биотестирования по угнетению роста одноклеточных морских водорослей *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin»; «Методику биотестирования по гибели ракообразных *Artemia salina* L.»; «Методику биотестирования по гибели рыб *Poecilia reticulata* Peters»; «Методику биотестирования по снижению уровня билюминесценции бактерий *Photobacterium phosphoreum* (Cohn) Ford».

Руководство было рассмотрено и рекомендовано к утверждению Научно-техническим советом Министерства природных ресурсов Российской Федерации (протокол от 17.07.2000 г. № 17 совместного заседания Секции водного хозяйства и Подсекции нормативов в области использования и охраны водных объектов под председательством Первого заместителя Министра природных Российской Федерации Н.Н. Михеева).

Авторами методик являются специалисты ведущих научных учреждений как бывшего Советского Союза, так и России: Всесоюзного научно-исследовательского института по охране вод (ныне Украинский научно-исследовательский институт экологических проблем Минэкоресурсов Украины), Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Гидрохимического института Росгидромета, Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии Госкомрыболовства России, Государственного научно-исследовательского института озерного и речного рыбного хозяйства Росрыбхоза России, Федерального государственного унитарного предприятия комплексного научно-исследовательского и конструкторно-технологического института водоснабжения, канализации, гидротехнических сооружений и инженерной гидрогеологии Госстроя России, Института биологии внутренних вод РАН, бывшего Главного управления аналитического контроля при Минприроды России (ныне ФГУ «Центр экологического контроля и анализа МПР России»), Института экологической токсикологии МПР России,

Института гидробиологии АН СССР (ныне НАН Украины), Института биологии южных морей АН СССР (ныне НАН Украины), ГУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина РАМН; Красноярского государственного университета и др. Список авторов методик приведен в «Приложении Д» настоящего документа.

## СОДЕРЖАНИЕ

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ
2. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ
3. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ
4. ОТБОР, ХРАНЕНИЕ, ПОДГОТОВКА ПРОБ, ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ ВЕЩЕСТВ, РАЗБАВЛЕНИЙ ПРОБ ВОДЫ, ВОДНЫХ ВЫТЯЖЕК ИЗ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ И БУРОВЫХ РАСТВОРОВ
5. УСЛОВИЯ БЕЗОПАСНОГО ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТ
6. ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ЛИЦ, ПРОВОДЯЩИХ БИОТЕСТИРОВАНИЕ
7. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО СНИЖЕНИЮ УРОВНЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ БАКТЕРИЙ PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM (CONN) FORD
  - 7.1. Назначение и область применения
  - 7.2. Принцип методики
  - 7.3. Характеристики погрешности измерений
  - 7.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы
  - 7.5. Условия выполнения биотестирования
  - 7.6. Подготовка к выполнению биотестирования
  - 7.7. Выполнение биотестирования
  - 7.8. Обработка и оценка результатов
  - 7.9. Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности
8. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО СНИЖЕНИЮ ПРИРОСТА КОЛИЧЕСТВА ИНФУЗОРИЙ TETRAHYMENA PYRIFORMIS (EHRENBERG) SCHEWIAKOFF
  - 8.1. Назначение и область применения
  - 8.2. Принцип методики
  - 8.3. Характеристики погрешности измерений
  - 8.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы
  - 8.5. Условия выполнения биотестирования
  - 8.6. Подготовка к выполнению биотестирования
  - 8.7. Выполнение биотестирования
  - 8.8. Обработка и оценка результатов
  - 8.9. Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности
9. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО УГНЕТЕНИЮ РОСТА ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ПРЭСНОВОДНЫХ ВОДРОСЛЕЙ SCENEDESMUS QUADRICAUDA (TURP) BREV
  - 9.1. Назначение и область применения
  - 9.2. Принцип методики
  - 9.3. Характеристики погрешности измерений
  - 9.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы
  - 9.5. Условия выполнения биотестирования
  - 9.6. Подготовка к выполнению биотестирования
  - 9.7. Выполнение биотестирования
  - 9.8. Обработка и оценка результатов
  - 9.9. Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности
10. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО ГИБЕЛИ РАКООБРАЗНЫХ DAPHNIA MAGNA STRAUS
  - 10.1. Назначение и область применения
  - 10.2. Принцип методики
  - 10.3. Характеристики погрешности измерений
  - 10.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы
  - 10.5. Условия выполнения биотестирования

[10.6. Подготовка к выполнению биотестирования](#)

[10.7. Выполнение биотестирования](#)

[10.8. Обработка и оценка результатов](#)

[10.9. Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности](#)

#### [11. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО ГИБЕЛИ РАКООБРАЗНЫХ CERIODAPHNIA AFFINIS LILLJEBORG](#)

[11.1. Назначение и область применения](#)

[11.2. Принцип методики](#)

[11.3. Характеристики погрешности измерений](#)

[11.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы](#)

[11.5. Условия выполнения биотестирования](#)

[11.6. Подготовка к выполнению биотестирования](#)

[11.7. Выполнение биотестирования](#)

[11.8. Обработка и оценка результатов](#)

[11.9. Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности](#)

#### [12. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО ВЫЖИВАЕМОСТИ И ПЛОДОВИТОСТИ РАКООБРАЗНЫХ CERIODAPHNIA AFFINIS LILLJEBORG](#)

[12.1. Назначение и область применения](#)

[12.2. Принцип методики](#)

[12.3. Характеристики погрешности измерений](#)

[12.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы](#)

[12.5. Условия выполнения биотестирования](#)

[12.6. Подготовка к выполнению биотестирования](#)

[12.7. Выполнение биотестирования](#)

[12.8. Обработка и оценка результатов](#)

[12.9. Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности](#)

#### [13. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО ГИБЕЛИ РЫБ ROESILLIA RETICULATA PETERS](#)

[13.1. Назначение и область применения](#)

[13.2. Принцип методики](#)

[13.3. Характеристики погрешности измерений](#)

[13.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы](#)

[13.5. Условия выполнения биотестирования](#)

[13.6. Подготовка к выполнению биотестирования](#)

[13.7. Выполнение биотестирования](#)

[13.8. Обработка и оценка результатов](#)

[13.9. Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности](#)

#### [14. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО УГНЕТЕНИЮ РОСТА ОДНОКЛЕТОЧНЫХ МОРСКИХ ВОДОРОСЛЕЙ PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM BOHLIN](#)

[14.1. Назначение и область применения](#)

[14.2. Принцип методики](#)

[14.3. Характеристики погрешности измерений](#)

[14.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы](#)

[14.5. Условия выполнения биотестирования](#)

[14.6. Подготовка к выполнению биотестирования](#)

[14.7. Выполнение биотестирования](#)

[14.8. Обработка и оценка результатов](#)

[14.9. Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности](#)

#### [15. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО ГИБЕЛИ РАКООБРАЗНЫХ ARTEMIA SALINA L.](#)

[15.1. Назначение и область применения](#)

[15.2. Принцип методики](#)

[15.3. Характеристики погрешности измерений](#)

[15.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы](#)

[15.5. Условия выполнения биотестирования](#)

[15.6. Подготовка к выполнению биотестирования](#)

[15.7. Выполнение биотестирования](#)

[15.8. Обработка и оценка результатов](#)

[15.9. Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности](#)

## [16. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО ГИБЕЛИ РЫБ ROESILLIA RETICULATA](#)

### [PETERS](#)

[16.1. Назначение и область применения](#)

[16.2. Принцип методики](#)

[16.3. Характеристики погрешности измерений](#)

[16.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы](#)

[16.5. Условия выполнения биотестирования](#)

[16.6. Подготовка к выполнению биотестирования](#)

[16.7. Выполнение биотестирования](#)

[16.8. Обработка и оценка результатов](#)

[16.9. Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности](#)

### [ПРИЛОЖЕНИЯ](#)

[Приложение А Термины и определения](#)

[Приложение Б Алгоритм установления характеристик погрешности методик биотестирования](#)

[Приложение В Установление средней эффективной \(летальной\) концентрации токсического вещества \(смеси веществ\) и среднего эффективного \(летального\) разбавления воды \(водной вытяжки\), бурового раствора](#)

[Приложение Г Форма протокола биотестирования](#)

[Приложение Д Разработчики методик «Руководства по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов»](#)

## **1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ**

1.1. Метод биотестирования по определению токсичности сточных и природных пресных и морских вод, донных отложений, отработанных буровых растворов загрязняющих веществ применяются наряду с физико-химическими методами при установлении нормативных требований к качеству вод, проведении экологического контроля за соблюдением нормативов допустимых сбросов химических веществ в водные объекты и нормативов допустимых воздействий хозяйственной и иной деятельности на водные объекты; осуществлении государственного экологического мониторинга водных объектов прежде всего, в районах расположения источников антропогенного воздействия; проведении оценки состояния водных экосистем.

1.2. Методики предназначены для использования Министерством природных ресурсов Российской Федерации, его территориальными органами и подведомственными организациями, научно-исследовательскими, проектными и производственными организациями, имеющими разрешение на проведение работ по биотестированию в соответствии с установленными требованиями.

## **2. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ**

- Водный кодекс Российской Федерации от 16 ноября 1995г. [№ 167-ФЗ](#)
- [ГОСТ 12.0.004-79](#) ССБТ. Организация обучения работающих безопасности труда. Общие положения
- [ГОСТ 12.1.004-85](#) ССБТ. Пожарная безопасность. Общие требования
- [ГОСТ 12.1.019-79](#) ССБТ. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты
- [ГОСТ 12.4.009-83](#) ССБТ. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание
- [ГОСТ 12.4.021-75](#) ССБТ. Системы вентиляционные. Общие требования
- [ГОСТ 17.1.1.02-77](#) Охрана природы. Гидросфера. Классификация водных объектов

- [ГОСТ 17.1.5.05-85](#) Охрана природы. Гидросфера. Общие требования к отбору проб поверхностных и морских вод, льда и атмосферных осадков
- [ГОСТ 112-78Е](#) Термометры метеорологические стеклянные. Технические условия
- [ГОСТ 171-81](#) Дрожжи хлебопекарные прессованные. Технические условия
- [ГОСТ 245-76](#) Натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный. Технические условия
- [ГОСТ 612-75](#) Марганец (II) хлористый 4-водный. Технические условия
- [ГОСТ 1770-74Е](#) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Технические условия
- [ГОСТ 2493-75](#) Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия
- [ГОСТ 2874-82](#) Вода питьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством
- [ГОСТ 4147-74](#) Железо (III) хлорид 6-водный. Технические условия
- [ГОСТ 4159-79](#) Йод. Технические условия
- [ГОСТ 4166-76](#) Натрий сернокислый. Технические условия
- [ГОСТ 4201-79](#) Натрий углекислый кислый. Технические условия
- [ГОСТ 4209-77](#) Магний хлористый 6-водный. Технические условия
- [ГОСТ 4217-77](#) Калий азотнокислый. Технические условия
- [ГОСТ 4220-75](#) Калий двуххромовокислый. Технические условия
- [ГОСТ 4233-77](#) Натрий хлористый. Технические условия
- [ГОСТ 4234-77](#) Калий хлористый. Технические условия
- [ГОСТ 4523-77](#) Магний сернокислый 7-водный. Технические условия
- [ГОСТ 4525-77](#) Кобальт хлористый 6-водный. Технические условия
- [ГОСТ 6038-79](#) D-Глюкоза, безводная. Технические условия
- [ГОСТ 6672-75](#) Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия
- [ГОСТ 6709-72](#) Вода дистиллированная. Технические условия
- [ГОСТ 9284-75](#) Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия
- [ГОСТ 9656-75](#) Кислота борная. Технические условия
- [ГОСТ 12026-76](#) Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия
- [ГОСТ 13805-76](#) Пептон сухой для бактериологических целей
- [ГОСТ 14919-83Е](#) Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия
- [ГОСТ 22649-83](#) Стерилизатор воздушный медицинский
- [ГОСТ 24104-88Е](#) Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия
- [ГОСТ 25336-82Е](#) Посуда и оборудование стеклянное. Типы, основные параметры и размеры
- [ГОСТ 27065-86](#) (СТ СЭВ 5184-85) Качество вод. Термины и определения
- [ГОСТ 29227-91](#) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Ч. 1. Общие требования
- [ГОСТ Р 51000.1-95](#) Система аккредитации органов по сертификации, испытательных и измерительных лабораторий. Общие требования
- [ГОСТ Р 51000.2-95](#) Общие требования к аккредитующему органу
- [ГОСТ Р 51000.3-96](#) Общие требования к испытательным лабораториям
- [ГОСТ Р 8.563-96](#) ГСИ. Методики выполнения измерения
- EN 45001 Общие требования к деятельности испытательных лабораторий
- EN 45002 Общие требования при оценке испытательных лабораторий
- ИСО/МЭК 25 Общие требования к оценке технической компетентности испытательных лабораторий
- ИСО/МЭК 2 Общие термины и определения в области стандартизации и смежных видов деятельности
- ИСО/МЭК 45 Общие требования к представлению результатов испытаний
- ИСО 10253: 1995 Качество воды. Тест по угнетению роста морских водорослей *Skeletonema costatum* и *Phaeodactylum tricorutum*
- ТУ 6-09-04711-81 Кальция хлорид
- ТУ 16-064. 011-84 Микрокомпрессоры
- ТУ 64-1-816-77 Камеры счетные

- ТУ 64-1-3326-81 Биолюминометр БЛМ-8703 М
- Норматив водного надзора (НВН) 33-5.3.01-85 Инструкция по отбору проб для анализа сточных вод
- РД 118-02-90 Методическое руководство по биотестированию воды. Утв. Госкомприроды СССР от 06.08.90 г. № 37.
- Керівний нормативний документ (КНД) 211.1.4.047- 95 Методика біотестування морської води та стічної, яка відводиться в море. Методика
- КНД 211.1.4.054-97 Методика визначення гострої токсичності води на ракоподібних *Daphnia magna* Straus
- КНД 211.1.4.055-97 Методика визначення гострої летальної токсичності води на ракоподібних *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg
- КНД 211.1.4.056-97 Методика визначення хронічної токсичності води на ракоподібних *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg
- КНД 211.1.4.057-97 Методика визначення гострої летальної токсичності води на рибах *Poecilia reticulata* Peters
- КНД 211.1.4.058-97 Методика визначення гострої токсичності води на водоростях *Scenedesmus quadricauda* (Turp) Breb
- КНД 211.1.4.059-97 Методика визначення токсичності води на інфузоріях *Tetrahymena pyriformis* (Ehrenberg) Schewiakoff
- КНД 211.1.4.060-97 Методика визначення токсичності води на бактеріях *Photobacterium phosphoreum* (Cohn) Ford
- [Методические указания по разработке нормативов предельно допустимых сбросов вредных веществ в поверхностные водные объекты](#) (Уточненная редакция). Утв. Министром природных ресурсов Российской Федерации от 30.09.99
- Методические указания по разработке нормативов предельно допустимых вредных воздействий на водные объекты. Утв. Первым заместителем Министра природных ресурсов Российской Федерации и Первым заместителем Председателя Государственного Комитета Российской Федерации по охране окружающей среды от 26.02.99

### 3. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

3.1. Руководство устанавливает процедуры проведения методик биотестирования с использованием лабораторных культур гидробионтов - представителей основных трофических звеньев водной экосистемы: бактерий, простейших, водорослей, ракообразных и рыб.

3.2. Методики биотестирования предназначены для определения острой (в краткосрочных экспериментах) и хронической (в долгосрочных экспериментах) токсичности сточных и природных (пресных и морских) вод, донных отложений, загрязняющих химических веществ (смеси химических веществ) и буровых растворов. Выбор методики для определения токсичности того или иного объекта тестирования следует производить с учетом поставленной задачи в области охраны и использования водных объектов.

3.3. Способы обработки и оценки результатов биотестирования основаны на стандартных и широко используемых в отечественной и международной практике методах статистической обработки экспериментальных данных.

3.4. Помимо методик биотестирования, представленных в настоящем Руководстве, допускается использование других методик, разработанных и утвержденных в установленном порядке.

3.5. Настоящий документ разработан в дополнение и развитие РД 118-02-90 Методическое руководство по биотестированию воды. Утв. Госкомприроды СССР от 06.08.90 г. № 37.

### 4. ОТБОР, ХРАНЕНИЕ, ПОДГОТОВКА ПРОБ, ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ ВЕЩЕСТВ, РАЗБАВЛЕНИЙ ПРОБ ВОДЫ, ВОДНЫХ ВЫТЯЖЕК ИЗ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ И БУРОВЫХ РАСТВОРОВ

4.1. Пробы поверхностных вод отбирают согласно [ГОСТ 17.1.5.05](#), сточных - по НВН 33-5.3.01. Пробы подземных вод отбирают в соответствии с инструкциями или рекомендациями по проведению наблюдений за режимом подземных вод по ведомственной сети скважин.

Пробы отработанного бурового раствора отбирают из-под вибрационного сита. Пробы донных отложений отбирают дночерпателями (модели Петерсена, Экмана, Берджа или др).

4.2. Пробы, отобранные для биотестирования, не подлежат консервированию химическими веществами или замораживанию.

4.3. Пробы воды отбирают в количестве, указанном в соответствующих методиках биотестирования. Для отбора и хранения проб используют стеклянную посуду, которую заполняют под пробку и плотно закрывают.

4.4. Пробы донных отложений отбирают в количестве, которое обеспечивает приготовление из них водных вытяжек в объемах, указанных в соответствующих методиках.

4.5. Биотестирование проб воды (водных вытяжек) проводят не позднее 6 ч после отбора (приготовления водной вытяжки), а при отсутствии такой возможности допускается биотестирование проб воды (водные вытяжки), которые хранились в темноте в доверху наполненной плотно закрытой посуде при температуре  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$  не более 72 ч.

4.6. Перед биотестированием пробы воды (водные вытяжки) перемешивают и фильтруют через фильтровальную бумагу по [ГОСТ 12026](#). Если того требует цель биотестирования, пробы воды (водные вытяжки) не фильтруют.

4.7. Для приготовления водной вытяжки пробу донных отложений высушивают до воздушно сухого состояния при температуре  $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ , удаляют остатки растений, камешки и т.д., измельчают в ступке и просеивают через сито с диаметром отверстий 1 мм. Затем взвешивают необходимое количество донных отложений и заливают водой по [ГОСТ 6709](#) в соотношении 1:4. Смесь встряхивают в течение 1 часа с помощью встряхивателя. Затем смесь переносят в центрифужный стакан и центрифугируют в течение 15 мин при 3000 об/мин. После чего надосадочную жидкость сливают и используют для биотестирования.

4.8. Пробы отработанных буровых растворов отбирают из-под фильтрационного сита в количестве, которое обеспечивает приготовление взвешенной твердой фазы (ВТФ) бурового раствора для биотестирования (п. 4.7).

Пробы отбирают в чистые полиэтиленовые емкости таким образом, чтобы под крышкой оставался слой воздуха толщиной 2 см. После чего пробы направляют в лабораторию в емкостях-холодильниках с использованием «мокрого» льда (сухой лед для этих целей не используется). Температура хранения проб должна быть в пределах  $0-4^{\circ}\text{C}$ . Срок хранения проб в емкостях-холодильниках при соблюдении соответствующих условий хранения возможен до трех месяцев, после вскрытия емкостей для подготовки их к испытаниям срок хранения не должен превышать двух недель.

Нефильтрованную ВТФ испытывают на ракообразных и рыбах, фильтрованную - на водорослях.

4.9. Перед биотестированием буровых растворов их тщательно перемешивают в смесителе со скоростью вращения 1000 об/мин. Проба не пригодна для биотестирования, если рН пробы бурового раствора ниже 9, если на стенках сосуда с пробой появились черные пятна или если образец бурового раствора имеет неприятный запах. Затем пробу бурового раствора смешивают с отфильтрованной морской водой (или искусственной морской водой) в соотношении 1:9. Перемешивают при помощи магнитной мешалки в течение 5 мин. Полученную суспензию отстаивают в течение 1 ч до образования твердой фазы на дне сосуда. Раствор с ВТФ переливают в один прием в другую посуду для проведения испытаний, вторично перемешивают в течение 5 мин. В некоторых случаях отстоявшийся образец не имеет четкого фазового раздела, в таком случае весь объем пробы (ВТФ) используют для биотестирования. Последующее консервирование или хранение подготовленных образцов не допускается.

Слитый для биотестирования раствор суспензии бурового раствора принимают за 100-процентную концентрацию ВТФ, которую используют при разбавлении ее морской природной или искусственной водой для приготовления соответствующих концентраций суспензии.

4.10. Для биотестирования химического вещества (далее - вещества) или смеси химических веществ (далее - смеси веществ) готовят исходный раствор, используя воду по [ГОСТ 6709](#). Далее из исходного раствора готовят серию растворов с разными концентрациями вещества (смеси веществ), используя питьевую воду по [ГОСТ 2874](#) (питьевую воду предварительно



дехлорируют путем отстаивания).

4.11. Для определения среднего летального (эффективного) разбавления пробы воды (водной вытяжки), бурового раствора - ЛР<sub>50</sub> (ЭР<sub>50</sub>) или средней летальной (эффективной) концентрации вещества (смеси веществ) - ЛК<sub>50</sub> (ЭК<sub>50</sub>) готовят серию (не менее пяти) разбавлений пробы воды, бурового раствора или серию (не менее пяти) растворов с разными концентрациями исследуемого вещества (смеси веществ).

## 5. УСЛОВИЯ БЕЗОПАСНОГО ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТ

При работе с химическими веществами и сточными водами необходимо соблюдать требования безопасности по [ГОСТ 12.4.021](#).

Организация обучения работающих безопасности труда по [ГОСТ 12.0.004](#).

Безопасность при работе с электроустановками обеспечивается по [ГОСТ 12.1.019](#) и в соответствии с требованиями инструкций к оборудованию.

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по [ГОСТ 12.1.004](#) и иметь средства пожаротушения по [ГОСТ 12.4.009](#).

## 6. ТРЕБОВАНИЯ К КВАЛИФИКАЦИИ ЛИЦ, ПРОВОДЯЩИХ БИОТЕСТИРОВАНИЕ

К выполнению биотестирования и обработке результатов биотестирования допускаются лица, освоившие методические приемы водной токсикологии, с квалификацией "техник", "лаборант".

## 7. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО СНИЖЕНИЮ УРОВНЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ БАКТЕРИЙ PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM (COHN) FORD

### 7.1. Назначение и область применения

7.1.1. Настоящая «Методика...» устанавливает процедуру определения токсичности сточных, поверхностных, подземных и морских вод, донных отложений (водных вытяжек), водных растворов отдельных веществ и их смесей.

### 7.2. Принцип методики

7.2.1. Методика основана на установлении различия между уровнем люминесценции бактерий, помещенных в анализируемую пробу (опыт), и уровнем люминесценции бактерий, помещенных в 3%-ный раствор натрия хлористого для биотестирования пресных вод или в морскую воду без токсических веществ (природную или искусственную) для биотестирования морских вод (контроль).

7.2.2. Критерием токсичности является снижение уровня люминесценции бактерий на 50% и более в опыте по сравнению с контролем в течение 30 мин.

7.2.3. Люминесценцию бактерий измеряют при помощи специального прибора - биолюминометра и выражают в условных единицах.

### 7.3. Характеристики погрешности измерений

Границы, в которых находится относительная погрешность определения токсичности по данной методике с заданной доверительной вероятностью  $P=0,95$ , составляют  $\pm 40\%$ .

Наибольшее возможное значение среднего квадратического отклонения случайной составляющей относительной погрешности определения токсичности по данной методике  $\sigma$  ( $\delta$ ) составляет 20%.

Характеристики погрешности установлены по результатам внутрिलाбораторного эксперимента с использованием эталонного вещества - калия двуххромовокислого ( $K_2Cr_2O_7$ ).

Алгоритм установления характеристик погрешности методики приведен в [приложении Б](#).

### 7.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

Применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы:

- биолюминометр типа 8703 М по ТУ 2-858-003 или другого с набором кювет;

- холодильник, обеспечивающий температуру от минус 15 до плюс 6 °С;
- дозаторы пипеточные вместимостью 20-1000 мм<sup>3</sup> по ТУ 64-1-3329;
- термометр по [ГОСТ 112](#) с ценой деления шкалы 1°С;
- колбы мерные вместимостью 0,5 и 1,0 дм<sup>3</sup> по [ГОСТ 1770](#), 2-го класса точности;
- цилиндры мерные вместимостью 10 см<sup>3</sup> по [ГОСТ 1770](#), 2-го класса точности;
- бумагу фильтровальную по [ГОСТ 12026](#);
- воду дистиллированную по [ГОСТ 6709](#);
- калий двуххромовокислый по [ГОСТ 4220](#);
- калий хлористый по [ГОСТ 4234](#);
- кальций хлористый по ТУ 6-09-4711;
- кислоту борную по [ГОСТ 9656](#);
- магний хлористый 6-водный по [ГОСТ 4209](#);
- натрий углекислый по [ГОСТ 4201](#);
- натрий сернокислый по [ГОСТ 4166](#);
- натрий хлористый по [ГОСТ 4233](#).

### 7.5. Условия выполнения биотестирования

7.5.1. Биотестирование проводят в помещении без вредных испарений и газов при температуре 20±4°С.

7.5.2. Объем пробы воды (водной вытяжки) для определения токсичности должен быть не менее 100 см<sup>3</sup>.

7.5.3. Для обеспечения оптимальных условий свечения бактерий в анализируемую пробу воды (водную вытяжку из донных отложений, в т.ч. морских) вносят навеску натрия хлористого в таком количестве, чтобы его концентрация в растворе составила 3 %.

7.5.4. Для контроля и приготовления разбавлений проб воды (водной вытяжки) используют 3 %-ный раствор натрия хлористого в дистиллированной воде.

7.5.5. При биотестировании проб морской воды навеску натрия хлористого не вносят, а для контроля и разбавлений проб используют природную морскую воду без токсических веществ, либо искусственную морскую воду. Искусственную морскую воду готовят на дистиллированной воде, в которую вносят реактивы, представленные в таблице 7.1. Искусственную морскую воду можно также приготовить из профессиональной морской соли Wiegandt (производство Германия).

Таблица 7.1

#### *Состав (согласно ИСО 10253) искусственной морской воды, соленость 34‰, рН 8,0*

<i>Реактив</i>	<i>Концентрация, г/дм<sup>3</sup></i>	<i>Реактив</i>	<i>Концентрация, г/дм<sup>3</sup></i>
NaCl	22,000	KCl	0,650
MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	9,700	NaHCO <sub>3</sub>	0,200
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (безводный)	3,700	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,023
CaCl <sub>2</sub> (безводный)	1,000		

7.5.6. Для приготовления исходного раствора вещества (смеси веществ) и его разбавлений используют 3 %-ный раствор натрия хлористого.

7.5.7. Для приготовления растворов смеси веществ, отдельно для каждого вещества готовят исходные растворы, определенные объемы которых добавляют в 3 %-ный раствор натрия хлористого.

7.5.8. Результаты биотестирования учитывают, если ЭК<sub>50</sub> калия двуххромовокислого (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) для культуры бактерий находилась в интервале его концентраций 0,5-1,2 мг/дм<sup>3</sup>.

### 7.6. Подготовка к выполнению биотестирования

7.6.1. Для биотестирования используют лиофилизированную культуру светящихся

бактерий - *Photobacterium phosphoreum* (Cohn) Ford, которая поставляется в комплекте с биолюминометром. При хранении в морозильной камере холодильника в запаянных ампулах при температуре минус 15°C культура пригодна для биотестирования в течение года.

7.6.2. Каждую новую партию культуры, а также непосредственно перед биотестированием культуру проверяют на пригодность к биотестированию путем определения средней эффективной концентрации ( $ЭК_{50}$ ) раствора эталонного вещества калия двуххромовокислого ( $K_2Cr_2O_7$ ). Для этого готовят исходный раствор с концентрацией 1,0 г  $K_2Cr_2O_7$  на 1 дм<sup>3</sup> 3%-ного раствора натрия хлористого в дистиллированной воде. Далее, разбавляя исходный раствор 3 %-ным раствором натрия хлористого, готовят серию растворов с концентрациями  $K_2Cr_2O_7$  от 0,1 до 2,0 мг/дм<sup>3</sup>. Биотестирование этих растворов проводят в течение 30 мин в соответствии с процедурой, приведенной в п. 7.7. На основании полученных результатов рассчитывают  $ЭК_{50}$   $K_2Cr_2O_7$  в соответствии с [приложением В](#).

Если  $ЭК_{50}$  находится в экспериментально установленном диапазоне реагирования тест-объекта, который равен 0,5-1,2 мг/дм<sup>3</sup>  $K_2Cr_2O_7$ , культура бактерий пригодна для биотестирования.

Если  $ЭК_{50}$  не находится в указанном диапазоне реагирования, необходимо использовать другую партию культуры, проверив ее пригодность для биотестирования описанным выше способом.

7.6.3. До начала биотестирования флакон с охлажденной лиофилизированной культурой бактерий выдерживают в течение 30-40 мин при температуре (20±4)°C.

7.6.4. Во флакон с культурой, объем которого составляет 10 см<sup>3</sup>, наливают 2 см<sup>3</sup> 1,5%-ного раствора натрия хлористого и содержимое флакона тщательно перемешивают. Этого объема полученной суспензии бактерий достаточно для 100 измерений.

7.6.5. Суспензию бактерий выдерживают при температуре (20±4)°C в течение 45 мин с целью ее реактивации и стабилизации люминесценции бактерий.

7.6.6. Для сохранения активности суспензию бактерий помещают в ледяную баню.

## 7.7. Выполнение биотестирования

При биотестировании выполняют следующие операции:

- в три контрольные кюветы наливают по 1 см<sup>3</sup> 3%-ного раствора натрия хлористого (морской воды природной или синтетической);
- в три другие кюветы (опыт) наливают по 1 см<sup>3</sup> анализируемой пробы воды (водной вытяжки) или раствора вещества (смеси веществ);
- в каждую кювету прибавляют по 20 мм<sup>3</sup> суспензии бактерий;
- содержимое кювет тщательно перемешивают;
- кюветы помещают в биолюминометр и через 30 мин измеряют уровень люминесценции суспензии бактерий в условных единицах.

## 7.8. Обработка и оценка результатов

7.8.1. На основании результатов трех параллельных определений люминесценции бактерий в контроле и опыте находят среднее арифметическое уровней люминесценции бактерий в контроле ( $\bar{X}_к$ ) и в опыте ( $\bar{X}_{on}$ ).

$$\bar{X}_к = \frac{\sum_{i=1}^I X_{ki}}{I} \cdot 100, \quad (7.1)$$

$$\bar{X}_{on} = \frac{\sum_{i=1}^I X_{oni}}{I} \cdot 100, \quad (7.2)$$

где  $\bar{X}_k$ ,  $\bar{X}_{on}$  - результат  $i$ -го измерения уровня люминесценции бактерий в контроле и опыте соответственно;

$i$  - номер измерения уровня люминесценции бактерий в контроле (опыте);  $i = 1, \dots, l$ ;

$l$  - количество параллельных измерений уровня люминесценции бактерий в контроле (опыте);  $l = 3$ .

Снижение уровня люминесценции бактерий в опыте по сравнению с контролем ( $P$ ) рассчитывают в процентах по формуле

$$P = \frac{\bar{X}_k - \bar{X}_{on}}{\bar{X}_k} \cdot 100. \quad (7.3)$$

7.8.2. Вывод о наличии или отсутствии токсичности анализируемой пробы воды (водной вытяжки) или раствора вещества (смеси веществ) делают на основании величины  $P$ . Проба воды (водной вытяжки) или раствора вещества (смеси веществ) считается токсичной, если величина  $P$  составляет 50% и более. В этом случае для количественной оценки токсичности пробы воды (водной вытяжки) устанавливают ее среднее эффективное разбавление - ЭР<sub>50</sub>.

7.8.3. Для количественной оценки токсичности вещества (смеси веществ) устанавливают среднюю эффективную концентрацию - ЭК<sub>50</sub> ([приложение В](#)).

## 7.9. Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности

Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности проводят в объеме 5% от количества текущих измерений.

Контроль воспроизводимости проводят по результатам двух определений токсичности анализируемых проб воды (водной вытяжки), растворов вещества (смеси веществ), полученных в условиях воспроизводимости (ЭР<sub>1</sub> и ЭР<sub>2</sub> или ЭК<sub>1</sub> и ЭК<sub>2</sub>).

Решение об удовлетворительности воспроизводимости определений принимается при условии:

$$\frac{2|\text{ЭР}_1 - \text{ЭР}_2|}{\text{ЭР}_1 + \text{ЭР}_2} \cdot 100\% \leq D,$$

где  $D$  - норматив оперативного контроля воспроизводимости составляет 56%.

## 8. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО СНИЖЕНИЮ ПРИРОСТА КОЛИЧЕСТВА ИНФУЗОРИЙ TETRAHYMENA PYRIFORMIS (EHRENBERG) SCHEWIAKOFF

### 8.1. Назначение и область применения

Настоящая «Методика...» устанавливает процедуру определения токсичности сточных, поверхностных и подземных вод, донных отложений (водных вытяжек), водных растворов отдельных веществ и их смесей.

### 8.2. Принцип методики

8.2.1. Методика определения токсичности основана на установлении различия между количеством инфузорий в анализируемой пробе (опыт) и количеством инфузорий в 0,1 % растворе натрия хлористого (контроль).

8.2.2. Критерием токсичности является достоверное снижение коэффициента прироста инфузорий в опыте по сравнению с контролем за 24 ч (условно «острая токсичность») и 96 ч (условно «хроническая токсичность») биотестирования.

### 8.3. Характеристики погрешности измерений

Границы, в которых находится относительная погрешность определения токсичности по данной методике с заданной доверительной вероятностью  $P=0,95$ , составляют  $\pm 60\%$ .

Наибольшее возможное значение среднего квадратического отклонения случайной составляющей относительной погрешности определения токсичности по данной методике  $\sigma$

(δ) составляет 30%.

Характеристики погрешности установлены по результатам внутрилабораторного эксперимента с использованием эталонного вещества - калия двуххромовокислого ( $K_2Cr_2O_7$ ).

Алгоритм установления характеристик погрешности методики приведен в [приложении Б](#).

#### 8.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

Применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы:

- весы лабораторные по [ГОСТ 24104](#), 2-го класса точности с наибольшей предельной нагрузкой 200 г;
- микроскоп, который обеспечивает увеличение в 100 раз;
- стерилизатор воздушный медицинский по [ГОСТ 22649](#);
- термометр по [ГОСТ 112](#) с ценой деления шкалы  $1^\circ C$ ;
- термостат, обеспечивающий температуру  $(27 \pm 1)^\circ C$ ;
- центрифугу, обеспечивающую 3000 об/мин;
- шкаф сушильный, обеспечивающий температуру  $(160 \pm 5)^\circ C$  в течение 2 ч;
- камеру Горяева или другую счетную камеру для подсчета инфузорий;
- колбы плоскодонные вместимостью 50 см<sup>3</sup> по [ГОСТ 25336](#);
- колбы мерные вместимостью 0,5 и 1,0 дм<sup>3</sup> по [ГОСТ 1770](#), 2-го класса точности;
- пробирки вместимостью 10-15 см<sup>3</sup>;
- пипетки мерные вместимостью 0,1; 1,0 и 5,0 см<sup>3</sup> по [ГОСТ 29227](#), 2-го класса точности;
- посуду для транспортирования и хранения проб воды вместимостью 100 см<sup>3</sup>;
- пипетки капиллярные вместимостью 0,1 см<sup>3</sup> с делениями 0,01 см<sup>3</sup> по [ГОСТ 29227](#);
- цилиндры мерные вместимостью 0,1, 0,5 и 1,0 дм<sup>3</sup> по [ГОСТ 1770](#), 2-го класса точности;
- штативы для пробирок;
- бумагу фильтровальную по [ГОСТ 12026](#);
- вату для изготовления ватно-марлевых пробок;
- марлю для изготовления ватно-марлевых пробок;
- воду дистиллированную по [ГОСТ 6709](#);
- воду питьевую по [ГОСТ 2874](#);
- глюкозу по [ГОСТ 6038](#);
- йод по [ГОСТ 4159](#), 5% спиртовой раствор;
- калий двуххромовокислый по [ГОСТ 4220](#);
- натрий хлористый по [ГОСТ 4233](#);
- пептон бактериальный по [ГОСТ 13805](#);
- дрожжи хлебопекарные по [ГОСТ 171](#).

#### 8.5. Условия выполнения биотестирования

8.5.1. Биотестирование проводят в помещении без вредных испарений и газов при температуре воздуха  $(27 \pm 1)^\circ C$ .

8.5.2. Объем пробы воды (водной вытяжки) для определения токсичности должен быть не менее 100 см<sup>3</sup>.

8.5.3. Для контроля и приготовления разбавлений проб воды (водной вытяжки) используют 0,1% раствор натрия хлористого в дистиллированной воде.

8.5.4. Результаты биотестирования учитывают, если ЭК<sub>50</sub> за 24 ч калия двуххромовокислого ( $K_2Cr_2O_7$ ) для культуры инфузорий находилась в диапазоне его концентраций 0,1 - 0,5 мг/дм<sup>3</sup>.

#### 8.6. Подготовка к выполнению биотестирования

8.6.1. Для биотестирования используют лабораторную культуру инфузорий *Tetrahymena pyriformis* (Ehrenberg) Schewiakoff.

Культивируют инфузорий в стерильных условиях в пробирках в термостате.

Тщательно вымытые и высушенные пробирки предварительно стерилизуют сухим жаром в

сушильном шкафу при температуре  $(160 \pm 5)^\circ\text{C}$  в течение 2 ч с момента достижения указанной температуры. Перед стерилизацией пробирки закрывают ватно-марлевыми пробками и заворачивают в бумагу. Пипетки для посева инфузорий стерилизуют так же, предварительно завернув в бумагу.

Инфузорий культивируют на питательной среде следующего состава (табл. 8.1).

Таблица 8.1

**Состав питательной среды для культивирования инфузорий**

<i>Вещество</i>	<i>Концентрация, г/дм<sup>3</sup> дистиллированной воды</i>	<i>Вещество</i>	<i>Концентрация, г/дм<sup>3</sup> дистиллированной воды</i>
Глюкоза	5,0	Натрий хлористый	1,0
Пептон бактериальный	20,0	Дрожжевой экстракт	1,0 см <sup>3</sup> /дм <sup>3</sup>

Питательную среду готовят следующим образом. Пептон растворяют в 200 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и фильтруют через фильтровальную бумагу или вату. Глюкозу и натрий хлористый растворяют отдельно в 50 см<sup>3</sup> и фильтруют через фильтровальную бумагу. Для приготовления дрожжевого экстракта в 1 дм<sup>3</sup> кипящей дистиллированной воды вносят 25 г дрожжей и кипятят 5 мин. Раствор центрифугируют 30 мин при 3000 об/мин и надосадочную жидкость фильтруют через фильтр («синяя лента»).

Полученные растворы пептона и глюкозы смешивают и добавляют дрожжевой экстракт. Общий объем среды доводят дистиллированной водой до 1,0 дм<sup>3</sup>. После перемешивания измеряют рН среды и доводят ее до рН 7,1 добавлением 2 н натрия гидроокиси (NaOH). Среду разливают в пробирки по 5 см<sup>3</sup>, закрывают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют при 1 атм 30 мин.

Культуру инфузорий вносят в стерильные пробирки с питательной средой в количестве 0,04 см<sup>3</sup> и помещают в термостат при температуре  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Каждые 7-10 дней культуру инфузорий пересевают на свежую питательную среду.

Для длительного хранения культуры инфузорий ее выращивают на питательной среде следующего состава: глюкоза - 5 г, вода питьевая - 100 см<sup>3</sup>, рН среды 7,1. Среду разливают по 20 см<sup>3</sup> в колбы вместимостью 50 см<sup>3</sup> и стерилизуют, как указано выше. В остывшую среду вносят по 0,5 см<sup>3</sup> трехсуточной культуры тетрахимены. Колбы помещают в затемненное место при температуре  $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ . При этих условиях культура инфузорий сохраняется в течение двух месяцев, после чего ее необходимо пересеять на свежую питательную среду.

8.6.2 Для биотестирования используют 3-суточную культуру инфузорий, выращенную на питательной среде, состав которой указан в таблице 8.1. Плотность суспензии клеток в культуре должна составлять  $(6-8 \cdot 10^4)$  кл/см<sup>3</sup>.

8.6.3 Периодически в процессе культивирования (не реже одного раза в месяц), определяют пригодность культуры инфузорий для биотестирования. Для этого устанавливают среднюю эффективную концентрацию ( $\text{ЭК}_{50}$ ) раствора эталонного вещества  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  за 24 ч биотестирования. Готовят исходный раствор с концентрацией 1,0 г  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  в 1 дм<sup>3</sup> 0,1 %-ого раствора натрия хлористого. Далее, разбавляя исходный раствор 0,1%-ным раствором натрия хлористого, готовят серию растворов с концентрациями  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  от 0,1 до 1,0 мг/дм<sup>3</sup>. Биотестирование этих растворов проводят в течение 24 ч в соответствии с процедурой, приведенной в 8.7. На основании полученных результатов определяют  $\text{ЭК}_{50}$  за 24ч  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  в соответствии с [приложением В](#).

Если  $\text{ЭК}_{50}$  за 24 ч находится в экспериментально установленном диапазоне реагирования тест-объекта, который составляет 0,1-0,5 мг/дм<sup>3</sup>  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , культура инфузорий пригодна для

биотестирования. Если ЭК<sub>50</sub> за 24 ч не находится в указанном диапазоне реагирования, необходимо проверить условия культивирования тест-объекта, чистоту культуры и, при необходимости, заменить ее на новую.

### 8.7. Выполнение биотестирования

При биотестировании выполняют следующие операции.

8.7.1. В три пробирки вместимостью 10-15 см<sup>3</sup> наливают по 5 см<sup>3</sup> пробы воды (водной вытяжки) или раствора вещества (смеси веществ) - опыт. Другие три пробирки заполняют таким же объемом 0,1% раствора натрия хлористого - контроль.

8.7.2. В каждую из опытных и контрольных пробирок капиллярной пипеткой добавляют 0,04 см<sup>3</sup> (2 капли) 3-х суточной культуры инфузорий и определяют исходное количество клеток в контроле и опыте.

Подсчет инфузорий проводят под микроскопом в камере Горяева. Можно использовать гемоцитометр или любой другой прибор для подсчета частиц. Подсчет инфузорий в камере Горяева выполняют в следующей последовательности. Содержимое пробирки тщательно перемешивают, продувая воздух через пипетку. Этой же пипеткой отбирают суспензию инфузорий из пробирки, наносят по одной капле на сетки в счетной камере и фиксируют клетки 5%-м спиртовым раствором йода. Для этого конец стеклянной палочки смачивают раствором йода и затем касаются им капле суспензии на сетках камеры. Затем камеру накрывают покровным стеклом, которое притирают по бокам до появления колец интерференции. Через 1-2 мин начинают подсчет инфузорий в пяти больших (или восьмидесяти малых квадратах), расположенных по диагонали сетки счетной камеры. Из каждой контрольной и опытной пробирки подсчитывают не менее трех капель.

8.7.3. После определения исходного количества инфузорий пробирки помещают в термостат при температуре (27±1)°С.

8.7.4. Биотестирование может длиться 24 или 96 ч. В конце биотестирования подсчитывают количество инфузорий в контроле и опыте, как это описано в 8.7.2.

### 8.8. Обработка и оценка результатов

8.8.1. На основании результатов подсчета клеток в каждой капле определяют количество инфузорий (кл/см<sup>3</sup>) в контроле и опыте по формуле

$$X_{к(он)ij} = \frac{m_{к(он)ij}}{nV} \cdot 1000, \quad (8.1)$$

где  $m_{к(он)ij}$  - количество подсчитанных инфузорий в камере в контроле (опыте) для  $i$ -той капли и  $j$ -го параллельного определения;

$i$  - номер капли суспензии;

$j$  - номер параллельного определения;

$V$  - объем части камеры, имеющей площадь маленького квадрата;

$n$  - количество подсчитанных квадратов.

Для каждого параллельного определения в опыте и контроле вычисляют среднее арифметическое количества инфузорий в 1 см<sup>3</sup> по формуле

$$\bar{X}_{к(он)j} = \frac{\sum_{i=1}^I X_{к(он)ij}}{I}, \quad (8.2)$$

где  $I$  - количество капель суспензии.

8.8.2. Для определения токсичности пробы воды (водной вытяжки) или раствора вещества (смеси веществ) рассчитывают для каждого параллельного определения коэффициент прироста инфузорий в контроле и опыте по формуле

$$K_{\kappa(on)j} = \frac{\bar{X}_{\kappa(on)j}(t)}{\bar{X}_{\kappa(on)j}(o)}, \quad (8.3)$$

где  $\bar{X}_{\kappa(on)j}(t)$  - количество инфузорий в  $j$ -ом параллельном определении в контроле (опыте) через промежуток времени  $t$ , кл/см<sup>3</sup>;

$\bar{X}_{\kappa(on)j}(o)$  - исходное количество инфузорий в  $j$ -ом параллельном определении в контроле (опыте), кл/см<sup>3</sup>.

8.8.3 Вывод о наличии или отсутствии токсичности пробы воды (водной вытяжки) или раствора вещества (смеси веществ) делают на основании установления достоверности снижения коэффициента прироста инфузорий в опыте по сравнению с контролем.

Для этого рассчитывают среднее арифметическое коэффициентов прироста инфузорий в опыте и контроле, среднее квадратическое отклонение коэффициентов прироста, ошибку среднего арифметического, критерий достоверности.

Среднее арифметическое коэффициентов прироста инфузорий определяют по формуле

$$\bar{K}_{\kappa(on)} = \frac{\sum_{i=1}^J K_{\kappa(on)j}}{J}, \quad (8.4)$$

где  $J$  - количество параллельных определений,  $J = 3$ .

Среднее квадратическое отклонение коэффициентов прироста инфузорий в контроле (опыте) определяют по формуле

$$S_{k(on)} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^J (K_{\kappa(on)j} - \bar{K}_{\kappa(on)})^2}{J-1}}. \quad (8.5)$$

Ошибку среднего арифметического коэффициентов прироста инфузорий в контроле (опыте) определяют по формуле

$$\bar{S}_{\kappa(on)} = \frac{S_{\kappa(on)}}{\sqrt{J}}. \quad (8.6)$$

Критерий достоверности ( $t_d$ ) различия между коэффициентами прироста инфузорий в опыте и контроле определяют по формуле

$$t = \frac{\bar{K}_{(on)} - \bar{K}_k}{\sqrt{S_{(on)}^2 + S_k^2}}. \quad (8.7)$$

Рассчитанную величину  $t$  сравнивают со значением критерия Стьюдента ( $t_{st}$ ) для уровня значимости 5% и степени свободы  $f = 2(J - 1) = 4$ , ( $t_{f=4} = 2,78$ ). Если рассчитанная величина  $t$  больше значения критерия Стьюдента или равна ему, то различие между коэффициентами прироста в опыте и контроле достоверно. В этом случае считают, что анализируемая проба воды (водная вытяжка) или раствор вещества (смеси веществ) токсична (токсичен).

8.8.4. Для количественной оценки токсичности пробы воды (водной вытяжки) устанавливают ее эффективное разбавление (ЭР), т.е. максимальное разбавление, при котором наблюдается достоверное различие между коэффициентами прироста инфузорий в контроле и опыте за 24 или 96 ч биотестирования (ЭР за 24 ч или ЭР за 96 ч).

8.8.5. Для количественной оценки токсичности вещества (смеси веществ) устанавливают эффективную концентрацию (ЭК) вещества (смеси веществ), т.е. минимальную концентрацию, при которой наблюдается достоверное различие коэффициентов прироста



количества инфузорий в контроле и опыте за 24 или 96 ч биотестирования (ЭК за 24 ч или ЭК за 96 ч).

### 8.9. Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности

Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности проводят в объеме 5% от количества текущих измерений.

Контроль воспроизводимости проводят по результатам двух определений токсичности пробы воды (водной вытяжки), вещества (смеси веществ), полученных в условиях воспроизводимости ( $\mathcal{E}P_1$ ,  $\mathcal{E}P_2$  или  $\mathcal{E}K_1$ ,  $\mathcal{E}K_2$ ).

Решение об удовлетворительности воспроизводимости определений принимается при условии:

$$\frac{2|\mathcal{E}P_1 - \mathcal{E}P_2|}{\mathcal{E}P_1 + \mathcal{E}P_2} \cdot 100\% \leq D,$$

где  $D$  - норматив оперативного контроля воспроизводимости составляет 83%.

## 9. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО УГНЕТЕНИЮ РОСТА ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ПРЕСНОВОДНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ SCENEDESMUS QUADRICAUDA (TURP) BREV

### 9.1. Назначение и область применения

Настоящая «Методика...» устанавливает процедуру определения острой и хронической токсичности сточных, поверхностных и подземных вод, донных отложений (водных вытяжек), буровых растворов, водных растворов отдельных веществ и их смесей.

### 9.2. Принцип методики

9.2.1. Методика основана на установлении различия между интенсивностью роста водорослей в анализируемой пробе (опыт) и культуральной среде (контроль).

9.2.2. Критерием токсического действия является снижение на 50% и более численности клеток водорослей в опыте по сравнению с контролем за 72 ч биотестирования (условно "острая токсичность") и 7 суток (условно "хроническая токсичность").

### 9.3. Характеристики погрешности измерений

Границы, в которых находится относительная погрешность определения токсичности по данной методике с заданной доверительной вероятностью  $P=0,95$ , составляют  $\pm 34\%$ .

Наибольшее возможное значение среднего квадратического отклонения случайной составляющей относительной погрешности определения токсичности по данной методике  $\sigma$  ( $\delta$ ) составляет 17%.

Характеристики погрешности установлены по результатам внутрилабораторного эксперимента с использованием эталонного вещества - калия двуххромовокислого ( $K_2Cr_2O_7$ ).

Алгоритм установления характеристик погрешности методики приведен в [приложении Б](#).

### 9.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

Применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы:

- люминолат с освещением рабочей зоны 2000-3000 лк от ламп дневного света;
- термометр лабораторный по ГОСТ 215, цена деления шкалы 0,1°C;
- микроскоп с кратностью увеличения не менее 400 раз;
- колориметр фотоэлектрический (ФЭК-56 либо КФК-3) или спектрофотометр, или прибор для измерения быстрой или замедленной флуоресценции;
- покровные стекла по [ГОСТ 6672](#);
- предметные стекла по [ГОСТ 9284](#);
- камеру счетную Горяева по ТУ 42-816 или Нажотта по ТУ 64-1-816;
- посуду стеклянную для отбора и хранения проб воды вместимостью 1 дм<sup>3</sup>;

- колбы плоскодонные конические вместимостью 250 см<sup>3</sup> по [ГОСТ 25336](#);
- колбы мерные вместимостью 0,5 и 1,0 дм<sup>3</sup> по [ГОСТ 1770](#), 2-го класса точности;
- пипетки мерные вместимостью от 1 до 10 см<sup>3</sup> по [ГОСТ 29227](#), 2-го класса точности;
- дозаторы пипеточные вместимостью 0,1 и 0,5 см<sup>3</sup> по ТУ 64-1-3326;
- цилиндры мерные вместимостью 0,1; 0,5 и 1,0 дм<sup>3</sup> по [ГОСТ 1770](#), 2-го класса точности;
- вату для изготовления ватно-марлевых пробок;
- марлю для изготовления ватно-марлевых пробок;
- бумагу фильтровальную по [ГОСТ 12026](#);
- фильтры мембранные № 4;
- фильтровальный аппарат;
- воду дистиллированную по [ГОСТ 6709](#);
- воду питьевую по [ГОСТ 2874](#);
- рН-метр;
- прибор для измерения концентрации кислорода в воде;
- холодильник, который обеспечивает температуру от 2 до 8 °С;
- шкаф сушильный для стерилизации посуды;
- плитку электрическую по [ГОСТ 14919](#);
- баню водяную;
- спиртовку;
- весы лабораторные общего назначения по [ГОСТ 24104](#), 2-го класса точности с наибольшей массой взвешивания 200 г;
- железо хлорное по [ГОСТ 4147](#);
- калий азотнокислый по [ГОСТ 4217](#);
- калий двуххромовокислый по [ГОСТ 4220](#);
- калий фосфорнокислый двузамещенный по [ГОСТ 2493](#);
- магний сернокислый по [ГОСТ 4523](#).

## 9.5. Условия выполнения биотестирования

9.5.1. Биотестирование проводят в помещении без вредных испарений и газов, при температуре воздуха (20±2)°С, при освещении лампами дневного света с интенсивностью 2000-3000 лк, при естественной смене дня и ночи.

9.5.2. Объем пробы воды (водной вытяжки), бурового раствора, раствора вещества (смеси веществ) для определения токсичности должен быть не менее 1 дм<sup>3</sup>.

9.5.3. Численность клеток водорослей в исходной культуре, подготовленной для биотестирования, должна быть не менее 5 млн. кл/см<sup>3</sup>. Культура должна находиться в экспоненциальной фазе роста.

9.5.4. Начальная численность клеток водорослей в опыте и контроле перед началом биотестирования - не менее 30 тыс. кл/см<sup>3</sup>.

9.5.5. Рабочий объем пробы в контрольных и в опытных колбах составляет 50-100 см<sup>3</sup>.

9.5.6. Результаты учитывают, если численность водорослей в контроле увеличилась за 96 ч биотестирования не менее, чем в 3 раза; ЭК<sub>50</sub> за 48 ч калия двуххромовокислого (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) для культуры водорослей находилась в диапазоне его концентраций 1,3-2,5 мг/дм<sup>3</sup>

## 9.6. Подготовка к выполнению биотестирования

9.6.1. Для биотестирования используют лабораторную культуру одноклеточных зеленых протококковых водорослей *Scenedesmus quadricauda* (Turp) Breb.

9.6.2. Лабораторную культуру водорослей выращивают на среде Прата в конических плоскодонных колбах объемов 250-300 см<sup>3</sup> в люминостате с интенсивностью освещения не менее 2000-3000 лк при температуре (20±2)°С.

При культивировании и биотестировании водорослей используют химически чистую стеклянную посуду. Для этого посуду промывают смесью бихромата калия и серной кислоты (хромовой смесью), затем тщательно водопроводной водой и 3-4 раза дистиллированной

водой. Посуду, используемую для культивирования и биотестирования, за исключением мерной, стерилизуют в сушильном шкафу при 160°C в течение 1,5 ч. Не разрешается пользоваться для мытья посуды синтетическими поверхностно-активными веществами и органическими растворителями. Можно пользоваться пищевой содой.

Для приготовления питательной среды Прата (табл. 9.1) сначала готовят исходные растворы солей на дистиллированной воде: калия азотнокислого - 100,0 г/дм<sup>3</sup>; магния сернокислого - 10,0 г/дм<sup>3</sup>; калия фосфорнокислого двузамещенного - 10,0 г/дм<sup>3</sup>. Навеску железа хлорного 0,5 г растворяют в 0,5 дм<sup>3</sup> дистиллированной воды. Полученные исходные растворы солей хранят в холодильнике. В случае помутнения растворов их заменяют на свежие.

Чтобы получить питательную среду Прата для культивирования водорослей, соответствующие объемы исходных растворов (кроме железа хлорного) добавляют по 1 мл в 1 дм<sup>3</sup> дистиллированной воды в последовательности их расположения в таблице 9.1. Стерилизуют полученный раствор кипячением на водяной бане 15 мин, охлаждают и добавляют туда 1 мл хлорное железо из исходного раствора.

Таблица 9.1

### Состав питательной среды Прата

<i>Реактив</i>	<i>Концентрация, г/дм<sup>3</sup></i>
Калий азотнокислый (KNO <sub>3</sub> )	0,1
Магний сернокислый (Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0,01
Калий фосфорнокислый двузамещенный (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O)	0,01
Железо хлорное (FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	0,001

9.6.3. При культивировании периодически обновляют культуру водорослей, пересевая ее на свежую питательную среду не реже одного раза в 10 дней. Для этого в стерильную колбу объемом 250-300 см<sup>3</sup> со свежей средой Прата объемом 150 см<sup>3</sup> над пламенем спиртовки наливают 15-20 см<sup>3</sup> верхнего слоя исходной культуры (содержимое исходной культуры при этом не перемешивают). Начальная плотность клеток в новой колбе составляет примерно 100-150 тыс. кл/см<sup>3</sup>, что дает светло-зеленую окраску. В случае ослабления интенсивного роста клеток в культуре, к питательной среде добавляют витамин В<sub>12</sub>.

После посева колбу закрывают стерильной ватно-марлевой пробкой и бумажным колпачком, перемешивают и помещают в люминостат. В процессе культивирования культуру водорослей периодически перемешивают, встряхивая 1-2 раза в сутки.

9.6.4. При биотестировании используют 3-х суточную культуру водорослей, находящуюся в экспоненциальной фазе роста.

Для этого в стерильную колбу со средой Прата объемом 150 см<sup>3</sup> приливают из исходной культуры водорослей верхний слой клеток (около 15-20 см<sup>3</sup>) и колбу ставят в люминостат для подрачивания культуры водорослей.

Через 3-е суток подсчитывают численность клеток (которая должна составлять примерно 5 млн.кл/см<sup>3</sup>).

Далее расчетным путем устанавливают, какое количество культуры водорослей необходимо взять, чтобы получить в опытном и контрольном объеме среды Прата необходимую плотность клеток по 30 тыс. кл/см<sup>3</sup> (как правило это 0,5-1 см<sup>3</sup> культуры водорослей).

Для подсчета количества клеток водорослей используют счетную камеру Горяева (или другую). Подсчет проводят в соответствии с процедурой, описанной в 9.7.2.

Количество клеток водорослей в 1 см<sup>3</sup> в опыте и в контроле определяют (п. 9.8.1.) по формуле (9.1).

9.6.5. Периодически (не реже одного раза в месяц) культуру водорослей проверяют на пригодность для биотестирования. Для этого устанавливают среднюю эффективную концентрацию ( $ЭК_{50}$  за 48 ч) раствора эталонного вещества калия двуххромовокислого. Готовят исходный раствор  $K_2Cr_2O_7$  с концентрацией  $1 \text{ г/дм}^3$ , используя дистиллированную воду. Далее из исходного раствора готовят серию растворов с концентрациями  $K_2Cr_2O_7$  от 1,0 до  $3,0 \text{ мг/дм}^3$  с интервалом  $0,5 \text{ мг/дм}^3$ , используя среду Прата (опыт). Для контроля берут среду Прата без токсиканта. Затем в опытные и контрольные колбы добавляют водоросли в экспоненциальной фазе роста плотностью  $30 \text{ тыс.кл/см}^3$ . Биотестирование этих растворов проводят продолжительностью 48 ч в соответствии с процедурой, изложенной в 9.7.

На основании полученных результатов рассчитывают процент снижения численности клеток водорослей в протестированных растворах  $K_2Cr_2O_7$  по сравнению с контролем и определяют концентрацию  $K_2Cr_2O_7$ , которая вызывает снижение численности водорослей на 50% ( $ЭК_{50}$  за 48 ч). Вычисление результатов проводят в соответствии с [приложением В](#).

Если полученная величина  $ЭК_{50}$  за 48 ч находится в экспериментально установленном диапазоне реагирования тест-объекта, который равен  $1,3-2,5 \text{ мг/дм}^3 K_2Cr_2O_7$ , культура водорослей пригодна для биотестирования.

Если  $ЭК_{50}$  за 48 ч  $K_2Cr_2O_7$  не находится в указанном диапазоне реагирования, то проверяют условия культивирования тест-объекта, чтобы выяснить причины ухудшения состояния культуры. При необходимости культуру заменяют.

## 9.7. Выполнение биотестирования

При биотестировании выполняют следующие операции.

9.7.1. В конические колбы вместимостью  $250 \text{ см}^3$  разливают по  $100 \text{ см}^3$  среды Прата (контроль), в другие колбы - исследуемые пробы воды (водной вытяжки), бурового раствора (опыт). Заполнение опытных колб (в различных разбавлениях) проводят следующим образом: без разбавления -  $100 \text{ см}^3$  исследуемой пробы;  $50 \text{ см}^3$  исследуемой пробы и  $50 \text{ см}^3$  среды Прата (разбавление в 2 раза);  $10 \text{ см}^3$  пробы и  $90 \text{ см}^3$  среды (разбавление в 10 раз);  $1 \text{ см}^3$  пробы и  $99$  среды (разбавление в 100 раз);  $0,1 \text{ см}^3$  пробы и  $99,9$  среды (разбавление в 1000 раз).

Повторность в опыте и контроле трехкратная.

В опытные колбы без разбавления исследуемой пробы добавляют растворы исходных питательных солей Прата в количестве  $0,1 \text{ см}^3$  в порядке расположения их в таблице [9.1](#). Далее, в опытные колбы с разбавлением пробы в 2 раза - добавляют растворы исходные растворы питательных солей среды Прата по той же схеме, что и выше, но в количестве  $0,05 \text{ см}^3$ . При разбавлении исследуемой пробы в 10 раз - добавляют по  $0,01 \text{ см}^3$ , а при разбавлениях пробы в 100 и 1000 раз, исходные питательные соли не добавляют (их количеством можно пренебречь).

Затем в опытные и контрольные колбы вносят по  $0,5 \text{ см}^3$  исходной культуры водорослей *S. quadricauda* в экспоненциальной фазе роста численностью около  $5 \text{ млн. кл/см}^3$  (при этом численность клеток водорослей в опытных и контрольных колбах будет составлять около  $30 \text{ тыс. кл/см}^3$ ).

При исследовании растворов различных концентраций вещества (смеси веществ) в конические колбы наливают по  $100 \text{ см}^3$  среды Прата (как в контрольные, так и в опытные). В опытные колбы добавляют различные объемы исходного раствора исследуемого вещества (смеси веществ) для создания нужной концентрации и вносят по  $0,5 \text{ см}^3$  исходной культуры водорослей *S. quadricauda* в экспоненциальной фазе роста численностью  $5 \text{ млн. кл/см}^3$ . В контроль кроме водорослей ничего не вносят.

После этого колбы закрывают ватно-марлевыми пробками, встряхивают и помещают в люминостат. Экспонируют, соблюдая условия п. [9.5.1](#). Содержимое каждой колбы перемешивают один - два раза в сутки.

9.7.2. В начале биотестирования в каждой колбе определяют исходную численность клеток. Исходная численность клеток должна составлять не менее 30 тыс. кл/см<sup>3</sup> в случае подсчета в счетной камере и не менее 50 тыс. кл/см<sup>3</sup> - в случае подсчета оптическим методом.

Затем считают численность клеток ежедневно, тщательно перемешивая содержимое колб, в течение 3-х суток в остром опыте и 7-и суток - в хроническом.

Для подсчета численности клеток водорослей используют счетные камеры Горяева или Нажотта (п. 9.7.2).

Для этого пипеткой отбирают суспензию водорослей из колбы, наносят по одной капле на сетки в счетной камере Горяева. Затем камеру накрывают покровным стеклом, которое притирают по бокам до появления колец интерференции. Через 1-2 мин начинают подсчет водорослей в пяти больших (или восьмидесяти малых квадратах), расположенных по диагонали сетки счетной камеры, или в 25 больших квадратах всей камеры при малой плотности водорослей. Из каждой контрольной и опытной колбы просчитывают не менее трех капель.

9.7.3. Допустимо для определения численности клеток использовать фотоэлектроколориметр типа ФЭК-56, К.ФК-3 или спектрофотометр, или прибор для измерения флуоресценции водорослей (быстрой или замедленной) с дальнейшим определением численности клеток по калибровочной кривой.

Построение калибровочной кривой для определения численности клеток водорослей проводят следующим образом. Исходную культуру водорослей последовательно разбавляют питательной средой в 2, 4, 6... n раз. Численность клеток в каждой колбе подсчитывают в счетной камере не менее 3-х раз и вычисляют среднее значение. На фотоэлектроколориметре или спектрофотометре, или приборе для измерения флуоресценции водорослей определяют соответствующую этой численности клеток оптическую плотность или уровень флуоресценции. Как правило, для измерения оптической плотности или флуоресценции водорослей *Ph. tricornutum* используют кюветы 10 мм толщиной (или другие), длина волны измерения оптической плотности на КФК-3 составляет 360 нм.

По результатам измерений строят калибровочную кривую по формуле

$$E = f(N), \quad (14.1)$$

где  $E$  - оптическая плотность;

$N$  - численность клеток в 1 см<sup>3</sup> культуры.

Необходимо учесть, что калибровочная кривая соответствует определенному устройству, кювете, длине волны и культуре.

Периодически, один раз в месяц, необходимо проверять калибровочную кривую.

9.7.4. Через 72 ч или 7 суток биотестирование прекращают. В каждой колбе подсчитывают численность клеток водорослей.

## 9.8. Обработка и оценка результатов

9.8.1. На основании результатов подсчета клеток в каждой капле определяют численность клеток водорослей (кл/см<sup>3</sup>) в контроле и опыте по формуле

$$X_{k(on)ij} = \frac{m_{k(on)ij}}{nV}, \quad (9.1)$$

где  $m_{k(on)ij}$  - количество подсчитанных клеток водорослей в камере в контроле (опыте) для  $i$ -той капли и  $j$ -го параллельного определения;

$i$  - номер капли суспензии;

$j$  - номер параллельного определения;

$V$  - объем части камеры, имеющей площадь маленького квадрата;

$n$  - количество подсчитанных квадратов.

Для каждого параллельного определения в опыте и контроле вычисляют среднее арифметическое численности клеток водорослей в 1 см<sup>3</sup> по формуле

$$\bar{X}_{k(on)j} = \frac{\sum_{i=1}^I X_{k(on)ij}}{I}, \quad (9.2)$$

где  $I$  - количество капель суспензии.

9.8.2. На основании результатов трех параллельных определений численности клеток водорослей в контроле и опыте находят средние арифметические численности клеток водорослей в контроле (опыте) по формуле

$$\bar{X}_{k(on)} = \frac{\sum_{i=1}^J \bar{X}_{k(on)j}}{J}, \quad (9.3)$$

где  $J$  - количество параллельных определений численности клеток водорослей в контроле (опыте);  $J = 3$ .

Рассчитывают численность клеток водорослей в опыте в процентах от их численности в контроле по формуле

$$P = \frac{\bar{X}_{on}}{\bar{X}_k} \cdot 100, \quad (9.4)$$

где  $P$  - численность клеток водорослей в опыте, %;

$\bar{X}_{on}$  - среднее арифметическое численности клеток водорослей в опыте, кл/см<sup>3</sup>;

$\bar{X}_k$  - среднее арифметическое численности клеток водорослей в контроле, кл/см<sup>3</sup>.

9.8.3. Вывод о наличии или отсутствии токсичности анализируемой пробы воды (водной вытяжки), бурового раствора или раствора вещества (смеси веществ) делают на основании величины  $P$ . Проба воды (водная вытяжка), раствор вещества (смеси веществ) считается токсичной (токсичным), если величина  $P$  составляет 50% и менее.

9.8.4. Для количественной оценки токсичности пробы воды (водной вытяжки), бурового раствора устанавливают ее среднее эффективное разбавление за 72 ч (96 ч) или 7 сут биотестирования ( $\mathcal{E}P_{50}$  за 72 (96) ч или  $\mathcal{E}P_{50}$  за 7 сут).

Для количественной оценки токсичности вещества (смеси веществ) устанавливают среднюю эффективную концентрацию вещества (смеси веществ) за 72 ч или 7 сут биотестирования ( $\mathcal{E}K_{50}$  за 72 ч или  $\mathcal{E}K_{50}$  за 7 сут).

9.8.5. Расчет  $\mathcal{E}P_{50}$  за 72 (96) ч ( $\mathcal{E}P_{50}$  за 7 сут) или  $\mathcal{E}K_{50}$  за 72 (96) ч ( $\mathcal{E}K_{50}$  за 7 сут) проводят в соответствии с [приложением В](#).

## 9.9. Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности

Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности проводят в объеме 5% от количества текущих измерений.

Контроль воспроизводимости проводят по результатам двух определений токсичности пробы воды (водной вытяжки), буровых растворов, раствора вещества (смеси веществ) полученных в условиях воспроизводимости ( $\mathcal{E}P_1$ ,  $\mathcal{E}P_2$ ) или ( $\mathcal{E}K_1$ ,  $\mathcal{E}K_2$ ).

Решение об удовлетворительности воспроизводимости определений принимается при условии:

$$\frac{2|\mathcal{E}P_1 - \mathcal{E}P_2|}{\mathcal{E}P_1 + \mathcal{E}P_2} \cdot 100\% \leq D,$$

где  $D$  - норматив оперативного контроля воспроизводимости составляет 45%.

## 10. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО ГИБЕЛИ РАКООБРАЗНЫХ DAPHNIA MAGNA STRAUS

### 10.1. Назначение и область применения

Настоящая «Методика...» устанавливает процедуру определения острой летальной токсичности сточных, поверхностных и подземных вод, донных отложений (водных вытяжек), буровых растворов, водных растворов отдельных веществ и их смесей.

### 10.2. Принцип методики

10.2.1. Методика основана на установлении различия между количеством погибших дафний в анализируемой пробе (опыт) и культивационной воде (контроль).

10.2.2. Критерием острой летальной токсичности является гибель 50% дафний и более в опыте по сравнению с контролем за 96 ч биотестирования.

### 10.3. Характеристики погрешности измерений

Границы, в которых находится относительная погрешность определения токсичности по данной методике с заданной доверительной вероятностью  $P=0,95$ , составляют  $\pm 66\%$ .

Наибольшее возможное значение среднего квадратического отклонения случайной составляющей относительной погрешности определения токсичности по данной методике  $\sigma$  ( $\delta$ ) составляет 34%.

Характеристики погрешности установлены по результатам внутрилабораторного эксперимента с использованием эталонного вещества - калия двуххромовокислого ( $K_2Cr_2O_7$ ).

Алгоритм установления характеристик погрешности методики приведен в [приложении Б](#).

### 10.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

Применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы:

- микрокомпрессор аквариумный АЭН ТУ 16-064-011;
- аппарат для встряхивания ТУ 64-1-1081;
- мешалка лабораторная ТУ 25-05-2160;
- оксиметр любого типа, с погрешностью измерения не более  $0,5 \text{ мг O}_2/\text{дм}^3$ ;
- лупа складная ГОСТ 7954, ТУ 3-3-227;
- груши резиновые разные (пипеточные луковицы) ТУ 38-106-003;
- газ мельничный № 25-43 (число отверстий, приходящихся на 1 см соответствует номеру) [ГОСТ 4403](#);
- термомолюностат, поддерживающий температуру воды  $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ , освещенность  $(500+100)$  лк;
- весы лабораторные по [ГОСТ 24104](#), 2 класса точности, с наибольшей предельной нагрузкой 200 г;
- воронки разные лабораторные [ГОСТ 25336](#);
- бюксы или стаканчики для взвешивания, диаметром 30, 40 мм ГОСТ 7148;
- центрифуга лабораторная медицинская ТУ 5-375-4261;
- термометр по [ГОСТ 112](#) с ценой деления шкалы  $1^\circ\text{C}$ ; холодильник, поддерживающий температуру  $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ ;
- шкаф сушильный электрический общелабораторного назначения, ГОСТ 13474;
- рН-метр ГОСТ 25.7416.0171 или аналоги;
- колбы мерные по [ГОСТ 1770](#), вместимостью 0,5 и 1,0  $\text{дм}^3$  по [ГОСТ 1770](#), 2 класса точности;
- бумагу фильтровальную по [ГОСТ 12026](#);
- вату и марлю для изготовления ватно-марлевых пробок;
- пипетки мерные вместимостью от 1 до 10  $\text{см}^3$  по [ГОСТ 29227](#), 2 класса точности;
- пипетки автоматические дозаторы любого типа объемом 0,1-0,2  $\text{см}^3$ ;
- посуду стеклянную: вместимостью 2  $\text{дм}^3$  для культивирования дафний; вместимостью от 100 до 150  $\text{см}^3$  для биотестирования; вместимостью 1  $\text{дм}^3$  для транспортирования и хранения проб воды;

- пробирки стеклянные, вместимостью 10 см<sup>3</sup> [ГОСТ 25336](#);
- трубки стеклянные внутренним диаметром 5-7 мм для отлова дафний;
- цилиндры мерные вместимостью 0,1; 0,5 и 1,0 дм<sup>3</sup> по [ГОСТ 1770](#), 2 класса точности;
- дрожжи хлебопекарные по [ГОСТ 171](#);
- культура зеленых водорослей (для корма - родов *Chlorella* или *Scenedesmus*);
- железа хлорид по [ГОСТ 4147](#);
- калий азотнокислый по [ГОСТ 4217](#);
- калий двухромовокислый по [ГОСТ 4220](#);
- калий фосфорнокислый двузамещенный по [ГОСТ 2493](#);
- магний сернокислый по [ГОСТ 4523](#).

### 10.5. Условия выполнения биотестирования

10.5.1. Биотестирование проводят в помещении, где не хранят и не работают с летучими веществами, не используют обработку помещения инсектицидами.

10.5.2. Объем пробы воды (водной вытяжки), бурового раствора, раствора вещества (смеси веществ) для определения острой летальной токсичности должен быть не менее 1 дм<sup>3</sup>.

10.5.3. Температура анализируемой пробы при биотестировании должна быть (20±2)°С, концентрация кислорода в пробе в начале биотестирования - не менее 6 мг/дм<sup>3</sup>. Если его концентрация ниже 6 мг/дм<sup>3</sup>, пробу аэрируют микрокомпрессором. Воздух должен подаваться равномерно до достижения концентрации кислорода 6 мг/дм<sup>3</sup>. Во время биотестирования пробу не аэрируют.

Биотестирование проводят при рассеянном свете. Не допускается попадание прямых солнечных лучей на тест-объект. Длительность светового периода соответствует естественному. Рекомендуется использовать термолюминостаг.

10.5.4. Плотность посадки односуточных дафний в опыте и контроле должна составлять 10 экземпляров на 100 см<sup>3</sup>. Повторность трехкратная.

10.5.5. Результаты учитывают, если в конце биотестирования концентрация кислорода в анализируемых пробах была не менее 2 мг/дм<sup>3</sup>, температура воды составляла (20±2)°С, количество погибших дафний в контроле не превышало 10%, ЛК<sub>50</sub> за 24 ч эталонного вещества K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> для культуры дафний находилась в диапазоне его концентраций 0,9-2,5 мг/дм<sup>3</sup>.

### 10.6. Подготовка к выполнению биотестирования

10.6.1. В качестве тест-объекта используют лабораторную культуру дафний - *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea).

Условия культивирования (и биотестирования) дафний соответствуют [п. 10.5](#).

Культуру дафний выращивают в стеклянной посуде вместимостью до 2 дм<sup>3</sup>. Посуду моют питьевой содой и тщательно ополаскивают дистиллированной водой. Нельзя применять синтетические моющие средства и органические растворители.

Для культивирования дафний используют питьевую воду. Питьевую воду предварительно дехлорируют путем отстаивания и аэрируют микрокомпрессором до достижения концентрации растворенного кислорода не менее 6 мг/дм<sup>3</sup>.

Начальная плотность культуры дафний должна быть от 10 до 15 особей в 1 дм<sup>3</sup>. Один раз в неделю взрослых дафний в возрасте до 4 недель и молодь (для дальнейшего поддержания культуры) пересаживают отдельно в посуду со свежей водой.

Пересаживают дафний при помощи стеклянной трубки внутренним диаметром 5-7 мм так, чтобы их не травмировать. Для этого конец трубки помещают под поверхность воды и держат до тех пор, пока дафнии не перейдут в трубку. Аэрировать воду в посуде с дафниями не рекомендуется.

Дафний кормят один раз в сутки суспензией зеленых водорослей и один раз в неделю - суспензией хлебопекарных дрожжей.

Для приготовления дрожжевого корма 1 г свежих или 0,5 г воздушно-сухих дрожжей



заливают 100 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. После набухания дрожжей суспензию тщательно перемешивают и отстаивают в течение 30 мин. Надосадочную жидкость добавляют в посуду с дафниями в количестве 5 см<sup>3</sup> на 1 дм<sup>3</sup> воды.

В качестве водорослевого корма для дафний рекомендуется использовать зеленые протококковые водоросли - сценедесмус или хлореллу. Их выращивают в соответствии с 9.6.2. Водоросли вносят в культуру дафний из расчета 1 см<sup>3</sup> суспензии водорослей (плотность клеток составляет примерно 350 млн.кл/см<sup>3</sup>). Суспензию водорослей получают центрифугированием или отстаиванием в холодильнике в течение 2-3 суток. Надосадочную жидкость сливают, а осадок разбавляют в 2 раза дистиллированной водой и используют в качестве корма.

10.6.2. Для биотестирования используют дафний в возрасте до 24 ч, которых кормят за 2-3 ч до начала биотестирования. Чтобы получить необходимое количество тест-объектов для биотестирования, 20-30 самок дафний с выводковыми камерами, полными яиц или зародышей, за одни сутки до биотестирования пересаживают в стеклянную посуду емкостью от 0,5 до 1,0 дм<sup>3</sup> с водой для культивирования и вносят корм. После появления молоди (каждая самка может выметать от 10 до 40 молодых дафний) взрослых особей удаляют.

10.6.3. Не реже одного раза в месяц культуру односуточных дафний проверяют на пригодность к биотестированию. С этой целью устанавливают среднюю летальную концентрацию за 24 ч биотестирования (ЛК<sub>50</sub> за 24 ч) раствора эталонного вещества двуххромовокислого калия (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>). Для этого готовят исходный раствор K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 1 г/дм<sup>3</sup>, используя дистиллированную воду. Далее, разбавляя исходный раствор культивационной водой, готовят серию растворов от 0,5 до 4,0 мг/дм<sup>3</sup> K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> с интервалом 0,5 мг/дм<sup>3</sup> (опыт). Контролем служит культивационная вода. Биотестирование этих растворов проводят продолжительностью 24 ч в соответствии с процедурой, изложенной в 10.7. На основании полученных результатов рассчитывают ЛК<sub>50</sub> за 24 ч двуххромовокислого калия в соответствии с [приложением В](#).

Если полученная ЛК<sub>50</sub> за 24 ч находится в экспериментально установленном диапазоне реагирования тест-объекта, который равен 0,9-2,5 мг/дм<sup>3</sup> K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> культура дафний пригодна для биотестирования.

Если ЛК<sub>50</sub> за 24 ч K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> не находится в указанном диапазоне реагирования, проверяют условия культивирования тест-объекта, чтобы выяснить причины ухудшения состояния культуры. При необходимости культуру заменяют на новую.

## 10.7. Выполнение биотестирования

При биотестировании выполняют следующие операции.

10.7.1. Пробу воды (водную вытяжку) или буровой раствор соответствующего разбавления, а также растворы различных концентраций вещества (смеси веществ) наливают в стеклянные сосуды по 100 см<sup>3</sup> (опыт). Другие сосуды наполняют таким же объемом отфильтрованной воды из емкостей, где культивируются дафнии (контроль). Повторность в опыте и контроле трехкратная.

10.7.2. В каждый опытный и контрольный сосуд помещают по 10 дафний в возрасте до 24 ч. Их быстро переносят стеклянной трубкой диаметром 5-7 мм, погрузив ее в воду.

10.7.3. Продолжительность биотестирования составляет 96 ч. Во время биотестирования дафний не кормят.

10.7.4. В конце биотестирования визуально подсчитывают количество живых дафний. Живыми считают дафний, которые свободно передвигаются в толще воды или всплывают со дна сосуда не позже, чем через 15 сек после его легкого встряхивания. Остальных дафний считают погибшими.

10.7.5. После подсчета дафний в контроле и опыте в каждом сосуде определяют концентрацию растворенного кислорода.

## 10.8. Обработка и оценка результатов

10.8.1. На основании результатов трех параллельных определений количества живых дафний в контроле и опыте находят средние арифметические количества живых дафний в контроле (опыте) по формуле

$$\bar{X}_{k(on)} = \frac{\sum_{i=1}^I X_{k(on)i}}{I}, \quad (10.1)$$

где:  $\bar{X}_{k(on)}$  - результат  $i$ -го измерения количества живых дафний в контроле (опыте);

$i$  - номер измерения количества живых дафний в контроле (опыте);  $i = 1, \dots, I$ ;

$I$  - количество параллельных измерений количества живых дафний в контроле (опыте);  $I = 3$ .

Рассчитывают в процентах количество погибших дафний в опыте по отношению к контролю по формуле

$$A = \frac{\bar{X}_k - \bar{X}_{on}}{\bar{X}_k} \cdot 100. \quad (10.2)$$

10.8.2. Вывод о наличии или отсутствии острой летальной токсичности пробы воды (водной вытяжки), бурового раствора или раствора вещества (смеси веществ) делают на основании величины  $A$ . Если величина  $A$  составляет 50% дафний и более, считают, что анализируемая проба проявляет острую летальную токсичность. В этом случае для количественной оценки токсичности анализируемой пробы воды (водной вытяжки) или бурового раствора устанавливают ее среднее летальное разбавление за 96 ч биотестирования ( $LP_{50}$  за 96 ч).

Для количественной оценки токсичности вещества (смеси веществ) устанавливают среднюю летальную концентрацию вещества (смеси веществ) за 96 ч биотестирования ( $LK_{50}$  за 96 ч).

10.8.3. Расчет  $LK_{50}$  за 96 ч ( $LP_{50}$  за 96 ч) проводят в соответствии с [приложением В](#).

## 10.9. Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности

Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности проводят в объеме 5% от количества текущих измерений.

Контроль воспроизводимости проводят по результатам двух определений токсичности анализируемых пробы воды (водной вытяжки), бурового раствора, раствора вещества (смеси веществ) полученных в условиях воспроизводимости ( $LP_1$ ,  $LP_2$  или  $LK_1$ ,  $LK_2$ ).

Решение об удовлетворительности воспроизводимости определений принимается при условии:

$$\frac{2|LP_1 - LP_2|}{LP_1 + LP_2} \cdot 100\% \leq D,$$

где  $D$  - норматив оперативного контроля воспроизводимости составляет 94%.

## 11. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО ГИБЕЛИ РАКООБРАЗНЫХ CERIODAPHNIA AFFINIS LILLJEBORG

### 11.1. Назначение и область применения

Настоящая «Методика...» устанавливает процедуру определения острой летальной токсичности сточных, поверхностных и подземных вод, донных отложений (водных вытяжек), водных растворов отдельных веществ и их смесей.

### 11.2. Принцип методики

Методика основана на установлении различия между количеством погибших цериодафний в анализируемой пробе (опыт) и культивационной воде (контроль).

Критерием острой летальной токсичности является гибель 50% цериодафний и более в опыте по сравнению с контролем за 48 ч биотестирования.

### 11.3. Характеристики погрешности измерений

Границы, в которых находится относительная погрешность определения токсичности по данной методике с заданной доверительной вероятностью  $P=0,95$ , составляют  $\pm 61\%$ .

Наибольшее возможное значение среднего квадратического отклонения случайной составляющей относительной погрешности определения токсичности по данной методике  $\sigma$  ( $\delta$ ) составляет 31%.

Характеристики погрешности установлены по результатам внутрилабораторного эксперимента с использованием эталонного вещества - калия двуххромовоокислого ( $K_2Cr_2O_7$ ).

Алгоритм установления характеристик погрешности методики приведен в [приложении Б](#).

### 11.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

Применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы:

- микрокомпрессор аквариумный АЭН ТУ 16-064-011;
- аппарат для встряхивания ТУ 64-1-1081;
- мешалка лабораторная ТУ 25-05-2160;
- оксиметр любого типа, с погрешностью измерения не более 0,5 мг  $O_2/дм^3$ ;
- лупа складная ГОСТ 7954, ТУ 3-3-227;
- груши резиновые разные (пипеточные луковицы) ТУ 38-106-003;
- газ мельничный № 25-43 (число отверстия, приходящихся на 1 см соответствует номеру) [ГОСТ 4403](#);
- термомолюностат, поддерживающий температуру воды  $(20\pm 2)^\circ C$ , освещенность  $(500\pm 100)$  лк;
- весы лабораторные по [ГОСТ 24104](#), 2 класса точности, с наибольшей предельной нагрузкой 200 г;
- воронки разные лабораторные [ГОСТ 25336](#);
- бюксы или стаканчики для взвешивания, диаметром 30, 40 мм ГОСТ 7148;
- центрифуга лабораторная медицинская ТУ 5-375-4261;
- термометр по [ГОСТ 112](#) с ценой деления шкалы  $1^\circ C$ ;
- холодильник, поддерживающий температуру  $(4\pm 2)^\circ C$ ;
- шкаф сушильный электрический общелабораторного назначения, ГОСТ 13474;
- рН-метр ГОСТ 25.7416.0171 или аналоги;
- колбы мерные по [ГОСТ 1770](#), вместимостью 0,5 и 1,0  $дм^3$  по [ГОСТ 1770](#), 2 класса точности;
- бумагу фильтровальную по [ГОСТ 12026](#);
- вату и марлю для изготовления ватно-марлевых пробок;
- пипетки мерные вместимостью от 1 до 10  $см^3$  по [ГОСТ 29227](#), 2 класса точности;
- пипетки автоматические дозаторы любого типа объемом 0,1-0,2  $см^3$ ;
- посуду стеклянную: вместимостью 2  $дм^3$  для культивирования дафний; вместимостью от 100 до 150  $см^3$  для биотестирования; вместимостью 1  $дм^3$  для транспортирования и хранения проб воды;
- пробирки стеклянные, вместимостью 10  $см^3$  [ГОСТ 25336](#);
- трубки стеклянные внутренним диаметром 5-7 мм для отлова дафний;
- цилиндры мерные вместимостью 0,1; 0,5 и 1,0  $дм^3$  по [ГОСТ 1770](#), 2 класса точности;
- дрожжи хлебопекарные по [ГОСТ 171](#);
- культура зеленых водорослей (для корма - родов Chlorella или Scenedesmus);
- железа хлорид по [ГОСТ 4147](#);
- калий азотнокислый по [ГОСТ 4217](#);

- калий двухромовокислый по [ГОСТ 4220](#);
- калий фосфорнокислый двузамещенный по [ГОСТ 2493](#);
- магний сернокислый по [ГОСТ 4523](#);

### 11.5. Условия выполнения биотестирования

11.5.1. Биотестирование проводят в помещении, где не хранят и не работают с химическими веществами, не используют обработку помещений.

11.5.2. Объем пробы воды (водной вытяжки), водного раствора вещества (смеси веществ) для определения острой летальной токсичности должен быть не менее 1 дм<sup>3</sup>.

11.5.3. Температура анализируемой пробы при биотестировании должна быть равна (25±2)°С, концентрация кислорода в пробе в начале биотестирования - не менее 6 мг/дм<sup>3</sup>. Если его концентрация ниже 6 мг/дм<sup>3</sup>, пробу аэрируют микрокомпрессором. Воздух должен подаваться равномерно до достижения концентрации кислорода 6 мг/дм<sup>3</sup>. Во время биотестирования пробу не аэрируют.

Биотестирование проводят при рассеянном свете. Не допускается попадание прямых солнечных лучей на цериодафний. Длительность светового периода соответствует естественному. Рекомендуется использовать термолюминостанты.

11.5.4. Плотность посадки цериодафний возрастом 4-8 час в опыте и контроле составляет 1 экземпляр на 10 см<sup>3</sup>. Повторность 10-и кратная.

11.5.5. Результаты учитывают, если в конце биотестирования концентрация кислорода в пробе была не менее 2 мг/дм<sup>3</sup>, температура во время биотестирования составляла (25±2)°С, количество погибших цериодафний в контроле не превышало 10%, ЛК<sub>50</sub> за 24 ч эталонного вещества K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> для культуры односуточных цериодафний находилась в диапазоне его концентраций 0,9-3,3 мг/дм<sup>3</sup>.

### 11.6. Подготовка к выполнению биотестирования

11.6.1. В качестве тест-объекта используют лабораторную культуру цериодафний - *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (Cladocera, Crustacea).

Условия культивирования цериодафний соответствуют п. 11.5.

Цериодафний рекомендуется культивировать в посуде вместимостью 2 дм<sup>3</sup>. Ее моют питьевой содой и тщательно ополаскивают дистиллированной водой. Нельзя применять для мытья синтетические моющие средства и органические растворители.

Для культивирования цериодафний используют питьевую воду по [ГОСТ 2874](#). Питьевую воду предварительно дехлорируют путем отстаивания и аэрируют микрокомпрессором до достижения концентрации растворенного кислорода не менее 6 мг/дм<sup>3</sup>. Оптимальная температура для культивирования цериодафний составляет (25±2)°С.

Начальная плотность посадки культуры должна быть от 10 до 15 особей молоди цериодафний на 1 дм<sup>3</sup> воды. Первый помет цериодафний должен появляться не позднее 6 сут. За неделю каждая самка должна выметать не менее 10 молодых цериодафний. Два раза в неделю взрослых цериодафний в возрасте до 2 недель и молодь пересаживают отдельно в посуду со свежей водой.

Для пересаживания цериодафний используют стеклянную трубку с вытянутым концом и резиновой грушей на другом конце. Цериодафний пересаживают осторожно, чтобы их не травмировать.

Кормят цериодафний один раз в сутки суспензией хлебопекарных дрожжей, а раз в неделю - суспензией зеленых водорослей. Для приготовления дрожжевого корма 1 г свежих или 0,5 г воздушно-сухих дрожжей заливают 100 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. После набухания дрожжей суспензию тщательно перемешивают и отстаивают в течение 30 мин. Надосадочную жидкость добавляют в посуду с цериодафниями в количестве 5 см<sup>3</sup> на 1 дм<sup>3</sup> воды.

В качестве водорослевого корма для цериодафний рекомендуется использовать зеленые протококковые водоросли - сценедесмус или хлореллу. Их выращивают в соответствии с

**9.6.2.** Водоросли вносят в культуру цериодафний из расчета  $1 \text{ см}^3$  суспензии водорослей (плотность клеток составляет примерно  $350 \text{ млн. кл./см}^3$ ). Суспензию водорослей получают центрифугированием или отстаиванием в холодильнике в течение 2-3 суток. Надосадочную жидкость сливают, а осадок разбавляют в 2 раза дистиллированной водой и используют в качестве корма.

11.6.2. Для биотестирования используют цериодафний в возрасте 4-8 часов.

Для получения тест-объектов за 24 ч до биотестирования необходимое количество самок цериодафний возрастом от 7 до 14 сут, выводковые камеры которых наполнены яйцами, пересаживают в стеклянную посуду вместимостью от  $0,5$  до  $1,0 \text{ дм}^3$ , которая заполнена водой для культивирования. В эту воду перед пересаживанием цериодафний вносят корм. От каждой самки можно получить до 6 молодых цериодафний.

За 2-3 ч до начала биотестирования в посуду с цериодафниями вносят корм и удаляют взрослых особей.

11.6.3. Не реже одного раза в месяц культуру цериодафний возрастом 4-8 час проверяют на пригодность для биотестирования.

Для определения пригодности культуры цериодафний для биотестирования устанавливают среднюю летальную концентрацию раствора эталонного вещества - двуххромовокислого калия ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) за 24 ч биотестирования ( $\text{ЛК}_{50}$  за 24 ч). Для этого готовят исходный раствор  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  концентрацией  $1 \text{ г/дм}^3$ , используя дистиллированную воду. Далее из исходного раствора готовят серию растворов с концентрациями  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  от  $0,5$  до  $4,0 \text{ мг/дм}^3$  с интервалом  $0,5 \text{ мг/дм}^3$ , используя культивационную воду (опыт). Контролем служит культивационная вода. Биотестирование этих растворов проводят продолжительностью 24 ч в соответствии с процедурой, изложенной в 11.7. На основании полученных результатов рассчитывают  $\text{ЛК}_{50}$  за 24 ч в соответствии с [приложением В](#).

Если полученная величина  $\text{ЛК}_{50}$  за 24 ч находится в экспериментально установленном диапазоне реагирования тест-объекта, который равен  $0,9-3,3 \text{ мг/дм}^3 \text{ K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , культура цериодафний пригодна для биотестирования.

Если  $\text{ЛК}_{50}$  за 24 ч не находится в указанном диапазоне реагирования, проверяют условия культивирования тест-объекта, при необходимости культуру заменяют.

## 11.7. Выполнение биотестирования

При биотестировании выполняют следующие операции.

11.7.1. Разбавление анализируемой проб воды (водной вытяжки) и растворы с разными концентрациями вещества (смеси веществ) готовят прибавлением определенного объема пробы в культивационную воду.

Затем подготовленных к анализу проб воды (водной вытяжки) или растворы разных концентраций вещества (смеси веществ) наливают по  $15 \text{ см}^3$  в 10 стеклянных сосудов (опыт). Другие десять сосудов наполняют таким же объемом культивационной воды (контроль).

11.7.2. В каждый опытный и контрольный сосуд помещают по 1 экземпляру цериодафний в возрасте 4-8 ч. Их переносят из сосудов для культивирования трубкой с вытянутым концом и диаметром от 5 до 7 мм.

11.7.3. Продолжительность биотестирования составляет 48 ч. Во время биотестирования цериодафний не кормят.

11.7.4. В конце биотестирования визуально подсчитывают количество живых цериодафний. Живыми считают цериодафний, которые свободно двигаются в толще воды или всплывают со дна сосуда после его легкого встряхивания.

11.7.5. После подсчета цериодафний в контроле и опыте в каждом сосуде определяют концентрацию растворенного кислорода.

## 11.8. Обработка и оценка результатов

11.8.1. На основании результатов десяти параллельных определений количества живых

периодафний в контроле и опыте находят средние арифметические количества живых периодафний в контроле (опыте) по формуле

$$\bar{X}_{k(on)} = \frac{\sum_{i=1}^I X_{k(on)i}}{I}, \quad (11.1)$$

где  $\bar{X}_{k(on)}$  - результат  $i$ -го измерения количества живых периодафний в контроле (опыте);  
 $i$  - номер измерения количества живых периодафний в контроле (опыте);  $i = 1, \dots, I$   
 $I$  - количество параллельных измерений количества живых периодафний в контроле (опыте);  $I = 10$ .

Рассчитывают в процентах количество погибших периодафний в опыте по отношению к контролю по формуле

$$A = \frac{\bar{X}_k - \bar{X}_{on}}{\bar{X}_k} \cdot 100. \quad (11.2)$$

11.8.2. Вывод о наличии или отсутствии острой летальной токсичности анализируемой пробы воды (водной вытяжки) или раствора вещества (смеси веществ) делают на основании величины  $A$ . Если величина  $A$  составляет 50% периодафний и более, считают, что анализируемая проба проявляет острую летальную токсичность. В этом случае для количественной оценки токсичности анализируемой пробы устанавливают ее среднее летальное разбавление за 48 ч биотестирования ( $ЛР_{50}$  за 48 ч).

Для количественной оценки токсичности вещества (смеси веществ) устанавливают среднюю летальную концентрацию вещества (смеси веществ) за 48 ч биотестирования ( $ЛК_{50}$  за 48 ч).

Для количественной оценки токсичности вещества (смеси веществ) устанавливают среднюю летальную концентрацию вещества (смеси веществ) за 48 ч биотестирования ( $ЛК_{50}$  за 48 ч).

11.8.3. Расчет  $ЛК_{50}$  за 48 ч ( $ЛР_{50}$  за 48 ч) проводят в соответствии с [приложением В](#).

### 11.9. Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности

Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности проводят в объеме 5% от количества текущих измерений.

Контроль воспроизводимости проводят по результатам двух определений токсичности анализируемой пробы воды (водной вытяжки), раствора вещества (смеси веществ) полученных в условиях воспроизводимости ( $ЛР_1$ ,  $ЛР_2$  или  $ЛК_1$ ,  $ЛК_2$ ).

Решение об удовлетворительности воспроизводимости определений принимается при условии:

$$\frac{2|ЛР_1 - ЛР_2|}{ЛР_1 + ЛР_2} \cdot 100\% \leq D,$$

где  $D$  - норматив оперативного контроля воспроизводимости составляет 86%.

## 12. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО ВЫЖИВАЕМОСТИ И ПЛОДОВИТОСТИ РАКООБРАЗНЫХ CERIODAPHNIA AFFINIS LILLJEBORG

### 12.1. Назначение и область применения

Настоящая «Методика...» устанавливает процедуру определения хронической токсичности сточных, поверхностных и подземных вод, донных отложений (водных вытяжек), водных растворов отдельных веществ и их смесей.

### 12.2. Принцип методики

Методика основана на установлении различия между показателями выживаемости и (или) плодовитости цериодафний в анализируемой пробе (опыт) и культивационной воде (контроль).

Критерием хронической токсичности является статистически достоверное увеличение количества погибших исходных цериодафний и (или) уменьшение количества новорожденных особей в опыте по сравнению с контролем на протяжении трех последовательных пометов за  $(7 \pm 1)$  сут.

### 12.3. Характеристики погрешности измерений

Границы, в которых находится относительная погрешность определения токсичности по данной методике с заданной доверительной вероятностью  $P=0,95$ , составляют  $\pm 63\%$ .

Наибольшее возможное значение среднего квадратического отклонения случайной составляющей относительной погрешности определения токсичности по данной методике  $\sigma$  ( $\delta$ ) составляет 32%.

Характеристики погрешности установлены по результатам внутрилабораторного эксперимента с использованием эталонного вещества - калия двуххромовокислого ( $K_2Cr_2O_7$ ).

Алгоритм установления характеристик погрешности методики приведен в [приложении Б](#).

### 12.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

Применяют средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы, указанные в [11.4](#).

### 12.5. Условия выполнения биотестирования

12.5.1. Биотестирование проводят в помещении где не хранят и не работают с химическими веществами, не используют обработку помещений инсектицидами.

12.5.2. Объем пробы воды (водной вытяжки), раствора вещества (смеси веществ) для определения хронической токсичности должен быть не менее  $2 \text{ дм}^3$ .

12.5.3. Температура анализируемой пробы при биотестировании должна быть равна  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ , концентрация кислорода в пробе в начале биотестирования - не менее  $6 \text{ мг/дм}^3$ . Если его концентрация ниже  $6 \text{ мг/дм}^3$ , пробу аэрируют микрокомпрессором. Воздух должен подаваться равномерно до достижения концентрации кислорода  $6 \text{ мг/дм}^3$ . Во время биотестирования пробу не аэрируют.

12.5.4. Плотность посадки односуточных дафний в опыте и контроле составляет 1 экземпляр на  $15 \text{ см}^3$ .

12.5.5. Результаты учитывают, если в конце биотестирования концентрация кислорода в пробе была не менее  $2 \text{ мг/дм}^3$ , температура пробы во время биотестирования составляла  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ , количество погибших цериодафний в контроле не превышало 10%, ЛК<sub>50</sub> за 24 ч эталонного вещества  $K_2Cr_2O_7$  для культуры односуточных цериодафний находилась в диапазоне его концентраций  $0,9\text{-}3,3 \text{ мг/дм}^3$ .

Биотестирование проводят при рассеянном свете. Не допускается попадание прямых солнечных лучей на цериодафний. Длительность светового периода соответствует естественному. Рекомендуется использовать термолюминостат.

### 12.6. Подготовка к выполнению биотестирования

В качестве тест-объекта используют лабораторную культуру ракообразных *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (Cladocera, Crustacea). Культивирование цериодафний в лабораторных условиях, подготовка к биотестированию, процедура определения пригодности культуры для биотестирования приведены в [11.6](#).

### 12.7. Выполнение биотестирования

12.7.1. При биотестировании выполняют следующие операции. Приготовленные разбавления анализируемой пробы воды (водной вытяжки) или растворы с различными концентрациями вещества (смеси веществ) наливают по  $15 \text{ см}^3$  в десять сосудов (опыт).

Другие десять сосудов заполняют таким же объемом культивационной воды (контроль).

12.7.2. В каждый из опытных и контрольных сосудов помещают по 1 экземпляру цериодафний. Их переносят из сосудов для культивирования трубкой с вытянутым концом и диаметром от 5 до 7 мм.

12.7.3. Ежедневно в каждом сосуде проводят замену пробы на свежую. Для этого содержимое сосуда переливают в дополнительный сосуд (например, чашку Петри, бюкс или другой плоский сосуд соответствующего размера). Освободившийся сосуд заполняют свежей пробой. В каждом дополнительном сосуде регистрируют наличие цериодафний. Исходную цериодафнию пересаживают в приготовленный сосуд и вносят корм (суспензию дрожжей).

Появившуюся молодь подсчитывают и удаляют. Биотестирование заканчивают после того, как 60% исходных самок в контроле дадут по три последовательных помета. Продолжительность биотестирования составляет  $(7 \pm 1)$  сут.

## 12.8. Обработка и оценка результатов

12.8.1. После окончания биотестирования подсчитывают количество исходных выживших самок и количество появившейся молоди в расчете на одну самку в каждом параллельном определении в контроле и опыте.

12.8.2. Достоверность различий между опытом и контролем по показателям выживаемости и плодовитости устанавливают по критерию Стьюдента ( $t_{теор}$ ). Для этого вычисляют фактический критерий достоверности разницы ( $t_{факт}$ ) и сравнивают его с теоретическим ( $t_{теор}$ ).

Значение  $t$  факт находят по формуле

$$t_{факт} = \frac{\bar{X}_k - \bar{X}_{он}}{\sqrt{S_k^2 + S_{он}^2}}, \quad (12.1)$$

где  $\bar{X}_k, \bar{X}_{он}$  - средние арифметические показателей выживаемости или плодовитости в контроле и опыте;

$S_k, S_{он}$  - ошибки средних арифметических в контроле и опыте.

Значение  $t_{теор}$  табличная величина. Для уровня значимости  $P = 5 \%$  и числа степеней свободы  $F = 2(10-1) = 18$   $t_{теор} = 2,1$  (табл. 12.1).

Таблица 12.1

### Значения критерия Стьюдента

Число степеней свободы	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
$t_{теор}$	2,20	2,18	2,16	2,14	2,13	2,12	2,11	2,10	2,09	2,09

Если  $t_{факт} > t_{теор}$ , то разница между результатами биотестирования в опыте и контроле считается статистически достоверной. На этом основании делают вывод о том, что проба воды (водная вытяжка) или раствор вещества (смеси веществ) оказывает хроническое токсическое действие.

Если  $t_{факт} < t_{теор}$ , то разница между результатами биотестирования в опыте и контроле считается статистически недостоверной. На этом основании делают вывод о том, что проба воды (водная вытяжка) или раствор вещества (смеси веществ) не оказывает хронического токсического действия.

12.8.3. Для количественной оценки токсичности пробы воды (водной вытяжки) устанавливают ее эффективное разбавление (ЭР), т.е. максимальное разбавление, при котором наблюдается достоверное увеличение количества погибших исходных цериодафний и (или) уменьшение количества появившихся особей в опыте по сравнению с контролем на протяжении трех последовательных пометов за  $(7 \pm 1)$  сут.

12.8.4. Для количественной оценки токсичности вещества (смеси веществ) устанавливают



эффективную концентрацию (ЭК) вещества (смеси веществ), т.е. минимальную концентрацию, при которой наблюдается достоверное увеличение количества погибших исходных цериодафний и (или) уменьшение количества появившихся особей в опыте по сравнению с контролем на протяжении трех последовательных пометов за  $(7 \pm 1)$  сут.

### 12.9. Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности

Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности проводят в объеме 5% от количества текущих измерений.

Контроль воспроизводимости проводят по результатам двух определений токсичности анализируемой пробы воды (водной вытяжки), раствора вещества (смеси веществ) полученных в условиях воспроизводимости ( $\mathcal{E}P_1$ ,  $\mathcal{E}P_2$  или  $\mathcal{E}K_1$ ,  $\mathcal{E}K_2$ ).

Решение об удовлетворительности воспроизводимости определений принимается при условии:

$$\frac{2|\mathcal{E}P_1 - \mathcal{E}P_2|}{\mathcal{E}P_1 + \mathcal{E}P_2} \cdot 100\% \leq D,$$

где  $D$  - норматив оперативного контроля воспроизводимости составляет 89%.

## 13. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО ГИБЕЛИ РЫБ ROESILLIA RETICULATA PETERS

### 13.1. Назначение и область применения

Настоящая «Методика...» устанавливает процедуру определения острой летальной токсичности сточных и поверхностных и подземных вод, донных отложений (водных вытяжек), буровых растворов, водных растворов отдельных веществ и их смесей.

### 13.2. Принцип методики

Методика основана на установлении различия между количеством погибших рыб в анализируемой пробе (опыт) и воде, которая не содержит токсических веществ (контроль).

Критерием острой летальной токсичности является гибель 50% рыб и более в опыте по сравнению с контролем за 96 ч биотестирования.

### 13.3. Характеристики погрешности измерений

Границы, в которых находится относительная погрешность определения токсичности по данной методике с заданной доверительной вероятностью  $P=0,95$ , составляют  $\pm 42\%$ .

Наибольшее возможное значение среднего квадратического отклонения случайной составляющей относительной погрешности определения токсичности по данной методике  $\sigma$  ( $\delta$ ) составляет 21%.

Характеристики погрешности установлены по результатам внутрилабораторного эксперимента с использованием эталонного вещества - калия двуххромовокислого ( $K_2Cr_2O_7$ ).

Алгоритм установления характеристик погрешности методики приведен в [приложении Б](#).

### 13.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

Применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы:

- аквариумы емкостью 50 и 200 дм<sup>3</sup>;
- микрокомпрессор аквариумный АЭН ТУ 16-064, 011;
- оксиметр любого типа, с погрешностью измерения не более 0,5 мг О<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>;
- рН-метр ГОСТ 25.7416.0171 или аналоги;
- приспособление для термостатирования;
- весы лабораторные по [ГОСТ 24104](#), 2-го класса точности с наибольшей предельной нагрузкой 200 г;
- термометр по [ГОСТ 112](#) с ценой деления шкалы 1°С;

- холодильник, поддерживающий температуру  $(4\pm 2)^\circ\text{C}$ ;
- колбы мерные вместимостью 0,5 и 1,0 дм<sup>3</sup> по [ГОСТ 1770](#), 2-го класса точности;
- бумагу фильтровальную по [ГОСТ 12026](#);
- пипетки мерные вместимостью от 1 до 10 см<sup>3</sup> по [ГОСТ 29227](#), 2-го класса точности;
- посуду для транспортирования и хранения проб воды вместимостью 5 дм<sup>3</sup>;
- сачок для отлова рыбы;
- стеклянную палочку;
- цилиндры мерные вместимостью 0,1; 0,5 и 1,0 дм<sup>3</sup> по [ГОСТ 1770](#), 2-го класса точности;
- воду дистиллированную по [ГОСТ 6709](#);
- воду питьевую по ГОСТ 2784;
- калий двуххромовокислый по [ГОСТ 4220](#).

### 13.5. Условия выполнения биотестирования

13.5.1. Биотестирование проводят в помещении где не хранят и не работают с химическими веществами, не используют обработку помещений инсектицидами.

Используют рассеянный свет, естественный световой период.

13.5.2. Объем пробы воды (водной вытяжки), бурового раствора, вещества (смеси веществ) для определения острой летальной токсичности должен быть не менее 30 дм<sup>3</sup>.

13.5.3. Температура анализируемой пробы должна равняться  $(25\pm 1)^\circ\text{C}$ , концентрация растворенного кислорода не менее 4 мг/дм<sup>3</sup>. Если концентрация растворенного кислорода меньше, пробу аэрируют микрокомпрессором.

13.5.4. Плотность посадки гуппи в возрасте 24-48 час в опыте и контроле должна быть 10 экземпляров рыб на 5 дм<sup>3</sup>. Повторность двух - трехкратная.

13.5.5. Результаты учитывают, если при биотестировании концентрация растворенного кислорода была не менее 4 мг/дм<sup>3</sup>, температура составляла  $(25\pm 1)^\circ\text{C}$ , количество погибших рыб в контроле не превышало 10%, ЛК<sub>50</sub> за 24 ч калия двуххромовокислого ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) для рыб находилась в диапазоне концентраций 106-175 мг/дм<sup>3</sup>.

### 13.6. Подготовка к выполнению биотестирования

13.6.1. В качестве тест-объекта используют мальков гуппи в возрасте не более двух суток (от 24 до 48 ч).

Для получения тест-объекта выбирают рыб не старше двух лет (продолжительность жизни гуппи 3-3,5 года), без каких-либо признаков заболевания.

Отобранных самцов и самок рекомендуется содержать в отдельных аквариумах. При совместном содержании самцы растут медленнее и имеют меньшие размеры. Половозрелые гуппи имеют хорошо развитые половые признаки, что облегчает их сортировку. Самцы, как правило, мельче (3-4 см) и имеют более яркую окраску, чем самки. У них преобладают серовато-коричневые тона с очень яркими красными, голубыми, зелеными и черными пятнами. Самки больше самцов, до 6 см в длину, чаще желтовато-зеленые. Анальный плавник у самок округлый. У молодых самцов он имеет ту же форму, но со временем, в период полового созревания, он начинает удлиняться и превращается в подвижный гоноподий.

Для содержания производителей пригодны любые термостатируемые аквариумы, которые обеспечивают температуру воды  $(25\pm 1)^\circ\text{C}$ .

Плотность посадки самцов 1-2 дм<sup>3</sup> воды на экземпляр, самок - не менее 4 дм<sup>3</sup>. Перед размещением рыб аквариумы засаживают растениями без жестких, режущих кромок. Предпочтение следует отдавать густым мелколистным и, обязательно, плавающим растениям (риччия, сальвиния). Спереди или в центре аквариума должно быть свободное пространство для плавания.

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

Для содержания производителей используют питьевую воду по [ГОСТ 2874](#), которую отстаивают на протяжении 7 сут. Воду аэрируют, фильтруют и термостатируют при

температуре  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Содержание растворенного в воде кислорода должно быть не менее  $4 \text{ мг/дм}^3$ . Один раз в месяц  $1/3$  часть воды заменяют на свежую. Добавляемая вода должна быть той же температуры, что и в аквариуме. Вместо испарившейся воды добавляют дистиллированную воду.

Кормят производителей гуппи 3-5 раз в день живым кормом. Корм дается в таком количестве, чтобы рыбы съедали его без остатка за 3-5 мин.

Для получения тест-объектов самцов и самок помещают в один аквариум для совместного содержания. Гуппи относятся к рыбам с внутриутробным развитием икры, способным к нересту полностью сформировавшихся мальков. Готовность самки к нересту определяется наличием хорошо заметного темного пятна перед анальным плавником. При этом форма брюшка приближается к прямоугольной и оно становится намного шире спины.

Самку, готовую к нересту, помещают в отдельную нерестовую посудину. Вместимость ее должна быть не менее  $4 \text{ дм}^3$  с большим количеством мелколистных растений. Нерестовые посудины заполняют водой такого же качества, как и для содержания производителей, и термостатируют при температуре  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Самок после нереста удаляют, так как они поедают мальков.

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

При отсутствии «пыли» молодь гуппи можно кормить перетертой сухой дафнией или каким-либо другим сухим кормом. На 100 рыб его необходимо не более 1 г в сутки. По мере того, как растут рыбы, в их рацион вводят резаный трубочник, мотыль, коретру и другие живые корма. Одно-двухнедельных мальков кормят до 5 раз в день, более взрослых - 2-3 раза.

Мальков сортируют, чтобы избежать неравномерности развития, и постепенно переводят из нерестовых посудин в аквариумы сначала вместимостью  $50 \text{ дм}^3$ , а далее  $200 \text{ дм}^3$ . Аквариумы заполняют водой такого же качества, как и для производителей гуппи.

13.6.2. Тест-организмы (возрастом 1-2 суток) перед серией экспериментов проверяют на пригодность для биотестирования.

Для определения пригодности рыб для биотестирования устанавливают среднюю летальную концентрацию раствора эталонного вещества калия двухромовокислого ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) за 24 ч биотестирования ( $\text{ЛК}_{50}$  за 24 ч). Для этого готовят исходный раствор  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  концентрацией  $10 \text{ г/дм}^3$ , используя дистиллированную воду. Далее из исходного раствора готовят серию растворов с концентрациями  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  от 100 до  $200 \text{ мг/дм}^3$  с интервалом  $25 \text{ мг/дм}^3$ , используя культивационную воду. Биотестирование этих растворов проводят продолжительностью 24 ч в соответствии с процедурой, изложенной в 13.7. На основании полученных результатов рассчитывают  $\text{ЛК}_{50}$  за 24 ч калия двухромовокислого.

Если полученная величина  $\text{ЛК}_{50}$   $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  за 24 ч находится в экспериментально установленном диапазоне реагирования тест-объекта  $106-175 \text{ мг/дм}^3$ , гуппи пригодны для биотестирования.

Если  $\text{ЛК}_{50}$  за 24 ч  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  не находится в указанном диапазоне реагирования, то проверяют условия культивирования тест-объекта, чтобы выяснить причины ухудшения состояния культуры.

### 13.7. Выполнение биотестирования

При биотестировании выполняют следующие операции.

13.7.1. Разбавления пробы воды (водной вытяжки), буровых растворов и растворы с разными концентрациями вещества (смеси веществ) готовят прибавлением определенного объема анализируемой пробы в дехлорированную питьевую воду по [ГОСТ 2874](#).

13.7.2. Приготовленные пробы воды (водных вытяжек) или растворы с различными концентрациями вещества (смеси веществ) наливают в сосуды по  $5 \text{ дм}^3$  (опыт). Другие сосуды наполняют таким же объемом дехлорированной питьевой водой (контроль). Повторность в опыте и контроле трехкратная.

13.7.3. В каждый из опытных и контрольных сосудов помещают по 10 экземпляров гуппи в возрасте от 24 до 48 ч.

13.7.4. Продолжительность биотестирования составляет 96 ч. Во время биотестирования рыб не кормят.

13.7.5. Ежедневно подсчитывают количество живых рыб и удаляют погибших. Погибшими считают рыб, которые не подают признаков движения или дыхания при прикосновении к ним стеклянной палочкой.

### 13.8. Обработка и оценка результатов

13.8.1. На основании результатов трех параллельных определений количества живых рыб в контроле и опыте находят средние арифметические количества живых рыб в контроле (опыте) по формуле

$$\bar{X}_{k(on)} = \frac{\sum_{i=1}^I X_{k(on)i}}{I}, \quad (13.1)$$

где  $\bar{X}_{k(on)}$  - результат  $i$ -го измерения количества живых рыб в контроле (опыте);

$i$  - номер измерения количества живых рыб в контроле (опыте);

$I$  - количество параллельных измерений количества живых рыб в контроле (опыте);  $I = 3$ .

Рассчитывают в процентах количество погибших рыб в опыте по отношению к контролю по формуле

$$A = \frac{\bar{X}_k - \bar{X}_{on}}{\bar{X}_k} \cdot 100. \quad (13.2)$$

13.8.2. Вывод о наличии или отсутствии острой летальной токсичности пробы воды (водной вытяжки) делают на основании величины  $A$ . Если величина  $A$  составляет 50% и более, считают, что анализируемая проба проявляет острую летальную токсичность. В этом случае для количественной оценки токсичности пробы воды (водной вытяжки) устанавливают ее среднее летальное разбавление за 96 ч биотестирования ( $ЛР_{50}$  за 96 ч).

Для количественной оценки токсичности раствора вещества (смеси веществ) устанавливают среднюю летальную концентрацию вещества (смеси веществ) за 96 ч биотестирования ( $ЛК_{50}$  за 96 ч).

13.8.3. Расчет  $ЛК_{50}$  за 96 ч ( $ЛР_{50}$  за 96 ч) проводят в соответствии с [приложением В](#).

### 13.9. Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности

Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности проводят в объеме 5% от количества текущих измерений.

Контроль воспроизводимости проводят по результатам двух определений токсичности пробы воды (водной вытяжки), бурового раствора, раствора вещества (смеси веществ), полученных в условиях воспроизводимости ( $ЛР_1$ ,  $ЛР_2$ ) или ( $ЛК_1$ ,  $ЛК_2$ ).

Решение об удовлетворительности воспроизводимости определений принимается при условии:

$$\frac{2|ЛР_1 - ЛР_2|}{ЛР_1 + ЛР_2} \cdot 100\% \leq D,$$

где  $D$  - норматив оперативного контроля воспроизводимости составляет 58%.

## 14. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО УГНЕТЕНИЮ РОСТА ОДНОКЛЕТОЧНЫХ МОРСКИХ ВОДОРОСЛЕЙ PHAEODASTYLUM TRICORNUTUM BOHLIN

### 14.1. Назначение и область применения

Настоящая «Методика...» устанавливает процедуру определения острой летальной токсичности природных морских вод; сточных вод разной солености; буровых растворов, сбрасываемых в морские воды, растворов отдельных веществ и их смесей в морской воде, морских донных отложений (водных вытяжек).

### 14.2. Принцип методики

14.2.1. Методика основана на установлении различия между интенсивностью роста клеток водорослей в анализируемой пробе (опыт) и культуральной среде (контроль).

14.2.2. Критерием токсического действия является снижение на 50% и более численности клеток водорослей в опыте по сравнению с контролем за 72 ч биотестирования (условно "острая токсичность") и 7 суток (условно "хроническая токсичность"). Для буровых растворов острая токсичность определяется за 96 ч.

### 14.3. Характеристики погрешности измерений

Границы, в которых находится относительная погрешность определения токсичности по данной методике с заданной доверительной вероятностью  $P=0,95$ , составляют  $\pm 23\%$ .

Наибольшее возможное значение среднего квадратического отклонения случайной составляющей относительной погрешности определения токсичности по данной методике  $\sigma$  ( $\delta$ ) составляет 22%.

Характеристики погрешности установлены по результатам внутрилабораторного эксперимента с использованием эталонного вещества - калия дихромовоокислого ( $K_2Cr_2O_7$ ).

Алгоритм установления характеристик погрешности методики приведен в [приложении Б](#).

### 14.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

Применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы:

- люминоstat с освещением рабочей зоны 2000-3000 лк от ламп дневного света;
- термометр лабораторный по ГОСТ 215, цена деления шкалы 0,1°C;
- микроскоп с кратностью увеличения не менее 400 раз;
- колориметр фотоэлектрический (ФЭК-56 либо КФК-3) или спектрофотометр, или прибор для измерения быстрой или замедленной флуоресценции;
- покровные стекла по [ГОСТ 6672](#);
- предметные стекла по [ГОСТ 9284](#);
- камеру счетную Горяева по ТУ 42-816 или Нажотта по ТУ 64-1-816;
- посуду стеклянную для отбора и хранения проб воды вместимостью 1 дм<sup>3</sup>;
- колбы плоскодонные конические вместимостью 250 см<sup>3</sup> по [ГОСТ 25336](#);
- колбы мерные вместимостью 0,5 и 1,0 дм<sup>3</sup> по [ГОСТ 1770](#), 2-го класса точности;
- пипетки мерные вместимостью от 1 до 10 см<sup>3</sup> по [ГОСТ 29227](#), 2-го класса точности;
- дозаторы пипеточные вместимостью 0,1 и 0,5 см<sup>3</sup> по ТУ 64-1-3326;
- цилиндры мерные вместимостью 0,1; 0,5 и 1,0 дм<sup>3</sup> по [ГОСТ 1770](#), 2-го класса точности;
- вату для изготовления ватно-марлевых пробок;
- марлю для изготовления ватно-марлевых пробок;
- бумагу фильтровальную по [ГОСТ 12026](#);
- фильтры мембранные № 4;
- фильтровальный аппарат;
- воду дистиллированную по [ГОСТ 6709](#);
- воду питьевую по [ГОСТ 2874](#);
- рН-метр;
- прибор для измерения кислорода в воде;
- холодильник, который обеспечивает температуру от 2 до 8 °С;
- шкаф сушильный для стерилизации посуды;

- плитку электрическую по [ГОСТ 14919](#);
- баню водяную;
- спиртовку;
- весы лабораторные общего назначения по [ГОСТ 24104](#), 2-го класса точности с наибольшей массой взвешивания 200 г;
- железо хлорное по [ГОСТ 4147](#);
- калий азотнокислый по [ГОСТ 4217](#);
- калий двуххромовокислый по [ГОСТ 4220](#);
- калий хлористый по [ГОСТ 4234](#);
- кальций хлористый по ТУ 6-09-4711;
- кислоту борную по [ГОСТ 9656](#);
- кобальт хлористый по [ГОСТ 4525](#);
- магний хлористый по [ГОСТ 4209](#);
- марганец хлористый по [ГОСТ 612](#);
- натрий углекислый по [ГОСТ 4201](#);
- натрий сернокислый по [ГОСТ 4166](#);
- натрий фосфорнокислый однозамещенный по [ГОСТ 245](#);
- натрий хлористый по [ГОСТ 4233](#);
- соль морскую профессиональную (Wiegandt, производство Германия).

#### 14.5. Условия выполнения биотестирования

14.5.1. Биотестирование проводят в помещении без вредных испарений и газов при температуре  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , равномерном освещении лампами дневного света с интенсивностью 2000-3000 лк, при естественной смене дня и ночи.

14.5.2. Объем проб воды (водной вытяжки), бурового раствора, раствора вещества (смеси веществ) для определения токсичности должен быть не менее  $1 \text{ дм}^3$ .

14.5.3. Численность клеток водорослей в исходной культуре, подготовленной для биотестирования, должна быть не менее 5 млн. кл/см<sup>3</sup>. Культура должна находиться в экспоненциальной фазе роста.

14.5.4. Начальная численность клеток водорослей в опыте и контроле перед началом биотестирования должна быть не менее 30 тыс. кл/см<sup>3</sup>.

14.5.5. Рабочий объем пробы в контрольных и в опытных колбах составляет 50-100 см<sup>3</sup>. Повторность 3-х кратная.

14.5.6. Результаты учитывают, если численность клеток водорослей в контроле увеличилась за 96 ч биотестирования не менее, чем в 3 раза; ЭК<sub>50</sub> за 96 ч калия двуххромовокислого ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) для культуры водорослей находилась в диапазоне его концентраций 5,8-10,0 мг/дм<sup>3</sup>.

#### 14.6. Подготовка к выполнению биотестирования

14.6.1. Для биотестирования используют лабораторную культуру одноклеточных морских золотистых водорослей *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin.

14.6.2. Лабораторную культуру водорослей выращивают на среде Гольдберга в конических плоскодонных колбах объемов 250-300 см<sup>3</sup> в люминостате с интенсивностью освещения не менее 2000-3000 лк при температуре  $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ .

При культивировании и биотестировании водорослей используют химически чистую стеклянную посуду. Для этого посуду промывают смесью бихромата калия и серной кислоты (хромовой смесью), затем тщательно водопроводной водой и 3-4 раза дистиллированной водой. Посуду, используемую для культивирования и биотестирования, за исключением мерной, стерилизуют в сушильном шкафу при  $160^\circ\text{C}$  в течение 1,5 ч. Не разрешается пользоваться для мытья посуды синтетическими поверхностно-активными веществами и органическими растворителями. Можно пользоваться пищевой содой.

Для приготовления питательной среды Гольдберга в модификации Кабановой (табл. 14.1) сначала готовят исходные растворы солей (№№ 1, 2, 3, 4) на дистиллированной воде в

мерных колбах объемом 100 см<sup>3</sup>. Полученные исходные растворы солей хранят в холодильнике. В случае помутнения растворов их заменяют на свежие.

Чтобы получить питательную среду Гольдберга для культивирования водорослей, в стерильную колбу объемом 2000 см<sup>3</sup> отмеряют 1000 см<sup>3</sup> отфильтрованной морской воды и пастеризуют дважды на водяной бане в течение 20 мин при температуре 80°С. После второй пастеризации в охлажденную воду добавляют необходимое количество исходных растворов №№ 1, 2, 3 в том порядке, как они указаны в таблице 14.1. Полученный раствор снова ставят на водяную баню, пастеризуют 20 мин при температуре 80°С, охлаждают и добавляют раствор № 4.

Таблица 14.1

**Состав питательной среды Гольдберга в модификации Кабановой**

Номер исходного раствора	Реактив	Навеска реактива, г на 100 см <sup>3</sup> дистиллированной воды	Количество (см <sup>3</sup> ) каждого раствора на 1 дм <sup>3</sup> морской воды
1	KNO <sub>4</sub>	10,1	2,0
2	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,421	0,5
3	MnCl <sub>2</sub> * 4H <sub>2</sub> O	0,01979	1,0
	CoCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	0,02379	
4	FeCl <sub>3</sub> * 6H <sub>2</sub> O	0,02703	1,0

Морскую воду для приготовления среды Гольдберга отбирают в условно чистом районе моря, фильтруют через двойной бумажный или мембранный фильтр, аэрируют на протяжении 10 сут. Вместо природной можно использовать искусственную морскую воду (табл. 14.1) или водный раствор профессиональный морской соли (Wiegandt, производство Германия).

Поскольку морская вода в разных морях и отдельных акваториях моря имеет различную соленость, необходимо иметь культуру водорослей, адаптированную к солености воды, подлежащей биотестированию.

Если соленость исходной природной или искусственной морской воды, на которой готовили питательную среду для культуры водорослей, выше, чем соленость анализируемой пробы воды (водной вытяжки), бурового раствора, тогда указанную исходную воду разбавляют дистиллированной водой до необходимой солености и используют ее для приготовления новой питательной среды.

Если культура водорослей выращивалась на среде с меньшей соленостью, чем соленость анализируемой воды, то готовят новую питательную среду, доведя соленость исходной морской воды до более высокой солености, используя соли, указанные в таблице 7.1 или профессиональную морскую соль (Wiegandt, производство Германия).

К новой питательной среде с пониженной (повышенной) соленостью культуру водорослей адаптируют.

Адаптацию водорослей к среде нужной солености проводят постепенно меняя соленость питательной среды по следующей схеме. В стерильную колбу объемом 250 см<sup>3</sup> над пламенем спиртовки наливают 80 см<sup>3</sup> исходной культуры водорослей в экспоненциальной фазе роста (в возрасте 3-х сут.), добавляет 20 см<sup>3</sup> питательной среды необходимой солености и культивируют при указанных условиях. При этом объем адаптируемой культуры составляет 100 см<sup>3</sup>. Через каждые 5 сут меняют соотношение адаптируемой культуры и питательной среды: 60 см<sup>3</sup> адаптируемой культуры и 40 см<sup>3</sup> новой питательной среды; 40 см<sup>3</sup> культуры и 60 см<sup>3</sup> среды; 20 см<sup>3</sup> культуры и 80 см<sup>3</sup> среды. Каждый раз культуру водорослей пересевают в новую стерильную колбу на свежую питательную среду с той соленостью, к которой проводят адаптацию. Через 20 дней адаптацию заканчивают. Затем водоросли пересевают на свежую питательную среду, культивируют 5 сут, после чего проверяют пригодность культуры

к биотестированию по  $K_2Cr_2O_7$ .

Если соленость морской воды отличается от солености питательной среды с культурой водорослей не более, чем на 3-5‰, адаптацию не проводят.

14.6.3. Культивируя водоросли, периодически обновляют культуру, пересевая ее на свежую питательную среду не реже одного раза в 10 дней. Для этого в стерильную колбу объемом 250-300 см<sup>3</sup> со свежей средой объемом 150 см<sup>3</sup> над пламенем спиртовки приливают 15-20 см<sup>3</sup> верхнего слоя исходной культуры (содержимое исходной культуры при этом не перемешивают). Начальная плотность клеток в новой колбе составляет примерно 100-150 тыс. кл/см<sup>3</sup>. В случае ослабления интенсивного роста клеток в культуре, к питательной среде добавляют витамин В<sub>12</sub>.

После посева колбу закрывают стерильной ватно-марлевой пробкой и бумажным колпачком, перемешивают и помещают в люминостат. В процессе культивирования культуру водорослей периодически перемешивают, встряхивая 1-2 раза в сутки.

14.6.4. При биотестировании используют 3-х суточную культуру водорослей, находящуюся в экспоненциальной фазе роста.

Для этого в стерильную колбу со средой Гольдберга объемом 150 см<sup>3</sup> приливают из исходной культуры водорослей верхний слой клеток (около 15-20 см<sup>3</sup>) и колбу ставят в люминостат для подращивания культуры водорослей.

Через 3-е суток подсчитывают численность клеток (которая должна составлять примерно 5 млн. кл/см<sup>3</sup>).

Далее расчетным путем устанавливают, какое количество культуры водорослей необходимо добавить, чтобы получить в опытном и контрольном объеме среды необходимую плотность клеток 30 тыс. кл/см<sup>3</sup> (как правило это 0,5-1 см<sup>3</sup> культуры водорослей).

Для подсчета количества клеток водорослей используют счетную камеру Горяева (или Нажотта). Подсчет в камере Горяева проводят в соответствии с процедурой, описанной в [9.7.2](#).

Количество клеток водорослей в 1 см<sup>3</sup> в опыте и в контроле определяют (п. [9.8.1](#).) по формуле ([9.1](#)).

14.6.5. Периодически (не реже одного раза в месяц) определяют пригодность культуры водорослей к биотестированию. Для этого устанавливают среднюю эффективную концентрацию за 96 ч биотестирования ( $ЭК_{50}$  за 96 ч) эталонного вещества калия двуххромовокислого ( $K_2Cr_2O_7$ ). Готовят исходный раствор  $K_2Cr_2O_7$  с концентрацией 1 г/дм<sup>3</sup>, используя дистиллированную воду. Далее к питательной среде Гольдберга добавляют необходимое количество исходного раствора  $K_2Cr_2O_7$ , то есть готовят серию растворов с концентрациями  $K_2Cr_2O_7$  от 1,0 до 10,0 мг/дм<sup>3</sup> (опыт). Затем в опытные и контрольные колбы (со средой Гольдберга) добавляют культуру водорослей в количестве примерно 0,5 см<sup>3</sup>, что соответствует плотности 30 тыс. кл/см<sup>3</sup>.

Опытные и контрольные образцы биотестируют на протяжении 96 ч в соответствии с процедурой, изложенной в 14.7. На основании полученных результатов рассчитывают  $ЭК_{50}$  за 96 ч двуххромовокислого калия. Если полученная  $ЭК_{50}$  за 96 ч находится в экспериментально установленном диапазоне реагирования тест-объекта, который равен 5,8-10,0 мг/дм<sup>3</sup>  $K_2Cr_2O_7$ , культура водорослей пригодна для биотестирования.

Если  $ЭК_{50}$  за 96 ч не находится в указанном диапазоне реагирования, то проверяют условия культивирования тест-объекта, чтобы выяснить причины ухудшения состояния культуры. При необходимости культуру заменяют.

## 14.7. Выполнение биотестирования

При биотестировании выполняют следующие операции.

14.7.1. В конические колбы вместимостью 250 см<sup>3</sup> наливают по 100 см<sup>3</sup> среды Гольдберга



(контроль), в другие колбы - исследуемые пробы воды (водной вытяжки), бурового раствора(опыт). Заполнение опытных колб (в различных разбавлениях) проводят следующим образом: без разбавления -100 см<sup>3</sup> исследуемой пробы; 50 см<sup>3</sup> исследуемой пробы и 50 см<sup>3</sup> среды Гольдберга (разбавление в 2 раза); 10 см<sup>3</sup> пробы и 90 см<sup>3</sup> среды (разбавление в 10 раз); 1 см<sup>3</sup> пробы и 99 см<sup>3</sup> среды (разбавление в 100 раз); 0,1 см<sup>3</sup> пробы и 99,9 см<sup>3</sup> среды (разбавление в 1000 раз). Повторность в опыте и контроле трехкратная.

В опытные колбы без разбавления исследуемой пробы добавляют растворы исходных питательных солей Гольдберга в порядке расположения их в таблице 14.1 в количестве, соответственно, 0,2; 0,05; 0,1; 0,1 см<sup>3</sup>. Далее, в опытные колбы с разбавлением пробы в 2 раза - добавляют растворы исходных питательных солей по той же схеме, что и выше, но в количестве в 2 раза меньше (соответственно, 0,1; 0,025; 0,05; 0,05 см<sup>3</sup>). При разбавлении исследуемой пробы в 10 раз - добавляют соответственно 0,02; 0,005; 0,01; 0,01 см<sup>3</sup>, а при разбавлениях пробы в 100 и 1000 раз, исходные растворы солей питательной среды Гольдберга не добавляют (их количеством можно пренебречь).

Затем в опытные и контрольные колбы вносят по 0,5 см<sup>3</sup> исходной культуры водорослей *Ph. tricornutum* в экспоненциальной фазе роста численностью около 5 млн. кл/см<sup>3</sup> (при этом численность клеток водорослей в опытных и контрольных колбах будет составлять около 30 тыс.кл/см<sup>3</sup>).

При исследовании растворов различных концентраций вещества (смеси веществ) в конические колбы наливают по 100 см<sup>3</sup> среды Гольдберга (как в контрольные, так и в опытные). В опытные колбы добавляют различные объемы исходного раствора исследуемого вещества (смеси веществ) для создания нужной концентрации и вносят по 0,5 см<sup>3</sup> исходной культуры водорослей *Ph. tricornutum* в экспоненциальной фазе роста численностью 5 млн. кл/см<sup>3</sup>. В контроль кроме водорослей ничего не вносят.

После этого колбы закрывают ватно-марлевыми пробками, встряхивают и помещают в люминостат. Экспонируют, соблюдая условия п. 9.5.1. Содержимое каждой колбы перемешивают один - два раза в сутки.

14.7.2. В начале биотестирования в каждой колбе определяют исходную численность клеток. Исходная численность клеток должна составлять не менее 30 тыс. кл/см<sup>3</sup> - в случае подсчета в счетной камере, и не менее 50 тыс. кл/см<sup>3</sup> - в случае подсчета оптическим методом.

Затем считают численность клеток ежедневно, тщательно перемешивая содержимое колб, в течение 3-х суток в остром опыте и 7-и суток - в хроническом.

Для подсчета численности клеток водорослей используют счетные камеры Нажотта или Горяева (п. 9.7.2).

14.7.3. Допустимо для определения численности клеток использовать фотоэлектродетектор типа ФЭК-56, КФК-3 или спектрофотометр, или прибор для измерения флуоресценции водорослей (быстрой или замедленной) с дальнейшим определением численности клеток по калибровочной кривой.

Построение калибровочной кривой для определения численности клеток водорослей проводят следующим образом. Исходную культуру водорослей последовательно разбавляют питательной средой в 2, 4, 6... n раз. Численность клеток в каждой колбе подсчитывают в счетной камере не менее 3-х раз и вычисляют среднее значение. На фотоэлектродетекторе или спектрофотометре, или приборе для измерения флуоресценции водорослей определяют соответствующую этой численности клеток оптическую плотность или уровень флуоресценции. Как правило, для измерения оптической плотности или флуоресценции водорослей *Ph. tricornutum* используют кюветы 10 мм толщиной (или другие), длина волны измерения оптической плотности на КФК-3 составляет 360 нм.

По результатам измерений строят калибровочную кривую по формуле

$$E = f(N), \quad (14.1)$$

где  $E$  - оптическая плотность;

$N$  - численность клеток в 1 см<sup>3</sup> культуры.

Необходимо учесть, что калибровочная кривая соответствует определенному устройству, кювете, длине волны и культуре.

Периодически, один раз в месяц, необходимо проверять калибровочную кривую.

14.7.4. Через 72 ч или 7 суток биотестирование прекращают. В каждой колбе подсчитывают численность клеток водорослей.

#### 14.8. Обработка и оценка результатов

14.8.1. На основании результатов подсчета клеток в каждой капле определяют численность клеток водорослей (кл/см<sup>3</sup>) в контроле и опыте по формуле

$$X_{k(он)ij} = \frac{m_{k(он)ij}}{nV} \cdot 100, \quad (14.2)$$

где  $m_{k(он)ij}$  - количество подсчитанных водорослей в камере в контроле (опыте) для  $i$ -той капли и  $j$ -го параллельного определения;

$i$  - номер капли суспензии;

$j$  - номер параллельного определения;

$V$  - объем части камеры, имеющей площадь маленького квадрата;

$n$  - количество подсчитанных квадратов.

Для каждого параллельного определения в опыте и контроле вычисляют среднее арифметическое численности водорослей в 1 см<sup>3</sup> по формуле

$$\bar{X}_{k(он)j} = \frac{\sum_{i=1}^I X_{k(он)ij}}{I}, \quad (14.3)$$

где  $I$  - количество капель суспензии.

14.8.2. На основании результатов трех параллельных определений численности клеток водорослей в контроле и опыте находят средние арифметические численности клеток водорослей в контроле (опыте) по формуле

$$X_{k(он)} = \frac{\sum_{j=1}^J \bar{X}_{k(он)j}}{J}, \quad (14.4)$$

где  $J$  - количество параллельных определений численности клеток водорослей в контроле (опыте);  $J = 3$ .

Рассчитывают численность клеток водорослей в опыте в процентах от их численности в контроле по формуле

$$P = \frac{\bar{X}_{он}}{\bar{X}_{к}} \cdot 100, \quad (14.5)$$

где  $P$  - численность клеток водорослей в опыте, %;

$\bar{X}_{он}$  - среднее арифметическое численности клеток водорослей в опыте, кл/см<sup>3</sup>;

$\bar{X}_{к}$  - среднее арифметическое численности клеток водорослей в контроле, кл/см<sup>3</sup>.

14.8.3. Вывод о наличии или отсутствии токсичности анализируемой пробы воды (водной вытяжки), бурового раствора или раствора вещества (смеси веществ) делают на основании величины  $P$ . Анализируемая проба считается токсичной, если величина  $P$  составляет 50% и менее.

14.8.4. Для количественной оценки токсичности пробы воды (водной вытяжки), бурового раствора устанавливают ее среднее эффективное разбавление за 72-96 ч или 7 сут

биотестирования ( $ЭР_{50}$  за 72-96 ч или  $ЭР_{50}$  за 7 сут).

14.8.5. Для количественной оценки токсичности вещества (смеси веществ) устанавливают среднюю эффективную концентрацию за 72 ч или 7 сут биотестирования ( $ЭК_{50}$  за 72 ч или  $ЭК_{50}$  за 7 сут).

14.8.5. Расчет  $ЭР_{50}$  за 72 -96 ч ( $ЭР_{50}$  за 7 сут) или  $ЭК_{50}$  за 72 ч ( $ЭК_{50}$  за 7 сут) проводят в соответствии с [приложением В](#).

#### 14.9. Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности

Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности проводят в объеме 5% от количества текущих измерений.

Контроль воспроизводимости проводят по результатам двух определений токсичности анализируемой пробы воды (водной вытяжки), бурового раствора, водного раствора вещества (смеси веществ) полученных в условиях воспроизводимости ( $ЭР_1$ ,  $ЭР_2$ ) или ( $ЭК_1$ ,  $ЭК_2$ ).

Решение об удовлетворительности воспроизводимости определений принимается при условии:

$$\frac{2|ЭР_1 - ЭР_2|}{ЭР_1 + ЭР_2} \cdot 100\% \leq D,$$

где  $D$  - норматив оперативного контроля воспроизводимости составляет 45%.

### 15. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО ГИБЕЛИ РАКООБРАЗНЫХ ARTEMIA SALINA L.

#### 15.1. Назначение и область применения

Настоящая «Методика...» устанавливает процедуру определения острой летальной токсичности природных морских вод; сточных вод разной солености; буровых растворов, сбрасываемых в морские воды, растворов отдельных веществ и их смесей в морской воде, морских донных отложений (водных вытяжек).

#### 15.2. Принцип методики

15.2.1. Методика основана на установлении различия между количеством погибших личинок артемий - науплиусов в анализируемой пробе (опыт) и воде, которая не содержит токсических веществ (контроль).

15.2.2. Критерием острой летальной токсичности воды (водной вытяжки), раствора вещества (смеси веществ) является гибель 50% науплиусов и более в опыте по сравнению с контролем за 72 ч биотестирования, буровых растворов - за 96 ч биотестирования.

#### 15.3. Характеристики погрешности измерений

Границы, в которых находится относительная погрешность определения токсичности по данной методике с заданной доверительной вероятностью  $P=0,95$ , составляют  $\pm 37\%$ .

Наибольшее возможное значение среднего квадратического отклонения случайной составляющей относительной погрешности определения токсичности по данной методике  $\sigma$  ( $\delta$ ) составляет 13%.

Характеристики погрешности установлены по результатам внутрилабораторного эксперимента с использованием эталонного вещества - калия двуххромовокислого ( $K_2Cr_2O_7$ ).

Алгоритм установления характеристик погрешности методики приведен в [приложении Б](#).

#### 15.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

Применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы:

- лампы дневного света;
- аквариумный микрокомпресс АЭН ТУ 16-064-011;

- оксиметр любого типа с погрешностью измерения не более 0,5 мг O<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>;
- прибор для измерения солености воды;
- рН-метр ГОСТ 25.7416.0171 или аналоги;
- осветитель;
- холодильник, поддерживающий температуру (4±2)°С;
- кристаллизаторы;
- бумагу фильтровальную по [ГОСТ 12026](#);
- бумагу черную;
- пипетки мерные вместимостью 0,1; 1,0, 2,0 и 5,0 см<sup>3</sup> по [ГОСТ 29227](#), 2-го класса точности;
- пипетки пастеровские;
- стаканы химические вместимостью 50, 100 и 500 см<sup>3</sup> по [ГОСТ 25336](#);
- цилиндры мерные вместимостью 0,1; 0,5 и 1,0 см<sup>3</sup> по [ГОСТ 1770](#);
- чашки Петри;
- воду дистиллированную по [ГОСТ 6709](#);
- калий двухромовокислый по [ГОСТ 4220](#);
- калий хлористый по [ГОСТ 4234](#);
- кальций хлористый по ТУ 6-09-4711;
- кислоту борную по [ГОСТ 9656](#);
- магний хлористый по [ГОСТ 4209](#);
- натрий углекислый по [ГОСТ 4201](#);
- натрий сернокислый по [ГОСТ 4166](#);
- натрий хлористый по [ГОСТ 4233](#);
- соль морскую профессиональную (Wiegandt, производство Германия).

### 15.5. Условия выполнения биотестирования

15.5.1. Биотестирование проводят в помещении где не хранят и не работают с химическими веществами, не используют обработку помещений инсектицидами

15.5.2 Биотестирование проводят при температуре 20±2°С, освещении не более 1000 лк, естественном световом периоде.

15.5.3. Объем пробы воды (водной вытяжки), раствора вещества (смеси веществ) должен быть не менее 0,5 дм<sup>3</sup>, бурового раствора - 1,0 дм<sup>3</sup>.

15.5.4. Контрольная природная или искусственная вода должна иметь необходимую соленость, рН 8,0-8,5. До начала биотестирования контрольную воду аэрируют на протяжении 1-2 сут при помощи микрокомпрессора.

15.5.5. Науплиусы артемий для биотестирования должны быть в возрасте до 1 суток.

15.5.6. Плотность посадки науплиусов - 20 экземпляров на объем пробы 40-50 см<sup>3</sup>, при трех - пятикратной повторности.

15.5.7. Результаты биотестирования учитывают, если температура воздуха и пробы воды во время биотестирования составляла (20±2)°С, ЛК<sub>50</sub> за 72ч K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> для науплиусов артемий находилась в диапазоне его концентраций 6,5-8,0 мг/дм<sup>3</sup>, количество погибших науплиусов в контроле не превышало 10 %.

### 15.6. Подготовка к выполнению биотестирования

15.6.1. В качестве тест-объекта используют односуточных науплиусов ракообразных *Artemia salina* L.

Чтобы получить исходный материал для биотестирования 0,1 г сухих яиц артемий помещают в химический стакан объемом 500 см<sup>3</sup> и заливают дехлорированной питьевой водой, которую предварительно отстаивают и аэрируют на протяжении суток. Через 30 мин, не взбалтывая содержимое стакана, сливают слой воды над яйцами, которые осели, удаляя таким образом погибшие яйца и пустые оболочки. Процедуру повторяют не менее трех раз. Затем отмытые яйца заливают морской водой необходимой солености, рН 8,0-8,5, с

концентрацией кислорода не менее  $7 \text{ мг/дм}^3$  и при слабой аэрации выдерживают до выклева. Используют природную морскую воду, которая не содержит токсических веществ, или искусственную морскую воду (согласно п. 4.13 и п. 7.5.5.).

Предварительной адаптации артемий к нужной солености не проводят, так как рачек эвригалинный и может переносить соленость в широком диапазоне.

При аэрации и температуре воды  $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$  выклев науплиусов происходит через 48 ч. При температуре  $25^\circ\text{C}$  - через 24 ч.

Науплиусы артемий в течение 3-4 сут после выклева из яиц не нуждаются в кормлении в связи с эндогенным питанием. Поэтому в эксперименте их не кормят.

15.6.2. Каждую новую партию яиц проверяют на выклев. Используют яйца при выклеве 60-90%. Для получения синхронизованного материала первых науплиусов тщательно отбирают укороченной пастеровской пипеткой, концентрируя их возле одной из стенок направленным источником света (новорожденные науплиусы имеют положительный фототаксис).

За час в стакане накапливаются новые науплиусы, их также переносят при помощи пипетки в отдельный сосуд с морской водой и используют для биотестирования.

15.6.3. Односуточных науплиев проверяют на пригодность к биотестированию. Для этого устанавливают среднюю летальную концентрацию за 72 ч биотестирования ( $\text{ЛК}_{50}$  за 72 ч) эталонного вещества калия двуххромовокислого ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ). Готовят исходный раствор  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  с концентрацией  $1 \text{ г/дм}^3$ , используя дистиллированную воду. Далее готовят серию растворов  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  с концентрациями от 4,0 до  $10,0 \text{ мг/дм}^3$ , используя контрольную природную (из условно чистого района) или искусственную морскую воду. Биотестирование этих растворов проводят продолжительностью 72 ч в соответствии с процедурой, изложенной в 15.7. На основании полученных результатов рассчитывают  $\text{ЛК}_{50}$  за 72 ч для  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ . Если найденная  $\text{ЛК}_{50}$  за 72 ч находится в диапазоне реагирования тест-объекта, который равен 6,5-8,0  $\text{мг/дм}^3$   $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , науплиусы пригодны для биотестирования (существуют разные по чувствительности рассы артемий).

Если  $\text{ЛК}_{50}$  за 72 ч  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  не находится в указанном диапазоне реагирования, проверяют науплиусов артемий из новой порции яиц той же партии, или заменяют партию яиц.

### 15.7. Выполнение биотестирования

При биотестировании выполняют следующие операции.

15.7.1. В чашки Петри наливают по  $40 \text{ см}^3$  различных разбавлений исследуемых проб воды (водной вытяжки), бурового раствора или различные концентрации раствора вещества (смеси веществ) и контрольную воду.

15.7.2. В каждый из контрольных и опытных сосудов пастеровской пипеткой помещают по 20 науплиусов в возрасте до 1 сут. Повторность в контроле и опыте трехкратная. Контролем служит природная или искусственная морская вода необходимой солености.

15.7.3. Продолжительность биотестирования составляет 72 ч. На протяжении этого времени науплиусов не кормят. Биотестирование буровых растворов проводят 96 ч.

15.7.4. Подсчет науплиусов, которые выжили в контроле и опыте, проводят визуально на лабораторном столе под биноклем МБС - 9 или МБС - 10.

15.7.5. Особей считают живыми, если они свободно двигаются в толще воды или находятся вблизи дна, но при этом не перестают интенсивно двигать конечностями. Мертвых науплиусов удаляют.

### 15.8. Обработка и оценка результатов

15.8.1. На основании результатов трех параллельных определений количества живых науплиусов артемий в контроле и опыте находят средние арифметические количества живых науплиусов артемий в контроле (опыте) по формуле

$$\bar{X}_{k(on)} = \frac{\sum_{i=1}^I X_{k(on)i}}{I}, \quad (15.1).$$

где:  $\bar{X}_{k(on)}$  - результат  $i$ -го измерения количества живых науплиусов артемий в контроле (опыте);

$i$  - номер измерения количества живых науплиусов артемий в контроле (опыте);

$I$  - количество параллельных измерений количества живых науплиусов артемий в контроле (опыте);  $I = 3$ .

Рассчитывают в процентах количество погибших науплиусов артемий в опыте по отношению к контролю по формуле

$$A = \frac{\bar{X}_k - \bar{X}_{on}}{\bar{X}_k} \cdot 100. \quad (15.2)$$

15.8.2. Вывод о наличии или отсутствии острой летальной токсичности пробы воды (водной вытяжки), бурового вещества или раствора вещества (смеси веществ) делают на основании величины  $A$ . Если величина  $A$  составляет 50% науплиусов и более, считают, что проба воды (водная вытяжка), буровой раствор или раствор вещества (смеси веществ) проявляет острую летальную токсичность. В этом случае для количественной оценки токсичности анализируемой пробы устанавливают ее среднее летальное разбавление за 72-96 ч биотестирования ( $LP_{50}$  за 72-96 ч).

Для количественной оценки токсичности вещества (смеси веществ) устанавливают среднюю летальную концентрацию вещества (смеси веществ) за 72 ч биотестирования ( $LK_{50}$  за 72 ч).

15.8.3. Установление  $LK_{50}$  за 72 ч ( $LP_{50}$  за 72-96 ч) проводят в соответствии с [приложением В](#).

### 15.9. Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности

Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности проводят в объеме 5% от количества текущих измерений.

Контроль воспроизводимости проводят по результатам двух определений токсичности анализируемой пробы воды (водной вытяжки), бурового раствора или водного раствора вещества (смеси веществ), полученных в условиях воспроизводимости ( $LP_1$ ,  $LP_2$  или  $ЭК_1$ ,  $ЭК_2$ ).

Решение об удовлетворительности воспроизводимости определений принимается при условии:

$$\frac{2|LP_1 - LP_2|}{LP_1 + LP_2} \cdot 100\% \leq D,$$

где  $D$  - норматив оперативного контроля воспроизводимости составляет 45%.

## 16. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО ГИБЕЛИ РЫБ ROESILLIA RETICULATA PETERS

### 16.1. Назначение и область применения

Настоящая «Методика...» устанавливает процедуру определения острой летальной токсичности природных морских вод; сточных вод разной солености; буровых растворов, сбрасываемых в морские воды, растворов отдельных веществ и их смесей в морской воде, морских донных отложений (водных вытяжек).

### 16.2. Принцип методики

16.2.1. Методика основана на установлении различия между количеством погибших рыб в

анализируемой пробе (опыт) и воде, которая не содержит токсических веществ (контроль) - природная морская вода из условно чистого района или искусственная морская вода (п. 7.5.5).

16.2.2. Критерием острой летальной токсичности является гибель 50% рыб и более в опыте по сравнению с контролем за 96 ч биотестирования.

### 16.3. Характеристики погрешности измерений

Границы, в которых находится относительная погрешность определения токсичности по данной методике с заданной доверительной вероятностью  $P=0,95$ , составляют 30%.

Наибольшее возможное значение среднего квадратического отклонения случайной составляющей относительной погрешности определения токсичности по данной методике  $\sigma$  ( $\delta$ ) составляет 15%.

Характеристики погрешности установлены по результатам внутрилабораторного эксперимента с использованием эталонного вещества - калия двуххромовоокислого ( $K_2Cr_2O_7$ ).

Алгоритм установления характеристик погрешности методики приведен в [приложении Б](#).

### 16.4. Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, реактивы

Применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы:

- аквариумы вместимостью 50 и 200 дм<sup>3</sup>;
- прибор для аэрации воды воздухом;
- прибор для измерения концентрации кислорода в воде (оксиметр);
- прибор для измерения солености воды;
- рН-метр;
- приспособление для термостатирования;
- весы лабораторные по [ГОСТ 24104](#), 2-го класса точности с наибольшей массой взвешивания 200 г;
- термометр по [ГОСТ 112](#) с ценой деления шкалы 1°С;
- холодильник, поддерживающий температуру (4±2)°С;
- колбы мерные вместимостью 0,5 и 1,0 дм<sup>3</sup> по [ГОСТ 1770](#), 2-го класса точности;
- бумагу фильтровальную по [ГОСТ 12026](#);
- пипетки мерные вместимостью от 1 до 10 см<sup>3</sup> по [ГОСТ 29227](#), 2-го класса точности;
- посуду для транспортирования и хранения проб воды вместимостью 5 дм<sup>3</sup>;
- сачок для отлова рыбы;
- стеклянную палочку;
- цилиндры мерные вместимостью 0,1; 0,5 и 1,0 дм<sup>3</sup> по [ГОСТ 1770](#), 2-го класса точности;
- калий двуххромовоокислый по [ГОСТ 4220](#);
- калий хлористый по [ГОСТ 4234](#);
- кальций хлористый по ТУ 6-09-4711;
- кислоту борную по [ГОСТ 9656](#);
- магний хлористый 6-водный по [ГОСТ 4209](#);
- натрий углекислый по [ГОСТ 4201](#);
- натрий серноокислый по [ГОСТ 4166](#);
- натрий хлористый по [ГОСТ 4233](#).

### 16.5. Условия выполнения биотестирования

16.5.1. Биотестирование проводят в помещении без вредных испарений и газов при рассеянном свете, естественной смене дня и ночи.

16.5.2. Объем пробы для определения острой летальной токсичности должен быть не менее 30 дм<sup>3</sup>.

16.5.3. Температура пробы воды (водной вытяжки), бурового раствора, водного раствора вещества (смеси веществ) при биотестировании должна равняться (25±1)°С, концентрация растворенного кислорода должна быть не менее 4 мг/дм<sup>3</sup>. Если концентрация растворенного кислорода меньше, воду аэрируют микрокомпрессором.

16.5.4. Для контроля и разбавления проб используют природную (из условно чистого района) или искусственную морскую воду (п. 7.5.5.).

16.5.5. Мальки гуппи должны находиться в возрасте 24- 48 ч.

16.5.6. Плотность посадки - 10 экземпляров рыб на 5 дм<sup>3</sup>. Повторность трехкратная.

16.5.7. Результаты учитывают, если при биотестировании концентрация растворенного кислорода была не менее 4 мг/дм<sup>3</sup>, температура пробы во время биотестирования составляла (24±1)°С, количество погибших рыб в контроле не превышало 10%, ЛК<sub>50</sub> за 96 ч калия двухромовокислого (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) для культуры гуппи находилась в интервале его концентраций 45-60 мг/дм<sup>3</sup>

## 16.6. Подготовка к выполнению биотестирования

16.6.1. В качестве тест-объекта используют культуру гуппи - *Poecilia reticulata* Peters в возрасте не старше 2 суток (24-48 ч).

Гуппи - широко распространенная аквариумная живородящая рыба. Выдерживает значительные колебания солености. Для биотестирования используют гуппи, адаптированных к различной солености. Изменение солености от 0 до 20‰ гуппи переносят без адаптации. Постепенная адаптация к океанической солености занимает около двух недель (через два - три дня рыб переводят в воду с соленостью на 2-3‰ выше).

Для содержания (культивирования) гуппи используют термостатированные аквариумы, обеспечивающие плотность посадки тест-объектов из расчета 1-2 дм<sup>3</sup> воды на 1 экземпляр, производителей - не менее 4 дм<sup>3</sup> на 1 экземпляр.

Аквариум заполняют отстоянной и проаэрированной в течение 7 сут природной или искусственной морской водой необходимой солености, рН 8,0-8,5, температура 25-27°С. Каждые три дня часть воды (1/4-1/5 часть) заменяют свежей. Первоначальный объем воды в аквариумах поддерживают, доливая дистиллированную воду вместо испарившейся и контролируя соленость с помощью солемера. Ил со дна аквариума убирают регулярно при помощи сифона.

Кроме рыб, в аквариум можно помещать зеленую водоросль рода энтероморфа, которая при хорошем освещении хорошо развивается и служит для гуппи укрытием и кормом.

Кормят гуппи 1-2 раза в сутки, производителей чаще, сухим (дафнии, циклопы) или живым кормом (мотыль, трубочник, дафнии, циклопы). Корм вносят в таком количестве, чтобы рыбы съедали его без остатка за 3-5 мин, так как излишки приводят к ухудшению качества воды в аквариуме. Особенно осторожно следует кормить рыб живыми дафниями и циклопами, которые в морской воде быстро погибают и могут служить источником сильного загрязнения.

Самцов и самок рекомендуют содержать в отдельных аквариумах. При совместном содержании самцы растут медленнее и имеют меньшие размеры. Половозрелые гуппи имеют хорошо развитые половые признаки, что облегчает их сортировку. Самцы, как правило, мельче (3-4 см) и имеют более яркую окраску, чем самки. У них преобладают серовато-коричневые тона с очень яркими красными, голубыми, зелеными и черными пятнами. Самки больше самцов, до 6 см в длину, чаще желтовато-зеленые. Анальный плавник у самок округлый. У молодых самцов он имеет ту же форму, но со временем, в период полового созревания, он начинает удлиняться и превращается в подвижный гоноподий.

Для получения молоди отбирают производителей не старше двух лет (продолжительность жизни гуппи в аквариумных условиях 3-3,5 года) и за три дня до постановки опытов помещают в общий аквариум для спаривания. Соотношение самцов и самок 2:1. Необходимо учитывать, что однажды оплодотворенная самка может нереститься несколько раз.

Самку готовят к нересту, помещая в отдельную термостатированную нерестовую емкость объемом не менее 4 дм<sup>3</sup>. Готовность самки к вымету мальков определяют по наличию хорошо заметного темного пятна перед анальным плавником. При этом форма брюшка приближается к прямоугольной и оно становится намного шире спины. После окончания нереста самок изолируют, так как они поедают потомство.

Мальки рождаются совершенно сформированными. Лучшим кормом для них является «пыль», состоящая из представителей разных морских организмов: инфузорий, коловраток,



молоди ветвистоусых рачков и науплиусов веслоногих рачков. При отсутствии «пыли» молодь гуппи кормят перетертыми сухими дафниями или любым другим измельченным сухим кормом. На 100 рыб вносят не более 1 г сухого корма. По мере роста в рацион рыб вводят измельченный трубочник, мотыль, и другой живой корм. Одно-, двухнедельных мальков кормят до 5 раз в сутки, более взрослых 2-3 раза. Вносимые порции корма должны быть небольшими и поедаться рыбами в течение 3-5 мин.

Мальков сортируют по размерам и постепенно переводят из нерестовых аквариумов в выростные (вначале объемом 50 дм<sup>3</sup>, а затем - 200 дм<sup>3</sup>). С появлением первых признаков половых различий самцов отделяют от самок и продолжают выращивать в отдельных аквариумах. Мальки становятся половозрелыми в 4-6 месяцев.

При солености от 0 до 18-20 ‰ особых трудностей с выращиванием и размножением гуппи не возникает. Для тестирования морских вод с более высокой соленостью целесообразно получать исходный материал в пресной воде (или воде с соленостью до 18-20‰) с последующей адаптацией к более высокой солености.

16.6.2. Мальков гуппи в возрасте 24-48 ч проверяют на пригодность для биотестирования.

Для этого устанавливают среднюю летальную концентрацию за 96 ч биотестирования (ЛК<sub>50</sub> за 96 ч) раствора эталонного вещества калия двуххромовокислого (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>). Для этого готовят исходный раствор K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> с концентрацией 10 г/дм<sup>3</sup>, используя дистиллированную воду. Далее из исходного раствора готовят серию растворов с концентрациями K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> от 100 до 200 мг/дм<sup>3</sup> с интервалом 25 мг/дм<sup>3</sup>, используя природную или искусственную морскую воду. Биотестирование этих растворов проводят продолжительностью 96 ч в соответствии с процедурой, изложенной в 16.7. На основании полученных результатов рассчитывают ЛК<sub>50</sub> за 96 ч калия двуххромовокислого.

Если полученная величина ЛК<sub>50</sub> за 96 ч находится в экспериментально установленном диапазоне реагирования тест-объекта 45-60 мг/дм<sup>3</sup> K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, гуппи пригодны для биотестирования.

Если ЛК<sub>50</sub> за 96 ч K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> не находится в указанном диапазоне реагирования, то проверяют условия культивирования тест-объекта, чтобы выяснить причины ухудшения состояния культуры.

## 16.7. Выполнение биотестирования

16.7.1. Разбавления пробы воды (водной вытяжки), бурового раствора, исходного раствора вещества (смеси веществ) проводят прибавлением определенного объема исследуемой пробы воды (водной вытяжки), бурового раствора или исходного раствора вещества (смеси веществ) в природную или искусственную морскую воду определенной солености.

16.7.2. Анализируемую пробу наливают в аквариумы по 5 дм<sup>3</sup> (опыт). Другие аквариумы наполняют таким же объемом природной или искусственной морской воды (контроль). Повторность в опыте и контроле трехкратная.

16.7.3. В каждый из опытных и контрольных аквариумов помещают по 10 экземпляров гуппи в возрасте от 24 до 48 ч.

16.7.4. Продолжительность биотестирования составляет 96 ч. Во время биотестирования рыб не кормят.

16.7.5. Ежедневно подсчитывают количество живых рыб и удаляют погибших. Погибшими считают рыб, которые не подадут признаков движения или дыхания при прикосновении к ним стеклянной палочки.

## 16.8. Обработка и оценка результатов

16.8.1. На основании результатов трех параллельных определений количества живых рыб в контроле и опыте находят средние арифметические количества живых рыб в контроле (опыте) по формуле

$$\bar{X}_{k(on)} = \frac{\sum_{i=1}^I X_{k(on)i}}{I}, \quad (16.1)$$

где:  $\bar{X}_{k(on)}$  - результат  $i$ -го измерения количества живых рыб в контроле (опыте);

$i$  - номер измерения количества живых рыб в контроле (опыте);

$I$  - количество параллельных измерений количества живых рыб в контроле (опыте);  $I=3$ .

Рассчитывают в процентах количество погибших рыб в опыте по отношению к контролю по формуле

$$A = \frac{\bar{X}_k - \bar{X}_{on}}{\bar{X}_k} \cdot 100. \quad (16.2)$$

16.8.2. Вывод о наличии или отсутствии острой летальной токсичности пробы воды (водной вытяжки), бурового раствора или раствора вещества (смеси веществ) делают на основании величины  $A$ . Если величина  $A$  составляет 50% рыб и более, считают, что проба воды (водная вытяжка), бурового раствора или раствор вещества (смеси веществ) проявляет острую летальную токсичность. В этом случае для количественной оценки токсичности пробы воды (водной вытяжки), бурового раствора устанавливают ее среднее летальное разбавление за 96 ч биотестирования ( $ЛР_{50}$  за 96 ч).

Для количественной оценки токсичности вещества (смеси веществ) устанавливают среднюю летальную концентрацию вещества (смеси веществ) за 96 ч биотестирования ( $ЛК_{50}$  за 96 ч).

16.8.3. Расчет  $ЛК_{50}$  за 96 ч ( $ЛР_{50}$  за 96 ч) проводят в соответствии с [приложением В](#).

### 16.9. Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности

Контроль воспроизводимости результатов определения токсичности проводят в объеме 5% от количества текущих измерений.

Контроль воспроизводимости проводят по результатам двух определений токсичности пробы воды (водной вытяжки), бурового раствора, водного раствора вещества (смеси веществ), полученных в условиях воспроизводимости  $ЛР_1$ ,  $ЛР_2$  или  $ЛК_1$ ,  $ЛК_2$  или  $ЛР_1$   $ЛР_2$ .

Решение об удовлетворительности воспроизводимости определений принимается при условии:

$$\frac{2|ЛР_1 - ЛР_2|}{ЛР_1 + ЛР_2} \cdot 100\% \leq D,$$

где  $D$  - норматив оперативного контроля воспроизводимости составляет 52%.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

### Приложение А

#### Термины и определения

В настоящем Руководстве используются следующие термины и определения.

**Биологическое тестирование воды (водной вытяжки раствора химического вещества)** - экспериментальное определение токсичности воды (водной вытяжки, раствора химического вещества) по изменению определенного показателя жизнедеятельности тест-объекта.

**Воспроизводимость результатов биотестирования** - характеристика качества биотестирования, отражающая близость результатов, полученных по одной методике, на одном и том же эталонном веществе, но в различных условиях (разными операторами или в разных лабораториях, или в разное время).

**Диапазон реагирования тест-объекта** - нормированный интервал концентраций, в

котором находится средняя летальная или средняя эффективная концентрация эталонного вещества.

**Загрязняющее воду вещество, загрязняющее вещество** - вещество в воде, вызывающее нарушение норм качества воды. [ГОСТ 17.1.1.01-77](#).

**Исходный раствор** - концентрированный водный раствор исследуемого вещества, из которого готовят растворы с разными концентрациями этого вещества.

**Качество воды** - характеристика состава и свойств воды, определяющая ее пригодность для конкретных видов водопользования. [ГОСТ 17.1.1.01-77](#).

**Концентрация средняя летальная (ЛК<sub>50</sub>)** - концентрация токсического вещества, вызывающая гибель 50 % тест-объекта при установленных условиях экспозиции в течение заданного срока наблюдений.

**Концентрация средняя эффективная (ЭК<sub>50</sub>)** - концентрация токсического вещества, вызывающая изменение тест-реакции на 50 % при установленных условиях экспозиции в течение заданного срока наблюдений.

**Критерий токсичности** - установленное значение изменения выбранного показателя жизнедеятельности тест-объекта, на основании которого делают вывод о токсичности тестируемого объекта.

**Острая токсичность** - токсичность воды (водной вытяжки, раствора химического вещества), проявляющаяся вследствие кратковременного воздействия токсического вещества.

**Острая летальная токсичность воды** - летальная токсичность воды, (водной вытяжки, раствора химического вещества), обусловленная кратковременным воздействием токсического вещества.

**Показатель жизнедеятельности водного организма** - морфологическая, физиологическая, биохимическая или другая характеристика состояния водного организма.

**Предельно допустимый сброс** - масса вещества в сточных водах, максимально допустимая к отведению с установленным режимом в данном пункте водного объекта в единицу времени с целью обеспечения норм качества воды в контрольном пункте. [ГОСТ 17.1.1.01-77](#).

**Сточная вода** - вода, сбрасываемая в установленном порядке в водные объекты после ее использования или поступившая с загрязненной территории. Водный кодекс Российской Федерации, ст. 1.

**Сходимость результатов биотестирования** - характеристика качества биотестирования, которая отражает близость результатов, полученных по одной методике, на одном и том же эталонном веществе, в одинаковых условиях (в одной лаборатории, одним и тем же оператором, в одно и то же время).

**Тест-объект** - водный(ые) организм(ы), чувствительный(е) к действию токсических веществ и специально подготовленный(е) в лабораторных условиях к биотестированию.

**Тест-реакция** - изменение выбранного показателя жизнедеятельности тест-объекта под воздействием токсического вещества.

**Токсическое вещество** - вещество, способное в определенной концентрации вызывать патологические изменения или гибель водных организмов.

**Токсичность** - свойство воды (водной вытяжки, раствора химического вещества), обусловленное наличием в ней токсических веществ и характеризующее ее способность нарушать жизнедеятельность водных организмов.

**Токсический эффект** - результат воздействия токсиканта на водный организм, проявляющийся в изменении показателей его жизнедеятельности.

**Уровень токсичности воды (водной вытяжки, раствора химического вещества)** - количественная характеристика токсичности воды (водной вытяжки, раствора химического вещества), определяемая через минимальную кратность разбавления, при котором токсичность воды уже не проявляется.

## Приложение Б

### Алгоритм установления характеристик погрешности методик биотестирования

Метрологические характеристики методик биотестирования устанавливают в ходе экспериментальных исследований в соответствии с требованиями методики на растворах эталонных веществ с известными токсическими свойствами.

Для установления метрологических характеристик методик биотестирования в условиях межлабораторного эксперимента в каждой из лабораторий-участниц ( $K$  - количество лабораторий-участниц) каждым из исполнителей ( $L_k$  - количество исполнителей в  $k$ -той лаборатории) получают серии из  $N_{kl}$  результатов  $X_{kln}$  в условиях сходимости на каждом из эталонных веществ.

Б.1. Сходимость устанавливают по  $N_{kl}$  результатам каждой из  $KL$  серий самостоятельных экспериментов, проведенных в каждой из  $K$  лабораторий каждым из  $L$  исполнителей, для чего эти результаты проверяют на наличие грубой погрешности по одному из известных критериев. Результаты с грубой погрешностью отбрасывают и по оставшимся данным вычисляют значение среднего результата  $\bar{X}_{kl}$  и его среднее квадратичное отклонение (СКО) по формулам

$$\bar{X}_{kl} = \frac{\sum_{n=1}^{N_{kl}} X_{kln}}{N_{kl}}, \quad (\text{Б.1})$$

$$S_{kl} = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^{N_{kl}} (X_{kln} - \bar{X}_{kl})^2}{N_{kl} - 1}}, \quad (\text{Б.2})$$

$$f_{kl} = N_{kl} - 1, \quad (\text{Б.3})$$

где  $k$  - номер лаборатории-участницы межлабораторного эксперимента,  $k=1, \dots, K$ ;

$l$  - номер исполнителя (серии),  $l = 1, \dots, L_k$  ( $L > 2$ );

$n$  - номер эксперимента в серии,  $n = 1, \dots, N_{kl}$ ;

$X_{kln}$  - результат эксперимента  $n$  в серии  $l$  лаборатории  $k$ ;

$f_{kl}$  - число степеней свободы, по которым вычисляют значение  $S_{kl}$ .

Полученные значения выборочных СКО проверяют на соответствие одной генеральной совокупности с помощью критерия Фишера. Для чего рассчитывают величину  $F_{kl}$  по формуле

$$F_{kl} = \frac{(S_{kl})_{\max}^2}{(S_{kl})_{\min}^2} \quad (\text{Б.4})$$

и сравнивают ее с табличным значением критерия Фишера для соответствующего числа степеней свободы. Значения  $F_{табл.}$  приведены в таблице Б.1.

Если  $F_{kl} > F_{табл.}$  то соответствующее СКО  $(S_{kl})_{\max}$  или  $(S_{kl})_{\min}$ , которое приводит к превышению  $F_{kl}$  над  $F_{табл.}$ , из дальнейших расчетов исключают. Процедуру сравнения  $(S_{kl})_{\max}$   $(S_{kl})_{\min}$  осуществляют до тех пор, пока не будет справедливым  $F_{kl} < F_{табл.}$

Причем общее количество результатов (после отбрасывания результатов с грубой погрешностью) должно удовлетворять условию

$$\sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} N_{kl} \geq 16.$$

Далее все не исключенные по критерию Фишера выборки результатов полагают однородными и по ним вычисляют СКО, которое характеризует сходимость результатов, по формулам

$$\bar{X} = \frac{\sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} f_{kl} \bar{X}_{kl}}{\sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} f_{kl}}, \quad (\text{Б.5})$$

$$S_{cx} = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} f_{kl} S_{kl}^2}{\sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} f_{kl}}}, \quad (\text{Б.6})$$

$$f = \sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} (N_{kl} - 1). \quad (\text{Б.7})$$

Таблица Б.1

**Значения  $F$  в зависимости от степеней свободы  $f_1$  и  $f_2$  для  $P=0,95$**

$f_2$	$f_1=2$	4	8	12	16	20	24	50	$\infty$
2	19,0	19,2	19,4	19,4	19,4	19,4	19,4	19,5	19,5
4	6,9	6,4	6,0	5,9	5,8	5,8	5,8	5,7	5,6
6	5,1	4,5	4,2	4,0	3,9	3,9	3,8	3,8	3,7
8	4,5	3,8	3,4	3,3	3,2	3,2	3,1	3,0	2,9
10	4,1	3,5	3,1	2,9	2,8	2,8	2,7	2,6	2,5
12	3,9	3,3	2,8	2,7	2,6	2,5	2,5	2,4	2,3
14	3,7	3,1	2,7	2,5	2,4	2,4	2,4	2,2	2,1
16	3,6	3,0	2,6	2,4	2,3	2,3	2,2	2,1	2,0
18	3,6	2,9	2,5	2,3	2,2	2,2	2,2	2,0	1,9
20	3,5	2,9	2,4	2,3	2,2	2,1	2,1	2,0	1,8
30	3,3	2,7	2,3	2,1	2,0	1,9	1,9	1,8	1,6
60	3,2	2,5	2,1	1,9	1,8	1,8	1,7	1,6	1,4
120	3,1	2,4	2,0	1,8	1,7	1,6	1,6	1,4	1,2
	3,0	2,4	1,9	1,8	1,6	1,6	1,5	1,4	1,0

Для равного количества экспериментов  $N$  в каждой из  $L$  серий формулы (Б.5)-(Б.7) соответственно переходят в следующие:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} \bar{X}_{kl}}{KL},$$

$$S_{cx} = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} S_{kl}^2}{KL}},$$

$$f = KL(N - 1).$$

Сходимость  $\sigma_{cx}(\overset{\circ}{\Delta})$  или  $\sigma_{cx}(\overset{\circ}{\delta})$  методики биотестирования на данном эталонном веществе рассчитывают по формулам

$$\begin{aligned}\sigma_{cx}(\overset{\circ}{\Delta}) &= S_{cx} \cdot \gamma(f), \\ \sigma_{cx}(\overset{\circ}{\delta}) &= \frac{S_{cx} \cdot \gamma(f)}{\bar{X}} \cdot 100,\end{aligned}\tag{Б.8}$$

где  $\gamma(f)$  - коэффициент, учитывающий смещенность оценки СКО.

Значения коэффициента  $\gamma(f)$  приведены в таблице Б.2.

Подобные вычисления выполняют для каждого эталонного вещества. По вычисленным значениям сходимости (в процентах) на разных эталонных веществах устанавливают

сходимость методики биотестирования  $\sigma_{cx}^*(\overset{\circ}{\delta})$ . Причем, если проверка по критерию Фишера показала однородность соответствующих СКО, то сходимость методики биотестирования вычисляют как средневзвешенное значений сходимости на эталонных веществах по формуле

$$\sigma_{cx}^*(\overset{\circ}{\delta}) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I f_i \sigma_{cx}^2(\overset{\circ}{\delta})}{\sum_{i=1}^I f_i}},\tag{Б.9}$$

где  $i$  - номер эталонного вещества,  $i = 1, \dots, I$ ;

$I$  - количество эталонных веществ.

Если проверка по критерию Фишера показала неоднородность соответствующих СКО, то за сходимость методики биотестирования принимают наибольшее из вычисленных значений сходимости на эталонных веществах.

Б.2. Для оценивания внутрилабораторной воспроизводимости вычисляют средние значения для каждой из  $K$  лабораторий и соответствующие СКО по формулам

$$\bar{X}_k = \frac{\sum_{l=1}^{L_k} \sum_{n=1}^{N_{kl}} X_{kln}}{\sum_{l=1}^{L_k} N_{kl}},\tag{Б.10}$$

$$S_k = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^{L_k} \sum_{n=1}^{N_{kl}} (X_{kln} - \bar{X}_k)^2}{\sum_{l=1}^{L_k} N_{kl} - 1}},\tag{Б.11}$$

$$f_k = \sum_{l=1}^{L_k} N_{kl} - 1.\tag{Б.12}$$

Полученные значения выборочных СКО проверяют на соответствие одной генеральной выборке по критерию Фишера и по не исключенным данным вычисляют СКО, которое характеризует внутрилабораторную воспроизводимость, по формулам

$$\bar{X} = \frac{\sum_{k=1}^K f_k \bar{X}_k}{\sum_{k=1}^K f_k}, \quad (\text{Б.13})$$

$$S_{\text{вн}} = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^K f_k S_k^2}{\sum_{k=1}^K f_k}}, \quad (\text{Б.14})$$

$$f = \sum_{k=1}^K f_k = \sum_{k=1}^K \left( \sum_{l=1}^{L_k} N_{kl} - 1 \right). \quad (\text{Б.15})$$

Таблица Б.2

**Значения  $\gamma(f)$  в зависимости от числа степеней свободы**

$f$	$\gamma(f)$	$f$	$\gamma(f)$
1	1,253	15	1,017
2	1,128	16	1,016
3	1,085	17	1,015
4	1,064	18	1,014
5	1,051	19	1,013
6	1,042	20	1,013
7	1,037	25	1,010
8	1,032	30	1,008
9	1,028	35	1,007
10	1,025	40	1,006
11	1,023	45	1,006
12	1,021	50	1,005
13	1,019	60	1,004
14	1,018		

При условии равного количества данных в сериях формулы (Б.13)-(Б.15) трансформируются в следующие:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{k=1}^K \bar{X}_k}{K},$$

$$S_{\text{вн}} = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^K S_k^2}{K}},$$

$$f = KL(N - 1).$$

Внутрилабораторную воспроизводимость  $\sigma_{\text{вн}}(\overset{\circ}{\Delta})$  или  $\sigma_{\text{вн}}(\overset{\circ}{\delta})$  методики биотестирования

на данном эталонном веществе рассчитывают по формулам

$$\begin{aligned}\sigma_{\text{эл}}\left(\overset{\circ}{\Delta}\right) &= S_{\text{эл}}\gamma(f), \\ \sigma_{\text{эл}}\left(\overset{\circ}{\delta}\right) &= \frac{S_{\text{эл}}\gamma(f)}{\bar{X}} \cdot 100.\end{aligned}\quad (\text{Б.16})$$

Подобные вычисления выполняют для каждого из эталонных веществ. По вычисленным значениям внутрилабораторной воспроизводимости (в процентах) на разных эталонных веществах устанавливают внутрилабораторную воспроизводимость методики

биотестирования  $\sigma_{\text{сх}}^*\left(\overset{\circ}{\delta}\right)$ . Причем, если проверка по критерию Фишера показала однородность соответствующих СКО, то внутрилабораторную воспроизводимость методики биотестирования вычисляют как средневзвешенное значений внутрилабораторной воспроизводимости на эталонных веществах по формуле

$$\sigma_{\text{эл}}^* = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I f_i \sigma_{\text{эл}}^2\left(\overset{\circ}{\delta}\right)}{\sum_{i=1}^I f_i}}, \quad (\text{Б.17})$$

где  $i$  - номер эталонного вещества,  $i = 1, \dots, I$ ;

$I$  - количество эталонных веществ.

Если проверка по критерию Фишера показала неоднородность соответствующих СКО, то за внутрилабораторную воспроизводимость методики биотестирования принимают наибольшее из вычисленных значений внутрилабораторной воспроизводимости на эталонных веществах.

Б.3. Для оценивания межлабораторной воспроизводимости вычисляют среднее значение  $\bar{X}$  по всем лабораториям и соответствующее СКО по формуле

$$\bar{X} = \frac{\sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} \sum_{n=1}^{N_{kl}} X_{kln}}{\sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} N_{kl}}, \quad (\text{Б.18})$$

$$S_{\text{мл}} = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} \sum_{n=1}^{N_{kl}} (X_{kln} - \bar{X})^2}{\sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} N_{kl} - 1}}, \quad (\text{Б.19})$$

$$f = \sum_{k=1}^K \sum_{l=1}^{L_k} N_{kl} - 1. \quad (\text{Б.20})$$

Межлабораторную воспроизводимость  $\sigma_{\text{мл}}\left(\overset{\circ}{\Delta}\right)$  или  $\sigma_{\text{мл}}\left(\overset{\circ}{\delta}\right)$  методики биотестирования на данном эталонном веществе вычисляют по формулам

$$\sigma_{\text{мл}}\left(\overset{\circ}{\Delta}\right) = S_{\text{мл}}\gamma(f),$$



$$\sigma_{мл} \left( \overset{\circ}{\delta} \right) = \frac{S_{мл} \gamma(f)}{\bar{X}} \cdot 100. \quad (\text{Б.21})$$

Погрешность определения токсичности по методике биотестирования вычисляют по формуле

$$\delta = 1,96 \cdot \sigma_{мл} \left( \overset{\circ}{\delta} \right) \quad (\text{Б.22})$$

Подобные вычисления выполняют для каждого из эталонных веществ. По вычисленным значениям межлабораторной воспроизводимости (в процентах) на разных эталонных веществах устанавливают межлабораторную воспроизводимость методики биотестирования

$\sigma_{мл}^* \left( \overset{\circ}{\delta} \right)$ . Причем, если проверка по критерию Фишера показала однородность соответствующих СКО, то межлабораторную воспроизводимость методики биотестирования вычисляют как средневзвешенное значений межлабораторной воспроизводимости на эталонных веществах по формуле

$$\sigma_{мл}^* \left( \overset{\circ}{\delta} \right) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I f_i \sigma_{мл,i}^2}{\sum_{i=1}^I f_i}}, \quad (\text{Б.23})$$

где  $i$  - номер эталонного вещества,  $i = 1, \dots, I$ ;

$I$  - количество эталонных веществ.

Если проверка по критерию Фишера показала неоднородность соответствующих СКО, то за внутрилабораторную воспроизводимость методики биотестирования принимают наибольшее из вычисленных значений внутрилабораторной воспроизводимости на эталонных веществах.

## Приложение В

### Установление средней эффективной (летальной) концентрации токсического вещества (смеси веществ) и среднего эффективного (летального) разбавления воды (водной вытяжки), бурового раствора

Среднюю эффективную (летальную) концентрацию ЭК<sub>50</sub> (ЛК<sub>50</sub>) или среднее эффективное (летальное) разбавление ЭР<sub>50</sub> (ЛР<sub>50</sub>) устанавливают графическим способом (рис. В.1). На оси абсцисс откладывают десятичные логарифмы величин концентраций вещества (разбавлений пробы воды или водной вытяжки, бурового раствора), а на оси ординат - проценты изменения тест-реакции (гибели тест-объектов) по отношению к контролю, которые переводят в пробиты (табл. В.1). Через полученные точки проводят прямую. Потом из точки на оси ординат, которая соответствует 5 пробитам (50%), проводят линию, параллельную оси абсцисс, до пересечения с линией графика. Из точки пересечения опускают перпендикуляр на ось абсцисс. Точке пересечения перпендикуляра и оси абсцисс соответствует десятичный логарифм ЭК<sub>50</sub> (ЛК<sub>50</sub>) или ЭР<sub>50</sub> (ЛР<sub>50</sub>). По логарифму находят значение ЭК<sub>50</sub> (ЛК<sub>50</sub>) в мг/дм<sup>3</sup> или ЭР<sub>50</sub> (ЛР<sub>50</sub>) в процентах или безразмерных величинах (в кратности разбавления, долях и др.).

Таблица В.1

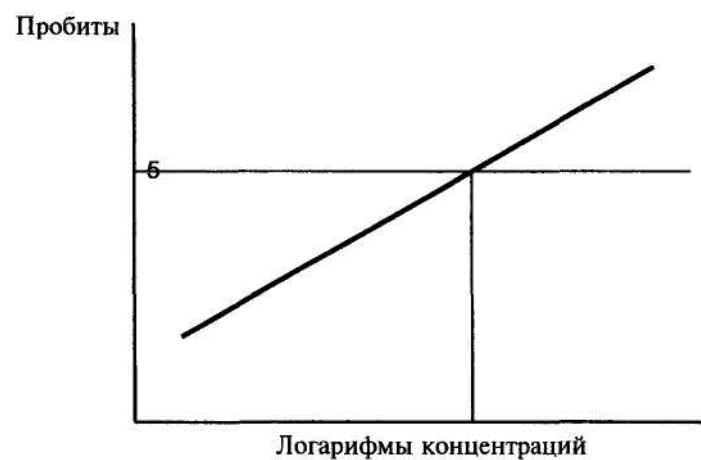
#### Пробитные величины

Процент изменения тест-	Пробиты	Процент изменения тест-	Пробиты
-------------------------	---------	-------------------------	---------

<i>реакции</i>		<i>реакции</i>	
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
1	2,67	32	4,53
2	2,95	33	4,56
3	3,12	34	4,59
4	3,25	35	4,61
5	3,35	36	4,64
6	3,45	37	4,67
7	3,52	38	4,69
8	3,59	39	4,72
9	3,66	40	4,75
10	3,72	41	4,77
11	3,77	42	4,80
12	3,83	43	4,82
13	3,87	44	4,84
14	3,92	45	4,87
15	3,96	46	4,90
16	4,01	47	4,92
17	4,05	48	4,95
18	4,08	49	4,97
19	4,12	50	5,00
20	4,16	51	5,03
21	4,19	52	5,05
22	4,22	53	5,08
23	4,26	54	5,10
24	4,29	55	5,13
25	4,33	56	5,15
26	4,36	57	5,18
27	4,39	58	5,20
28	4,42	59	5,23
29	4,45	60	5,25
30	4,48	61	5,28
31	4,50	62	5,31
63	5,33	82	5,92
64	5,36	83	5,95
65	5,39	84	5,99
66	5,41	85	6,04
67	5,44	86	6,08
68	5,47	87	6,13
69	5,50	88	6,18
70	5,52	89	6,23

71	5,55	90	6,28
72	5,58	91	6,34
73	5,61	92	6,41
74	5,64	93	6,48
75	5,67	94	6,55
76	5,71	95	6,64
77	5,74	96	6,75
78	5,77	97	6,88
79	5,81	98	7,05
80	5,84	99	7,32
81	5,88		

а)



б)

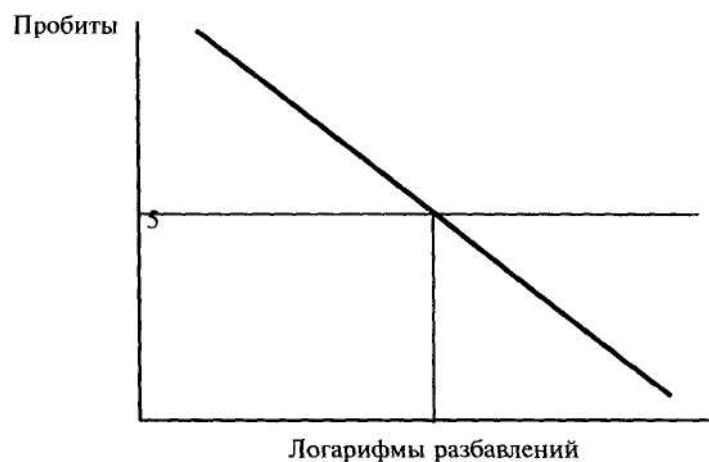


Рис. В.1. Установление графическим способом

(а) эффективной (летальной) концентрации вещества (смеси веществ) и (б) среднего эффективного (летального) разбавления воды (водной вытяжки), бурового раствора

Приложение Г

Форма протокола биотестирования

(название Министерства, ведомства, если необходимо)

(название организации, структурным подразделением которой является лаборатория, если необходимо)

(название лаборатории, аттестованной на право проведения измерений; аттестат аккредитации № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_)

(адрес лаборатории, телефон, факс)

**Протокол биотестирования № \_\_\_\_ от \_\_\_\_\_**

Наименование заказчика \_\_\_\_\_

Основание для проведения работ \_\_\_\_\_

Наименование объекта контроля \_\_\_\_\_

Дата, время, место отбора пробы \_\_\_\_\_

Дата поступления пробы в лабораторию \_\_\_\_\_

Вид пробы \_\_\_\_\_

Дата выполнения биотестирования	Наименование показателя	Обозначение и наименование НД на методику биотестирования	Результат биотестирования	Погрешность	Исполнитель
1	2	3	4	5	6

Заведующий лабораторией \_\_\_\_\_  
(подпись, Ф.И.О.)**Приложение Д****РАЗРАБОТЧИКИ МЕТОДИК «РУКОВОДСТВА ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ МЕТОДОМ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ВОД, ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ, ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ И БУРОВЫХ РАСТВОРОВ»**

**Артюхова В.И.**, канд. биол. наук (раздел 9);  
**Божко Т.В.** (разделы 10-12, приложение В);  
**Гроздов А.О.**, канд. биол. наук (раздел 15);  
**Губарь Т.В.** (разделы 4, 10-12, приложение В);  
**Дмитриева А.Г.**, канд. биол. наук (раздел 9);  
**Дятлов С.Е.**, канд. биол. наук (разделы 14, 15);  
**Жмур Н.С.**, канд. биол. наук (разделы 11, 12);  
**Зоммер Е.А.**, канд. биол. наук (раздел 10);  
**Исакова Е.Ф.**, канд. биол. наук (раздел 10);  
**Калиниченко Е.А.** (приложение Б);  
**Котко Л.О.** (разделы 4, 10-12, приложение В);  
**Крайнюкова А.Н.**, д-р биол. наук (разделы 1 - 15, приложения А, Г);  
**Красовский Г.М.**, д-р мед. наук (раздел 10);  
**Кузнецов А.М.** (раздел 7);  
**Кузьмич В.Н.**, канд. биол. наук (разделы 1-3, приложение А);  
**Лесников Л.А.**, канд. биол. наук (раздел 10);  
**Новосадова Т.Г.**, канд. биол. наук (разделы 8, 10);  
**Петросян А.Г.**, канд. биол. наук (разделы 14, 15);  
**Сальников М.В.**, канд. техн. наук (раздел 7);  
**Соколова С.А.**, канд. биол. наук (разделы 4, 13, 14-16);  
**Старцева А.И.** (разделы 9, 10, 11, 14, 15);  
**Ткаченко Г.Н.** (раздел 9);  
**Ульянова И.П.** (разделы 4, 7-9, 14, 15);  
**Усенко О.В.**, канд. биол. наук (разделы 7, 8);

**Федотов А.С.**, канд. вет. наук ([раздел 13](#), [16](#));

**Флеров Б.А.**, д-р биол. наук ([разделы 11](#), [12](#));

**Хоружая Т.А.**, д-р биол. наук ([разделы 1-3](#), [9-10](#));

**Шадрина Л.А.**, канд. биол. наук ([разделы 14](#), [15](#));

**Шипилова И.Г.** ([разделы 1](#), [приложение Г](#));

**Щербань Э.П.**, канд. биол. наук ([раздел 10](#)).

Ответственные исполнители Руководства выражают благодарность Е.Н. Ладейщиковой за помощь, оказанную при подготовке Руководства.