
МИНИСТЕРСТВО ПРИРОДНЫХ РЕСУРСОВ И ЭКОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральная служба по гидрометеорологии и мониторингу
окружающей среды (Росгидромет)

РУКОВОДЯЩИЙ ДОКУМЕНТ

РД
52.24.905–
2020

ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ВОДЫ И ВОДНЫХ ВЫТЯЖЕК ДОННЫХ
ОТЛОЖЕНИЙ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ МЕТОДОМ
БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО ИЗМЕНЕНИЮ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ
КУЛЬТУРЫ МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLORELLA VULGARIS*

Ростов-на-Дону 2020

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Гидрохимический институт» (ФГБУ «ГХИ»)

2 РАЗРАБОТЧИКИ Е.Н. Бакаева, д-р биол. наук (руководитель разработки), М.Н. Тарадайко (ответственный исполнитель), М.М. Трофимчук, канд. биол. наук

3 СОГЛАСОВАН:

- с Федеральным государственным бюджетным учреждением «Научно-производственное объединение «Тайфун» (ФГБУ «НПО «Тайфун») 19.11.2020;

- с Управлением мониторинга состояния и загрязнения окружающей среды (УМСЗ) Росгидромета 11.12.2020

4 УТВЕРЖДЕН Руководителем Росгидромета 16.12.2020

ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ приказом Росгидромета от 15.01.2021 № 2

5 ЗАРЕГИСТРИРОВАН головной организацией по стандартизации ФГБУ «НПО «Тайфун» _____
ОБОЗНАЧЕНИЕ РУКОВОДЯЩЕГО ДОКУМЕНТА РД 52.24._____

6 ВВЕДЁН ВПЕРВЫЕ

7 СРОК ПЕРВОЙ ПРОВЕРКИ 2031 год

8 ПЕРИОДИЧНОСТЬ ПРОВЕРКИ 10 лет

Содержание

1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки.....	1
3 Термины и определения	3
4 Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам.....	5
4.1 Средства измерений, вспомогательные устройства	5
4.2 Культура микроводоросли, реактивы и материалы.....	6
5 Общие положения.....	7
6 Требования безопасности, охраны окружающей среды	7
7 Требования к квалификации операторов	7
8 Отбор и хранение проб для биотестирования	8
8.1 Отбор и хранение проб воды поверхностных водных объектов.....	8
8.2 Отбор и хранение проб донных отложений поверхностных водных объектов	8
9 Метод биотестирования по изменению оптической плотности культуры микроводоросли <i>Chlorella vulgaris</i>	8
9.1 Принцип метода.....	8
9.2 Подготовка воды контрольной серии для биотестирования.....	9
9.3 Подготовка проб для биотестирования.....	9
9.3.1 Подготовка проб воды	9
9.3.2 Подготовка водной вытяжки проб донных отложений	10
9.3.3 Приготовление разбавлений тестируемой воды и водной вытяжки донных отложений	11
9.4 Подготовка посуды для биотестирования.....	12
9.5 Подготовка культуры микроводоросли к биотестированию.....	12
9.6 Условия проведения биотестирования	13
9.7 Проведение биотестирования	13
9.8 Регистрация значений оптической плотности культуры микроводоросли	14
9.9 Расчёт и оценка токсичности проб воды и водных вытяжек донных отложений	14
9.10 Расчёт и оценка кратности разбавления, снижающего токсичность.....	16
9.11 Оформление результатов биотестирования	17
10 Условия приемлемости результатов биотестирования.....	17
Приложение А (справочное) Характеристика микроводоросли <i>Chlorella vulgaris</i>	18
Приложение Б (рекомендуемое) Форма акта отбора проб воды и донных отложений поверхностного водного объекта для биотестирования	19

Приложение В (обязательное) Форма записи условий проведения биотестирования воды или водных вытяжек донных отложений	20
Приложение Г (обязательное) Выращивание маточной культуры микроводоросли <i>Chlorella vulgaris</i>	21
Приложение Д (обязательное) Проверка чувствительности культуры микроводоросли <i>Chlorella vulgaris</i>	23
Приложение Е (обязательное) Форма записи полученных значений оптической плотности культуры микроводоросли и оценки токсичности воды или водных вытяжек донных отложений	25
Приложение Ж (обязательное) Форма протокола оценки токсичности воды или водных вытяжек донных отложений	26
Библиография	27

РУКОВОДЯЩИЙ ДОКУМЕНТ

ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ВОДЫ И ВОДНЫХ ВЫТЯЖЕК ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ МЕТОДОМ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО ИЗМЕНЕНИЮ ОПТИЧЕСКОЙ ПЛОТНОСТИ КУЛЬТУРЫ МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLORELLA VULGARIS*

Дата введения – 2021–11–01

1 Область применения

Настоящий руководящий документ устанавливает методику оценки токсичности воды и водных вытяжек донных отложений поверхностных водных объектов (далее – ПВО) методом биотестирования по изменению оптической плотности культуры микроводоросли *Chlorella vulgaris* в лабораторных условиях и требования к порядку проведения и оценке токсичности воды и водных вытяжек донных отложений ПВО в составе системы мониторинга поверхностных вод суши (далее – методика).

Методика предназначена для лабораторий, осуществляющих наблюдения за токсичностью воды и донных отложений ПВО в рамках государственной службы наблюдений за состоянием окружающей природной среды Росгидромета.

Настоящий руководящий документ может быть использован природоохранными организациями, осуществляющими мониторинг состояния и загрязнения окружающей среды, а также для проведения научно-исследовательских экотоксикологических и экологических работ.

2 Нормативные ссылки

В настоящем руководящем документе использованы ссылки на следующие нормативные документы:

ГОСТ 12.0.004-90 Система стандартов безопасности труда. Организация обучения безопасности труда. Общие положения

ГОСТ 12.1.004-91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

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

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

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

ГОСТ 1770-74 Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 3118–77 Реактивы. Кислота соляная. Технические условия

ГОСТ 4174-77 Реактивы. Цинк серноокислый 7-водный. Технические условия

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

ГОСТ 4217-77 Реактивы. Калий азотнокислый. Технические условия

ГОСТ 4220-75 Реактивы. Калий двухромово-кислый. Технические условия

ГОСТ 4328-77 Реактивы. Натрия гидроокись. Технические условия

ГОСТ 4523-77 Реактивы. Магний серно-кислый 7-водный. Технические условия

ГОСТ 5556-81 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

ГОСТ 6709-72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9336-75 Реактивы. Аммоний ванадиево-кислый мета. Технические условия

ГОСТ 9412-93 Марля медицинская. Общие технические условия

ГОСТ 9656-75 Реактивы. Кислота борная. Технические условия

ГОСТ 19126-2007 Инструменты медицинские металлические. Общие технические условия

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

ГОСТ 29230-91 (ИСО 835-4-81) Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 4. Пипетки выдувные

ГОСТ 31861-2012 Вода. Общие требования к отбору проб

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

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

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

ГОСТ OIML R 111-1-2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Гири классов E(1), E(2), F(1), F(2), M(1), M(1-2), M(2), M(2-3) и M(3). Часть 1. Метрологические и технические требования

ПНД Ф 16.2.2:2.3:3.27-02 (ФР.1.31.2005.01757). Количественный химический анализ почв. Методика выполнения измерений содержания влаги в твердых и жидких отходах производства и потребления, осадках, шламах, активном иле, донных отложениях гравиметрическим методом (с Изменением № 1) (Издание 2017 года)

ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10-04 Т 16.1:2:2.3:3.7-04 Токсикологические методы контроля. Методика измерения оптической плотности культуры микроводоросли хлорелла *Chlorella vulgaris* Beijer для определения ток-

сичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления (издание 2014 г.)

Р 52.24.662-2004 Оценка токсического загрязнения природных вод и донных отложений пресноводных экосистем методом биотестирования с использованием коловраток

РД 52.24.609-2013 Организация и проведение наблюдений за содержанием загрязняющих веществ в донных отложениях водных объектов

РД 52.24.635-2002 Методические указания. Проведение наблюдений за токсическим загрязнением донных отложений в пресноводных экосистемах на основе биотестирования

Р 52.24.808-2014 Оценка токсичности поверхностных вод суши методом биотестирования с использованием хлорофилла *a*

РД 52.24.868-2017 Использование методов биотестирования воды и донных отложений водотоков и водоемов

Примечание – При пользовании настоящим руководящим документом целесообразно проверять действие ссылочных нормативных документов:

- стандартов в информационной системе общего пользования – на официальном сайте федерального органа исполнительной власти в сфере стандартизации в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячно издаваемого информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год;

- нормативных документов Росгидромета – по РД 52.18.5-2012 и ежегодно издаваемому информационному указателю нормативных документов, опубликованному по состоянию на 1 января текущего года;

Если ссылочный нормативный документ заменён (изменён), то при пользовании настоящим руководящим документом следует руководствоваться заменённым (изменённым) нормативным документом. Если ссылочный нормативный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем руководящем документе применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1

биотестирование (биологическое тестирование воды):

Оценка качества воды по ответным реакциям водных организмов, являющихся тест-объектами.

[ГОСТ 27065-86, статья 39]

3.2 биотест: Методика обнаружения и оценки токсичности воды или донных отложений на основе регистрации и анализа ответных реакций тест-объекта (культуры гидробионтов) в токсикологическом эксперименте.

3.3. водные вытяжки донных отложений: Фильтрат водного раствора, полученного после взбалтывания донных отложений с дистиллированной водой.

3.4 донные отложения: Донные наносы и твёрдые частицы, образовавшиеся и осевшие на дно в результате внутриводоёмных физических, химических и биологических процессов, в которых участвуют вещества как естественного, так и антропогенного происхождения [1].

3.5 контрольная серия: подготовленная посредством дистилляции водопроводная вода.

3.6 критерий токсичности: Значение показателя, количественно выражающее ответную реакцию тест-объекта, на основании которого судят о наличии токсического действия.

3.7 оптическая плотность культуры микроводоросли: Показатель, количественно выражающий непрозрачность жидкости, обусловленную присутствием определённого количества взвешенных частиц – клеток микроводоросли.

3.8

поверхностные воды: Воды, находящиеся на поверхности суши в виде различных водных объектов.
[ГОСТ 19179-73, статья 7]

3.9 поверхностные водные объекты; ПВО: Состоят из поверхностных вод и покрытых ими земель в пределах береговой линии [2].

3.10 повторность: один из анализов по определению токсичности одной и той же тестируемой пробы, проводимый в соответствии с применяемой методикой биотестирования.

3.11

проба воды: Представительная часть определенной водной массы, отбираемая непрерывно или периодически с целью исследования ее состава и свойств.
[ГОСТ 8.556-91, приложение 1]

3.12 результат биотестирования: Конечный вывод о токсичности водной среды, сделанный в ходе биотестирования (Р 52.24.662).

3.13 тест-объект: Организм или популяция организмов, используемых для установления токсичности воды или донных отложений при биотестировании (РД 52.24.868).

3.14 тест-показатель: Показатель жизнедеятельности (поведенческие реакции, размножение, выживаемость и т.д.) тест-объекта, используемый для определения токсичности поверхностных вод суши (Р 52.24.808).

3.15 токсичность воды (донных отложений): Характеристика качества воды (донных отложений) по способности вызывать патологические изменения или гибель организмов (РД 52.24.868).

3.16 фоновый створ: Створ, расположенный на расстоянии не менее 1 км выше источника загрязнения [1].

3.17 **экспозиция:** Период, в течение которого организм находится под воздействием исследуемого фактора, в частности химического вещества (РД 52.24.635).

3.18 **эталонный токсикант:** Токсичное вещество, используемое для установления пригодности тест-объекта для биотестирования (РД 52.24.868).

4 Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам

4.1 Средства измерений, вспомогательные устройства

4.1.1 Фотометр ИПС-03 [3].

4.1.2 Многоцветный культиватор водорослей KBM-07 с набором флаконов вместимостью 10 см³.

4.1.3 Культиватор KB-05 [4].

4.1.4 Климатостат ВЗ [5].

4.1.5 Холодильник бытовой, обеспечивающий температуру от минус 18 °С до 4 °С.

4.1.6 Шкаф сушильный общелабораторного назначения.

4.1.7 Термометр цифровой «Замер-1» [6] или аналогичный.

4.1.8 Весы лабораторные общего назначения по ГОСТ Р 53228.

4.1.9 Гири по ГОСТ OIML R 111-1.

4.1.10 pH-метр электронный любого типа, например, pH-420 [7].

4.1.11 Анализатор влажности ML-50 или любого типа с погрешностью при измерении влажности не более 0,5 %.

4.1.12 Аппарат универсальный для встряхивания жидкостей в колбах и пробирках АБУ-6С [8] или аналогичный.

4.1.13 Устройство фильтровальное типа Сарториус 16673 – 1 шт.

4.1.14 Насос вакуумный ручной для фильтровального аппарата с манометром типа Mityvac – 1 шт.

4.1.15 Фильтр с обратным осмосом типа «Гейзер».

4.1.16 Пипетки перестраиваемые автоматические по ГОСТ 29230 вместимостью: 20-200 мм³; 0,1-1 см³; 1-5 см³ или стеклянные градуированные пипетки вместимостью: 1 см³ – 6 шт., 10 см³ – 2 шт., 0,2 см³ – 1 шт.

4.1.17 Цилиндр мерный исполнения 1 или 3 по ГОСТ 1770 вместимостью: 25 см³ – 2 шт., 50 см³ – 2 шт., 100 см³ – 2 шт.

4.1.18 Воронка лабораторная по ГОСТ 25336 диаметром 100 мм – 6 шт.

4.1.19 Стаканы стеклянные лабораторные по ГОСТ 25336 вместимостью: 100 см³ – 6 шт., 1000 см³ – 1 шт.

4.1.20 Колба мерная исполнения 2 по ГОСТ 1770 вместимостью: 200 см³ – 5 шт., 250 см³ – 2 шт., 1000 см³ – 1 шт.

4.1.21 Шпатель металлический по ГОСТ 19126.

4.1.22 Пинцет медицинский [9].

4.1.23 Сито капроновое с размером ячеек 0,5 – 1,5 мм.

4.1.24 Ложки стеклянные – 4 шт.

4.1.25 Чаша кристаллизационная диаметр ЧКЦ-1-125 [10].

4.1.26 Слянки и банки стеклянные с винтовым горлом, с прокладкой и крышкой или с притертой пробкой для отбора и хранения проб вместимостью от 500 до 1000 см³ [11].

4.1.27 Флаконы и банки цилиндрические полиэтиленовые или политетрафторэтановые с навинчивающимися крышками для отбора и хранения проб и реактивов вместимостью от 500 до 1000 см³ [12].

Примечание – Допускается использование других типов средств измерений, посуды и вспомогательного оборудования, в том числе импортных, с характеристиками не хуже, чем у приведенных в 4.1.

4.2 Культура микроводоросли, реактивы и материалы

4.2.1 Культура микроводоросли *Chlorella vulgaris*, соответствующая критериям чувствительности к эталонному токсиканту. Характеристика микроводоросли приведена в приложении А.

4.2.2 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

4.2.3 Калий двуххромовокислый по ГОСТ 4220, х.ч. или ч.д.а.

4.2.4 Калий азотнокислый по ГОСТ 4217, х.ч. или ч.д.а.

4.2.5 Калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198, х.ч. или ч.д.а.

4.2.6 Магний сернокислый 7-водный по ГОСТ 4523, х.ч. или ч.д.а.

4.2.7 Железо лимоннокислое [13], ч.

4.2.8 Кислота борная по ГОСТ 9656, х.ч.

4.2.9 Метаванадат аммония по ГОСТ 9336, ч. или ч.д.а.

4.2.10 Марганец хлористый 4-водный по ГОСТ 612, ч. или ч.д.а.

4.2.11 Молибдена окись [14], ч.

4.2.12 Цинка сульфат 7-водный по ГОСТ 4174, х.ч. или ч.д.а.

4.2.13 Натрия гидроксид по ГОСТ 4328, х.ч. или ч.д.а.

4.2.14 Кислота соляная по ГОСТ 3118, ч.д.а.

4.2.15 Фильтры бумажные обеззоленные «белая лента» [15].

4.2.16 Вата хлопковая медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556.

4.2.17 Марля медицинская по ГОСТ 9412.

4.2.18 Мельничный газ № 70-№ 74.

Примечание – Допускается использование реактивов и материалов, изготовленных по другой нормативно-технической документации, в том числе импортных, с квалификацией не ниже указанной в 4.2.

5 Общие положения

5.1 Методику биотестирования по изменению оптической плотности культуры микроводоросли *Chlorella vulgaris*, 1890 применяют для оценки токсичности воды и водных вытяжек донных отложений ПВО.

5.2 Длительность биотестирования (продолжительность экспозиции) составляет (45 ± 2) ч при температуре 25 °С.

5.3 Оптическую плотность культуры микроводоросли измеряют после (45 ± 2) ч роста с помощью фотометра ИПС-03.

5.4 Биотестирование проводят в режимных и оперативных наблюдениях. В режимных наблюдениях на основе систематических данных биотестирования оценивают токсичность воды ПВО или их участков. Оперативные наблюдения предназначены для оперативного выявления опасных ситуаций, вызываемых аварийным загрязнением ПВО или их участков.

5.5 В ходе биотестирования воды и водных вытяжек донных отложений ПВО устанавливают отсутствие или наличие токсичности тестируемой пробы воды или водных вытяжек донных отложений для культуры микроводоросли без идентификации загрязняющих веществ и их количественных характеристик.

5.6 В случае предполагаемого высокого загрязнения одновременно ставят серию разбавлений тестируемой воды с целью определения кратности разбавления, снимающей возможное токсическое действие.

6 Требования безопасности, охраны окружающей среды

При выполнении работ следует соблюдать общие требования к технике безопасности работ на ПВО и в химических лабораториях.

Особых требований по экологической безопасности нет.

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

Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и [16].

Рабочие столы и поверхности должны содержаться в чистоте. После завершения работ проводят влажную уборку рабочих поверхностей.

Работающий персонал должен пройти обучение безопасности труда по ГОСТ 12.0.004.

7 Требования к квалификации операторов

К выполнению экспериментальных работ методами биотестирования допускают лиц, освоивших методические приёмы водной токсикологии, методы полевых и лабораторных гидробиологических исследований.

8 Отбор и хранение проб для биотестирования

8.1 Отбор и хранение проб воды поверхностных водных объектов

8.1.1 Пробы воды отбирают с учетом требований ГОСТ 31861. Объем пробы должен быть не менее 500 см³. Акт отбора каждой пробы составляют по форме, приведенной в приложении Б.

8.1.2 Сосуды должны быть из материала, не содержащего токсичных примесей. Слянки и банки стеклянные с винтовым горлом, с прокладкой и крышкой или с притертой пробкой, флаконы и банки цилиндрические полиэтиленовые или политетрафторэтановые с навинчивающимися крышками. Сосуды с пробами маркируют.

8.1.3 Перед заполнением подготовленных сосудов воду фильтруют через мельничный газ № 70-№ 74 (для удаления природного планктона) и несколько раз ополаскивают сосуд. Заполняют водой полностью.

8.1.4 Анализ проб воды по определению токсичности проводят не позднее 6 ч после отбора проб. В случае невозможности проведения исследований в срок пробы воды охлаждают до 4 °С и хранят при данной температуре не более 24 ч согласно ГОСТ 31861. Консервирование проб химическими веществами не допускается.

8.2 Отбор и хранение проб донных отложений поверхностных водных объектов

8.2.1 Отбор проб донных отложений проводят согласно РД 52.24.635, РД 52.24.609, используя способы и устройства, предусмотренные РД 52.24.609. Акт отбора каждой пробы составляют по форме, приведенной в приложении Б.

8.2.2 Отобранные пробы донных отложений помещают сосуды аналогично 8.1.2

8.2.3 Пробы не консервируют.

8.2.4 Хранят пробы во влажном состоянии не более 1 сут при температуре не выше 4 °С. Сразу после отбора пробы помещают в холодильник или в прохладное место.

8.2.5 Биотестирование проводят не позднее, чем через 1 сут.

8.2.6 В случае невозможности проведения исследований в срок пробы донных отложений допустимо замораживать. В замороженном состоянии пробы можно хранить в течение 60 сут при температуре от минус 15 °С до минус 20 °С.

9 Метод биотестирования по изменению оптической плотности культуры микроводоросли *Chlorella vulgaris*

9.1 Принцип метода

Метод основан на определении изменений значений оптической плотности лабораторной культуры микроводоросли *Chlorella vulgaris*.

Культуру выращивают в пробах воды и водных вытяжек донных отложений, отобранных из ПВО. Влияние тестируемой воды и водной вытяжки донных отложений (опытная серия) на рост культуры микроводоросли оценивают по отклонению от значений оптической плотности культуры микроводоросли, выращенной на воде, не содержащей токсичных веществ.

Биотестирование проводят в специализированном многокуветном культиваторе KBM-07, позволяющем одновременно проводить биотестирование пяти разных проб воды/водной вытяжки донных отложений или пяти вариантов разбавлений одной пробы с целью определения значения кратности разбавления, снижающего токсичность тестируемых проб.

Биотестирование проводят в четырёхкратной повторности.

Критерием токсичности воды является снижение на 30 % и более (подавление роста) или увеличение на 30 % и более (стимуляция роста) значений оптической плотности культуры микроводоросли, выращиваемой в течение (45 ± 2) ч на тестируемой воде (опытная серия), по сравнению с ее ростом в контрольной серии (подготовленная водопроводная вода согласно 9.2).

9.2 Подготовка воды контрольной серии для биотестирования

Для биотестирования воды и водных вытяжек донных отложений используют одну и ту же контрольную серию.

Подготовку контрольной серии проводят путем дистилляции водопроводной воды исследуемого региона. Допускается подготовка воды при помощи фильтра с обратным осмосом.

9.3 Подготовка проб для биотестирования

9.3.1 Подготовка проб воды

Перед биотестированием, в случае если пробы были охлаждены, их доводят до комнатной температуры.

Тестируемую воду фильтруют через пористый обеззоленный фильтр «белая лента».

Проба воды, подготовленная к биотестированию, должна иметь значение pH от 7,0 до 8,5. Если значение pH пробы не укладывается в указанные пределы, то можно предположить наличие токсического действия тестируемой пробы из-за этого условия среды. В таком случае параллельно проводят биотестирование части исходной пробы и части пробы после коррекции pH 10%-ным раствором соляной кислоты или 10 %-ным раствором гидроксида натрия. Коррекция pH не должна вызывать химической реакции с веществами пробы (выпадение осадка, комплексообразование) и увеличивать ее объем более чем на 5 %. Информацию о проведенной коррекции приводят в соответствии с приложением В.

9.3.2 Подготовка водной вытяжки проб донных отложений

Водную вытяжку готовят из донных отложений с естественной влажностью без высушивания.

Объем водной вытяжки должен быть не менее 50 см³.

Водную вытяжку для биотестирования готовят в соотношении 1:4 (одна часть массы абсолютно сухих донных отложений и 4 части дистиллированной воды). Для соблюдения указанного соотношения определяют влажность пробы донных отложений.

Предварительно из пробы донных отложений пинцетом удаляют крупные включения (обломки раковин, камней, отмершие организмы и др.). Затем донные отложения протирают через капроновое сито с порами 0,5–1,5 мм с помощью шпателя и тщательно перемешивают.

Далее измеряют массовую долю влаги (влажность) с помощью анализатора влажности или гравиметрическим методом согласно ПНД Ф 16.2.2:2.3:3.27. Измерение влажности проводят на части подготовленной тестируемой пробы донных отложений.

Анализатором влажности измеряют влажность ω , отн. ед., пробы донных отложений.

Гравиметрическим методом влажность определяют как отношение массы воды, удаленной из навески пробы путем высушивания до постоянной массы, к массе навески влажной пробы.

Для соблюдения соотношения 1:4 в начале рассчитывают массу воды $M_{\text{в}}$, г в пробе донных отложений с естественной влажностью по формуле

$$M_{\text{в}} = \omega \cdot M_{\text{ест.вл}}, \quad (1)$$

где $M_{\text{ест.вл}}$ – масса донных отложений с естественной влажностью, г (для биотестирования достаточно 100 г);

Затем рассчитывают массу абсолютно сухих донных отложений $M_{\text{абс.сух}}$, г, тестируемой пробы по формуле

$$M_{\text{абс.сух}} = M_{\text{ест.вл}} - M_{\text{в}}, \quad (2)$$

Далее рассчитывают объем добавляемой дистиллированной воды $V_{\text{дист.в}}$, см³ по формуле

$$V_{\text{дист.в}} = \frac{4 \cdot M_{\text{абс.сух}} - M_{\text{в}}}{\rho_{\text{дист.в}}}, \quad (3)$$

где 4 – значение, необходимое для соблюдения соотношения 1:4 при приготовлении водной вытяжки донных отложений;

$\rho_{\text{дист.в}}$ – плотность дистиллированной воды 1 г/см³.

Дистиллированную воду, имеющую низкое значение pH (5,5), во избежание растворения карбонатов кальция и магния, предварительно кипятят 30 мин.

В колбу вместимостью 1000 см³ помещают дистиллированную воду и 100 г донных отложений. Объем подготовленной дистиллированной воды рассчитывают по формуле (3).

Колбу с содержимым устанавливают в аппарат для встряхивания жидкостей и перемешивают в течение 2 ч. Затем отстаивают в течение 1 ч.

Надосадочную жидкость отбирают сифоном и фильтруют до получения прозрачного фильтрата через фильтр «белая лента» или в случае высокой мутности вытяжки проводят центрифугирование при 3-3,5 тыс. оборотов в течение 5 мин. В случае сохранения мутности вытяжки центрифугирование повторяют.

Измеряют значение pH водной вытяжки донных отложений, подготовленной к биотестированию.

9.3.3 Приготовление разбавлений тестируемой воды и водной вытяжки донных отложений

Приготовление разбавлений тестируемой воды и водных вытяжек донных отложений для биотестирования проводят в случае выявления острой токсичности и в случае высокого загрязнения.

Для приготовления разбавлений тестируемой воды и водных вытяжек донных отложений используют воду контрольной серии. Объем используемой посуды должен на 1/3 превышать необходимый объем приготавливаемого разбавления тестируемых проб. Все растворы и их разбавления готовят при комнатной температуре.

В процессе приготовления разбавлений пробы тщательно перемешивают. Готовят разбавления, кратные двум (2, 4, 8). Для этого используют пять стеклянных стаканов. В первый, третий, четвертый, пятый стаканы вносят по 49 см³ воды контрольной серии, во второй – 98 см³ тестируемой воды или водной вытяжки донных отложений. Далее из второго стакана в третий переносят цилиндром 49 см³ тестируемой пробы. Затем после тщательного перемешивания из третьего стакана в четвертый переносят 49 см³ воды, из четвертого в пятый – 49 см³ воды. Из пятого стакана после перемешивания удаляют 49 см³ воды.

Таким образом, получают следующие варианты проб объемом 49 см³:

- вариант 1 – вода контрольной серии;
- вариант 2 – тестируемая (не разбавленная) вода или водная вытяжка донных отложений;
- вариант 3 – тестируемая вода или водная вытяжка донных отложений, разбавленная в 2 раза;
- вариант 4 – тестируемая вода или водная вытяжка донных отложений, разбавленная в 4 раза.

- вариант 5 – тестируемая вода или водная вытяжка донных отложений, разбавленная в 8 раз.

9.4 Подготовка посуды для биотестирования

Посуду для биотестирования (стаканы, флаконы, колбы и другую) моют раствором пищевой соды, затем тщательно промывают водопроводной водой. В заключение посуду 3 раза споласкивают дистиллированной водой.

Не следует использовать для мытья посуды хромовую смесь, синтетические поверхностно-активные вещества и органические растворители.

Для сушки и стерилизации посуду, кроме мерной, помещают на один час в шкаф сушильный при температуре $(160 \pm 5)^\circ\text{C}$.

Перед использованием полиэтиленовые пробки, которыми закрывают флаконы, необходимо залить кипящей дистиллированной водой, выдерживать в ней 10 мин, а затем, слив воду, просушить фильтровальной бумагой.

9.5 Подготовка культуры микроводоросли к биотестированию

9.5.1 Для биотестирования используют альгологически чистую культуру микроводоросли *Chlorella vulgaris*. Выращивание маточной культуры микроводоросли проводят в соответствии с приложением Г.

Для этого в ёмкость культиватора КВ-05 цилиндром вносят 50 см^3 25 %-ной среды Тамия и засевают альгологически чистую культуру микроводоросли с оптической плотностью $(0,200 \pm 0,010)$ отн. ед. объёмом $(2,5 \pm 0,1)\text{ см}^3$ для получения конечной оптической плотности $(0,010 \pm 0,001)$ отн. ед.

Указанное значение оптической плотности культуры микроводоросли получают следующим образом:

- первоначально культуру микроводоросли фильтруют через 4 слоя марли или вату;
- измеряют оптическую плотность D исходной культуры фотометром ИПС-03 в соответствии с паспортом и руководством по эксплуатации;
- значения D должны соответствовать $(0,200 \pm 0,010)$ отн. ед.;
- в случае превышения указанного диапазона D проводят разбавление культуры микроводоросли, внося небольшие количества 25 %-ной среды Тамия;
- полученную культуру микроводоросли с необходимой оптической плотностью вносят в ёмкость культиватора КВ-05 на 48 ч для получения маточной культуры в экспоненциальной стадии роста.

9.5.2 Перед экспериментом проверяют чувствительность полученной маточной культуры микроводоросли воздействием эталонного токсиканта, в качестве которого используют калий двуххромовокислый (бихромат калия). Проверку чувствительности культуры микроводоросли проводят в соответствии с приложением Д.

9.5.3 После проверки пригодности маточной культуры *Chlorella vulgaris* для биотестирования её фильтруют через 4 слоя марли или вату и разбавляют до оптической плотности $(0,050 \pm 0,005)$ отн. ед. 100 %-ной средой Тамия согласно 9.5.1.

9.6 Условия проведения биотестирования

Биотестирование проводят в лабораторном помещении, не содержащем токсичные пары и газы. Температура окружающего воздуха в лаборатории должна быть в пределах от 17 °С до 27 °С. Освещение помещения может быть естественным или искусственным. Особые требования к освещению и влажности в помещении не предъявляют.

Само биотестирование проводят в многокуветном культиваторе микроводорослей KBM-07 при оптимальной температуре $(25 \pm 1,0)$ °С и непрерывном освещении с интенсивностью света 60 Вт/м².

9.7 Проведение биотестирования

9.7.1 Маточную культуру микроводоросли, приготовленную согласно 9.5.3, вносят по 1 см³ в 5 стаканов с 49 см³ контрольной и тестируемых проб воды или водных вытяжек из донных отложений. В результате такого (50-кратного) разбавления внесённой культуры содержание питательных элементов в тестируемой воде и водных вытяжках донных отложений будет соответствовать 2 %-ной среде Тамия, а исходная оптическая плотность культуры микроводоросли будет равна 0,001.

9.7.2 Из каждого стакана отбирают по 6 см³ пробы и переносят её в 24 флакона многокуветного культиватора KBM-07 (одна контрольная и пять опытных серий – по четыре повторности на каждую). Допустимо вносить во флаконы по 5,5 см³ тестируемой воды или водной вытяжки донных отложений.

9.7.3 Заполненные флаконы закрывают чистыми полиэтиленовыми пробками с отверстием диаметром 6 мм, подготовленными согласно 9.4. После этого флаконы с пробками строго по вариантам устанавливают в предварительно включенный в сеть культиватор KBM-07. Флаконы загружают в приостановленную кассету по ходу её вращения, т.е. против часовой стрелки.

9.7.4 В конце первого часа эксперимента после стабилизации температуры во флаконах проверяют её значение в контрольной серии. Для этого термометр цифровой «Замер-1» вводят через отверстие в пробке внутрь одного из контрольных флаконов. Чтобы точнее и быстрее произвести замер температуры, необходимо сделать несколько помешивающих движений в измеряемой среде. Если температура оказалась ниже или выше рекомендованной $(25 \pm 1,0)$ °С, культиватор KBM-07 необходимо настроить на поддержание требуемой температуры с помощью регу-

лятора. Измерение температуры надо проводить в одном из флаконов контрольной серии, не выключая культиватор.

9.8 Регистрация значений оптической плотности культуры микроводоросли

9.8.1 Через 43 ч экспозиции проводят пробное измерение оптической плотности культуры микроводоросли во флаконах контрольной серии фотометром ИПС-03 на длине волны 560 нм. Значения оптической плотности культуры должны укладываться в диапазон от 0,120 до 0,180 отн. ед. Если значения близки к верхней границе диапазона, то эксперимент завершают. Если значение в контрольной серии ниже, то эксперимент продолжают до автоматического отключения культиватора KBM-07, запрограммированного на период 45 ч.

9.8.2 Затем повторно измеряют оптическую плотность культуры микроводоросли в контрольной серии. В оптимальных условиях эксперимента увеличение оптической плотности культуры микроводоросли и, следовательно, численности клеток за (45 ± 2) ч составляет порядка 150 раз.

9.8.3 Далее флаконы опытных серий извлекают из культиватора KBM-07 и размещают в штативе, проводят измерение оптической плотности культуры микроводоросли в каждом флаконе фотометром ИПС-03 в соответствии с паспортом и руководством по эксплуатации.

9.8.4 За время эксперимента культура микроводоросли способна дать ряд поколений, на которых проявляется действие загрязняющих веществ, содержащихся в пробах. Эксперимент можно считать успешным, если величины оптической плотности D в контрольной серии были не ниже 0,120 отн. ед. Данные полученных значений оптической плотности культуры микроводоросли вносят в графу 3 таблицы в соответствии с формой приложения Е.

9.9 Расчёт и оценка токсичности проб воды и водных вытяжек донных отложений

9.9.1 О степени токсического действия тестируемой воды или водной вытяжки донных отложений на культуру микроводоросли судят по статистически достоверным значениям отклонений изменений оптической плотности культуры в опытных сериях от контрольной. С этой целью рассчитывают среднее арифметическое значение оптической плотности культуры микроводоросли из четырёх повторностей $\bar{D}$ каждой тестируемой пробы и контрольной серии. Расхождение между максимальным D_{max} и минимальным D_{min} значениями оптической плотности культуры микроводоросли четырех повторностей в пробе и контрольной серии соответственно должны удовлетворять условию

$$|D_{max} - D_{min}| \leq r \cdot 0,01 \cdot \bar{D}, \quad (4)$$

где r – относительное значение предела повторяемости для четырех результатов параллельных определений, для данного биотеста равное 29 %.

9.9.2 При невыполнении условия (4) целесообразно выяснить причины появления неприемлемых результатов параллельных определений и повторить биотест, устранив выявленные причины. Получение значений оптической плотности, не удовлетворяющих условию (4), чаще всего связано с недостаточной чистотой флаконов.

9.9.3 Полученные значения оптической плотности, рассчитанные в виде средних величин из 4 повторностей, вносят в графу 4 таблицы в соответствии с формой приложения Е.

Затем рассчитывают отклонение A , %, среднего значения оптической плотности каждой опытной серии по сравнению с контрольной по формуле

$$A = \frac{(\bar{D}_o - \bar{D}_k)}{\bar{D}_k} \cdot 100, \quad (5)$$

где $\bar{D}_o$ и $\bar{D}_k$ – средние значения оптической плотности в опытной и контрольной сериях соответственно.

9.9.4 Полученные значения отклонений оптической плотности опытных серий от контрольной вносят в графу 5 таблицы в соответствии с формой приложения Е.

9.9.5 Значения отклонений оптической плотности культуры микроводоросли в опытных сериях от значений контрольной серии могут иметь знаки плюс или минус.

Критерием токсичности пробы является отклонение среднего значения оптической плотности опытной серии по сравнению с контрольной на минус 30 % и более в случае подавления роста культуры микроводоросли или ее повышение на 30 % и более – при стимуляции.

Отклонение значений в сторону увеличения свидетельствует о наличии стимулирующего эффекта тестируемой воды на культуру микроводоросли, что может свидетельствовать о присутствии органических веществ или биогенных элементов в водном объекте. Отклонение значений в сторону уменьшения свидетельствует об угнетающем действии на культуру микроводоросли.

9.9.6 При коррекции кислотности пробы учитывают оба результата биотестирования. Однако заключение о токсичности дают по пробе до коррекции кислотности.

9.9.7 Оценку токсичности вносят в графу 8 таблицы в соответствии с формой приложения Е.

9.10 Расчёт и оценка кратности разбавления, снижающего токсичность

9.10.1 В случае, если полученные значения отклонений оптической плотности опытных серий от контрольной выходят за пределы установленного критерия токсичности в виде 30 %-ного подавления роста или в виде 30 %-ного стимулирования роста культуры микроводоросли, то рассчитывают кратность разбавления, снижающего токсичность (далее – КРТ) воды и водной вытяжки донных отложений. Для расчета используют модифицированную формулу, приведенную в ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10 Т 16.1:2:2.3:3.7

$$\text{КРТ} = 10^y, \quad (6)$$

где y – показатель степени КРТ.

Показатель степени КРТ рассчитывают по формуле

$$y = \frac{(\lg P_6 - \lg P_m) \cdot |A_m - 0,3|}{|A_m - A_6|} + \lg P_m, \quad (7)$$

где P_6 – величина разбавления (наибольшая), при которой отклонения A были ниже критерия токсичности;

P_m , – величина разбавления (наименьшая), при которой отклонения были выше критерия токсичности;

A_6 – величина отклонения, соответствующая наибольшему разбавлению, выраженная в долях;

A_m – величина отклонения, соответствующая наименьшему разбавлению, выраженная в долях.

В качестве P_6 и P_m используется та пара наибольших разбавлений, между которыми имеет место переход величины установленного критерия токсичности, рассчитанный по формуле (5).

При этом значение A для варианта с подавлением роста приводится со знаком минус, для варианта со стимуляцией – со знаком плюс.

9.10.2 Если в ряду разбавлений имеются отклонения в оптической плотности как в ту, так и другую сторону, токсичность воды устанавливают по наибольшей величине разбавления, для которой превышен критерий токсичности. Если критерий токсичности не превышен ни при одном из разбавлений воды, включая ее исходный неразбавленный вариант, пробу считают нетоксичной.

9.10.3 Ряд значений кратности разбавлений тестируемой пробы вносят в графу 7 таблицы в соответствии с формой приложения Е. Значение кратности разбавления, снижающего токсичность, вносят в протокол оценки токсичности воды или водных вытяжек донных отложений в соответствии с приложением Ж.

Пример – значения отклонения критерия токсичности для 1, 2, 4, 8 и 16-кратного разбавления тестируемой воды составили соответственно: минус 42 %, минус 33 %, минус 22 %, минус 13 % и минус 2 %. В долях данные значения составили: минус 0,42; минус 0,33; минус 0,22; минус 0,13; и минус 0,02, соответственно. Анализ этих данных показывает, что переход через критерий токсичности в виде 30 %-ного подавления роста (в долях это 0,3) имеет место между разбавлениями тестируемой воды в 2 (P_M) и 4 (P_6) раз. Тогда сначала рассчитывают значение показателя степени КРТ в соответствии с формулой (7), а затем рассчитывают значение КРТ в соответствии с формулой (6)

$$y = \frac{(\lg 4 - \lg 2) \cdot (0,33 - 0,3)}{0,33 - 0,22} + \lg 2 = \frac{(0,6 - 0,3) \cdot 0,03}{0,11} + 0,3 = 0,41$$

$KPT = 10^{0,41} = 2,6$ раза. Таким образом, токсичность тестируемой воды снимается разбавлением в 2,6 раза.

9.11 Оформление результатов биотестирования

Полученные результаты биотестирования оформляют в соответствии с приложением Е.

Итоговую оценку токсичности воды или водных вытяжек донных отложений оформляют в виде протокола в соответствии с приложением Ж.

10 Условия приемлемости результатов биотестирования

Условия приемлемости результатов биотестирования токсичности воды и водных вытяжек донных отложений по изменению оптической плотности культуры микроводоросли сводятся к соблюдению требований отбора проб, хранения, транспортировки, содержания маточной культуры микроводоросли и её чувствительности по данным проверки пригодности, соблюдения процедуры выполнения биотестирования.

Для диапазона измерений оптической плотности культуры микроводоросли от 0,05 до 0,24 отн. ед. включительно:

- показатель повторяемости σ_r должен соответствовать 8 %;
- показатель воспроизводимости σ_R – 13 %;
- предел повторяемости для четырёх параллельных определений r – 29 %;
- предел воспроизводимости R , полученный в разных лабораториях – 39 %.

Приложение А
(справочное)

Характеристика микроводоросли *Chlorella vulgaris*

А.1 Систематическое положение

Отдел	<i>Chlorophyta</i>
Класс	<i>Euchlorophyceae</i>
Порядок	<i>Chlorococcales</i>
Семейство	<i>Chlorellaceae</i>
Подсемейство	<i>Chlorelloideae</i>
Род	<i>Chlorella</i> Beijer
Вид	<i>Chlorella vulgaris</i> Beijer

А.2 Местообитание

Chlorella vulgaris Beijer, 1890 – широко распространенный вид одноклеточных зеленых микроводорослей, обитающих в различных биотопах пресноводных экосистем.

А.3 Морфология, биология

Chlorella vulgaris относится к одноклеточным микроводорослям. Клетки шаровидные с тонкой оболочкой без слизи. Хроматофор чашевидный, с пиреноидом. Размножается автоспорами, которые образуются по 4-8 реже по 16 шт., и освобождаются через разрыв в материнской оболочке. Деление происходит, как правило, один раз в сутки, однако в условиях интенсивной культуры она способна и к более активному размножению (4-8 делений в сут).

Приложение Б
(рекомендуемое)

**Форма акта отбора проб воды или донных отложений
поверхностного водного объекта для биотестирования**

Акт отбора проб воды и донных отложений
поверхностного водного объекта для биотестирования

Дата и время отбора пробы	
ПВО, место отбора пробы	
Номер пробы	
Тестируемые пробы	Вода или донные отложения (нужное подчеркнуть)
Материал сосуда, используемого для отбора проб	Металл, стекло, полиэтилен (нужное подчеркнуть)
Материал сосудов для хранения отобранных проб	Стекло, полиэтилен, политетрафторэтан (нужное подчеркнуть)
Условия отбора: рН; t °С воды ПВО	
Примечание	

Исполнитель

должность

подпись

инициалы, фамилия

Акт отбора проб воды и донных отложений оформляют для каждой отобранной пробы.

Приложение В
(обязательное)

**Форма записи условий проведения биотестирования
воды или водных вытяжек донных отложений**

Условия проведения биотестирования воды или
водных вытяжек донных отложений

Дата и время отбора пробы	
ПВО, место отбора пробы	
Номер пробы	
Тестируемые пробы	Вода или водные вытяжки донных отложений ПВО (нужное подчеркнуть)
Время хранения пробы до начала биотестирования	
Коррекция значения pH тестируемой пробы	Да, нет (нужное подчеркнуть)
Реактив, использованный для коррекции значения pH тестируемой пробы	10%-ный раствор соляной кислоты, 10 %-ный раствор гидроксида натрия (нужное подчеркнуть)
Значение pH тестируемой пробы	
Место и дата проведения биотестирования	
Продолжительность биотестирования, ч	
Методика биотестирования (нормативный документ)	
Кратность разбавлений воды и водных вытяжек донных отложений (для случаев предполагаемого высокого загрязнения)	

Исполнитель

должность

подпись

инициалы, фамилия

Условия проведения биотестирования воды или водных вытяжек донных отложений указывают для каждой отобранной пробы.

Приложение Г (обязательное)

Выращивание маточной культуры микроводоросли *Chlorella vulgaris*

Г.1 Исходную культуру микроводоросли *Chlorella vulgaris* с паспортом можно получить в учреждениях, специализирующихся на ведении культур микроводорослей. Далее в лаборатории выращивают маточную культуру микроводоросли на питательной среде Тамия согласно таблице Г.1 с добавлением микроэлементов (магния, цинка, молибдена, ванадия, меди), состав которых приведен в таблице Г.2.

Культуру микроводоросли выращивают на 25 %-ной питательной среде Тамия, получаемой четырехкратным разбавлением 100 %-ной среды Тамия.

Таблица Г.1 – Состав искусственной питательной среды Тамия

Компонент среды	Концентрация компонента в 100 %-ной среде Тамия, г/дм ³	Концентрация компонента в 2 %-ной среде Тамия, г/дм ³	Масса компонентов среды Тамия для приготовления концентрированных растворов в 200 см ³ дистиллированной воды, г	Объем концентрированных растворов для приготовления 100 %-ной среды Тамия в 1 дм ³ дистиллированной воды, см ³
Калий азотно-кислый	5,0	0,1	20	50
Магния сульфат 7-водный	2,5	0,05	10	50
Калия дигидрофосфат	1,25	0,025	5	50
Железо лимоннокислое	0,003	0,00012 (120 мкг)	0,6 (растворять при кипячении)	2

Таблица Г.2 – Состав растворов микроэлементов, добавляемых в питательную среду Тамия

Раствор микроэлементов	Компоненты растворов	Масса компонентов для приготовления концен- трированных растворов микроэлементов в 250 см ³ дистиллирован- ной воды, мг	Объем концентрированных растворов микроэlemen- тов для приготовления 100%-ной среды Тамия в 1 дм ³ дистиллированной воды, см ³
А	Кислота борная	715	2
	Марганец хлористый 4-водный	453	
	Цинка сульфат 7-водный	64	
Б	Молибдена окись	4,41	2
	Метаванадат аммония	5,74	
Примечание – Раствор Б готовят при нагревании. Затем отдельно каждый раствор стерили- зуют кипячением 30 мин. охлаждают и хранят в холодильнике.			

Г.2 Питательную среду Тамия и растворы всех микроэлементов готовят на основе дистиллированной воды. При регулярном использовании питательную среду удобнее готовить не из навесок, а из их концентрированных растворов (см. таблицы Г.1 и Г.2). При приготовлении 1 дм³ 100%-ной питательной среды Тамия эти растворы последовательно вносят в указанном объеме в 0,5 дм³ дистиллированной воды. Затем добавляют заранее приготовленные растворы микроэлементов и лимоннокислого железа, а общий объем среды доводят дистиллированной водой до 1 дм³. Растворы компонентов среды и микроэлементов, а также приготовленную питательную среду хранят в холодильнике при температуре от 2 °С до 4 °С не более 3 мес.

Засев микроводоросли в культиватор KB-05 производят с начальной оптической плотностью (0,010±0,001) отн. ед. Для этого в (50±5) см³ 25 %-ной питательной среды, приготовленной путем разбавления 100 %-ной среды Тамия дистиллированной водой, вносят (1,0±0,1) см³ культуры микроводоросли с оптической плотностью (0,500±0,020) отн. ед., профильтрованной через 4 слоя марли или вату. После (45±2) ч культивирования оптическая плотность культуры микроводоросли должна достигнуть величины 1,200-1,500 отн. ед. В этом состоянии культура микроводоросли имеет хорошую чувствительность к токсикантам. Измерения оптической плотности проводят после разбавления культуры. Для этого в пенициллиновый флакон вносят 1 см³ выросшей культуры микроводоросли и 5 см³ дистиллированной воды. Полученное значение оптической плотности умножают на 6, чтобы учесть проведенное разбавление культуры.

Маточную культуру микроводоросли поддерживают при регулярном пересеве (через каждые 2 сут) в свежую среду Тамия. Такой режим культивирования позволяет без соблюдения условий стерильности поддерживать альгологически чистую культуру микроводоросли. При перерывах в работе свежевывращенную культуру микроводоросли можно хранить в холодильнике при температуре от 2 °С до 4 °С до 4 мес.

При возобновлении работ по биотестированию хранящуюся культуру микроводоросли следует засеять указанным выше способом и использовать для биотестирования не ранее, чем через 2 сут выращивания в культиваторе KB-05.

Приложение Д (обязательное)

Проверка чувствительности культуры микроводоросли *Chlorella vulgaris*

Перед экспериментом проверяют чувствительность культуры микроводоросли воздействием эталонного токсиканта, в качестве которого используют калий двуххромовокислый ($K_2Cr_2O_7$).

Исходный раствор бихромата калия готовят в концентрации 1 г/дм³. Этот раствор может храниться в холодильнике до 4 месяцев. Рабочие растворы эталонного токсиканта для проведения анализа чувствительности культуры микроводоросли перед биотестированием готовят посредством разбавления исходного раствора дистиллированной водой и в дальнейшем не хранят.

Определение диапазона реагирования культуры микроводоросли на эталонный токсикант проводят в соответствии с процедурой биотестирования, (см 9.7) в четырех повторностях для каждой концентрации токсиканта (0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 мг/дм³). Для получения указанных концентраций исходный раствор бихромата калия 1 г/дм³ разбавляют в 6,25 раза (1 см³ смешать с 5,25 см³ дистиллированной воды) для получения промежуточного раствора 160 мг/дм³.

Затем в 1 пенициллиновый флакон вносят 5 см³ приготовленного раствора модельного токсиканта (160 мг/дм³), в 4 других - по 2,5 см³ дистиллированной воды. Путем последовательного переноса растворов из первого флакона во второй, из второго в третий и т.д. по 2,5 см³ получают ряд разбавлений раствора кратный двум.

После этого в 6 стаканов с одинаковым объемом 48,5 см³ дистиллированной воды вносят: в первый – 0,5 см³ дистиллированной воды, а в остальные – по 0,5 см³ всех пяти приготовленных разбавлений бихромата калия. В результате получают 6 растворов с концентрацией бихромата калия 0 (контрольная серия), 1,6; 0,8; 0,4; 0,2; 0,1 мг/дм³ соответственно.

В завершении во все 6 стаканов добавляют по 1 см³ культуры микроводоросли с оптической плотностью 0,050 отн. ед., приготовленной путем разбавления маточной культуры 100 %-ной средой Тамия. Каждую полученную культуру разливают в 4 пенициллиновых флакона, закрывают пробками с отвертием и устанавливают в культиватор KBM-07.

Культуру микроводоросли можно считать пригодной для биотестирования, а ее чувствительность соответствующей требованиям, если концентрация калия двуххромовокислого, вызвавшая 50 % подавление роста культуры микроводоросли в сравнении с контрольной серией после (45±2) ч экспозиции, находится в интервале от 0,2 до 0,8 мг/дм³. При этом среднее арифметическое значение (из четырех повторностей) оптической плотности $\bar{D}$ культуры микроводоросли в контрольной серии за этот период культивирования должно достигнуть величины (0,15±0,03) отн. ед. Этот же показатель может быть использован для текущего контроля состояния культуры микроводоросли.

При несоответствии этому результату следует проверить точность приготовления растворов эталонного токсиканта и условия проведения биотестирования. Если ошибки при проведении экспериментов исключены, необходимо сменить культуру т.е. взять новую культуру микроводоросли

Chlorella vulgaris с паспортом в учреждениях, специализирующихся на ведении культур микроводорослей или осуществить пересев микроводоросли.

Если значения оптической плотности суспензии микроводоросли в контрольном варианте после 45 ч культивирования регулярно не достигает или существенно превышает ($0,150 \pm 0,03$) отн. ед., следует, соответственно, увеличить или уменьшить интенсивность света в культиваторе KBM-07.

Проверку пригодности культуры микроводоросли к биотестированию проводят один раз в квартал. После продолжительного хранения без пересева состояние маточной культуры микроводоросли проверяют непосредственно перед анализом.

Приложение Е
(обязательное)

**Форма записи полученных значений оптической плотности культуры
микроводоросли и оценки токсичности воды или водных вытяжек
донных отложений**

Полученные значения оптической плотности культуры микроводоросли, оценка токсичности воды или водных вытяжек донных отложений							
Номер пробы	Номер повтор- ности	Оптиче- ская плот- ность, D , отн. ед.	Среднее арифмети- ческое зна- чение опти- ческой плотности, $\bar{D}$, отн. ед.	Отклоне- ние среднего значения от кон- трольной серии, A , %	Время биоте- стирова- ния, ч	Кратность раз- бавления, те- стируемых вод, водных вытя- жек донных отложений (для случаев высокого за- грязнения)	Оценка токсич- ности пробы
1	2	3	4	5	6	7	8
Кон- троль ная серия	1						
	2						
	3						
	4						
Проба 1	1						
	2						
	3						
	4						
Проба 1 (после коррек- ции рН)	1						
	2						
	3						
	4						

Примечание – Оценку токсичности приводят следующим образом: «ТД» – проба ока-
зывает токсическое действие или «нет ТД» – не оказывает токсическое действие.

Исполнитель _____

должность
подпись
инициалы, фамилия

Приложение Ж
(обязательное)

**Форма протокола оценки токсичности
воды или водных вытяжек донных отложений**

Протокол оценки токсичности воды (или водных вытяжек донных отложений)

Дата биотестирования	Место отбора и номер пробы	Тестируемая проба (вода или водная вытяжка донных отложений)	Оценка токсичности пробы	Кратность разбавления, снижающего токсичность (в случае высокого загрязнения)

Примечание – Оценку токсичности приводят следующим образом: «ТД» – проба оказывает токсическое действие или «нет ТД» – не оказывает токсическое действие.

Исполнитель

должность

подпись

инициалы, фамилия

Библиография

- | | | |
|------|---|--|
| [1] | Зенин А.А., Белоусова Н.В., Гидрохимический словарь. – Л.: Гидрометеиздат, 1988. – 238 с. | |
| [2] | Водный кодекс Российской Федерации от 03.06.2006 № 74-ФЗ (в ред. от 02.08.2019) | |
| [3] | Технические условия
ТУ 4437-003-26218570-2006 | Измеритель плотности суспензии
ИПС-03 |
| [4] | Технические условия
ТУ 3615-006-26218570-2007 | Культиватор KB-05 |
| [5] | Технические условия
ТУ 4211-012-26218570-2014 | Климатостат ВЗ |
| [6] | Технические условия
ТУ 4215-002-13245171-01 | Термометр цифровой «Замер–1» |
| [7] | Технические условия
ТУ 4215-008-81696414-2007 | pH-метр любого типа, например,
pH-420 |
| [8] | Технические условия
ТУ 64-1-2451-78 | Аппарат универсальный для встряхивания жидкостей в колбах и пробирках АБУ-6С |
| [9] | Технические условия
ТУ-2-31-32-73 | Пинцет медицинский |
| [10] | Технические условия
ТУ 4320-012-29508133-2009 | Чаша кристаллизационная |
| [11] | Технические условия
ТУ 6-19-6-70 | Склянки и банки стеклянные с винтовым горлом, с прокладкой и крышкой или с притертой пробкой для отбора и хранения проб |
| [12] | Технические условия
ТУ 6-19-45 | Флаконы и банки цилиндрические полиэтиленовые или политетрафторэтановые с навинчивающимися крышками для отбора и хранения проб |
| [13] | Технические условия
ТУ 6-09-2562-77 | Железо лимоннокислое |
| [14] | Технические условия
ТУ 6-09-4471-77 | Молибден (VI) окись квалификации химически чистый, чистый для анализа и чистый |
| [15] | Технические условия
ТУ 6-09-1678-95 | Фильтры обеззоленные (белая, красная, синяя ленты) |
| [16] | Строительные нормы и правила
СНиП 21-01-97 | Пожарная безопасность зданий и сооружений (с Изменениями № 1, 2) |

Ключевые слова: оценка токсичности, вода, водная вытяжка донных отложений, поверхностные водные объекты, биотестирование, оптическая плотность, микроводоросли, фотометр

Лист регистрации изменений

Порядко вый номер изме- нения	Номер страницы				Номер реги- страции из- менения в ГОС, дата	Подпись	Дата	
	изменён ной	заменён ной	новой	анну- лиро- ванной			внесения изм.	введения изм.