
**КОМИТЕТ СОЮЗНОГО ГОСУДАРСТВА ПО ГИДРОМЕТЕОРОЛОГИИ
И МОНИТОРИНГУ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПРИРОДНОЙ СРЕДЫ**

ТИПОВЫЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

**РТ 15–
2021**

**ОПЕРАТИВНАЯ ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ
ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ (В ТОМ ЧИСЛЕ
ТРАНСГРАНИЧНЫХ УЧАСТКОВ) ПРИ АВАРИЙНОМ
ЗАГРЯЗНЕНИИ С ПОМОЩЬЮ БИОТЕСТИРОВАНИЯ
НА ПОПУЛЯЦИЯХ ГИДРОБИОНТОВ**

Ростов-на-Дону

Предисловие

1 РАЗРАБОТАНЫ федеральным государственным бюджетным учреждением «Гидрохимический институт» (ФГБУ «ГХИ»)

2 РАЗРАБОТЧИКИ Л.М. Предеина, канд. хим. наук (руководитель разработки); Т.А. Хоружая, д-р биол. наук (ответственный исполнитель); Н.А. Мартышева

3 СОГЛАСОВАНЫ:

- с Федеральным государственным бюджетным учреждением «Научно-производственное объединение «Тайфун» (ФГБУ «НПО «Тайфун») 07.09.2021;

- с Управлением государственной наблюдательной сети и научных исследований (УГСН) Росгидромета 09.11.2021;

- с Управлением мониторинга загрязнения окружающей среды, полярных и морских работ (УМЗА) Росгидромета 28.10.2021;

- с государственным учреждением «Республиканский центр по гидрометеорологии, контролю радиоактивного загрязнения и мониторингу окружающей среды» (Белгидромет) 02.09.2021

4 ОДОБРЕНЫ решением совместной коллегии Комитета Союзного государства по гидрометеорологии и мониторингу загрязнения природной среды от 24–25 ноября 2021 г. № 72/7

5 УТВЕРЖДЕНЫ руководителем Комитета Союзного государства по гидрометеорологии и мониторингу загрязнения природной среды 25.11.2021

6 ЗАРЕГИСТРИРОВАНЫ головной организацией по стандартизации Росгидромета ФГБУ «НПО «Тайфун» 29.11.2021

ОБОЗНАЧЕНИЕ ТИПОВЫХ РЕКОМЕНДАЦИЙ РТ 15–2021

7 РАЗРАБОТАНЫ ВПЕРВЫЕ

8 СРОК ПРОВЕРКИ 2026 год

Содержание

1 Область применения	1
2 Нормативные ссылки.....	1
3 Термины и определения	4
4 Сокращения	9
5 Особенности биотестирования при аварийном загрязнении поверхностных водных объектов	10
5.1 Цели, задачи и основные принципы биотестирования при аварийном загрязнении.....	10
5.2 Требования к оперативности биотестирования	11
6 Подготовка тест-объектов	12
6.1 Подготовка тест-объектов из природных популяций гидробионтов	12
6.1.1 Выбор условно чистого участка для отлова гидробионтов.....	12
6.1.2 Получение тест-объектов из природных популяций.....	13
6.2 Подготовка тест-объектов из лабораторных культур.....	15
6.3 Преимущества и ограничения использования гидробионтов из природных популяций в случае аварийного загрязнения	16
7 Отбор проб для биотестирования	16
8 Подготовка проб для биотестирования.....	17
9 Выполнение биотестирования на гидробионтах из природных популяций и лабораторных культур.....	18
9.1 Общие положения.....	18
9.2 Постановка токсикологического эксперимента.....	21
9.3 Регистрация показателей и оценка токсичности по результатам биотестирования.....	25
9.3.1 Регистрация и расчет показателей токсичности	25
9.3.2 Оценка токсичности проб воды и донных отложений ...	26
10 Оценка соответствия результатов биотестирования нормативным требованиям	27

11 Оценка токсического загрязнения поверхностного водного объекта или его участка по результатам биотестирования.....	28
12 Условия приемлемости результатов биотестирования воды и донных отложений.....	29
13 Требования к технике безопасности и квалификации исполнителей	30
Приложение А (справочное) Перечень методик биотестирования проб воды и донных отложений для оперативной оценки токсического загрязнения поверхностных водных объектов при аварийном загрязнении	31
Приложение Б (рекомендуемое) Форма записи характеристик проб воды и донных отложений	33
Приложение В (рекомендуемое) Определение чувствительности тест-объектов	34
Приложение Г (справочное) Основные этапы биотестирования проб воды и донных отложений на тест-объектах из природных популяций и лабораторных культур гидробионтов	37
Приложение Д (рекомендуемое)- Формы представления результатов биотестирования проб воды и донных отложений	38
Библиография.....	41

Введение

Основная специфика большинства аварийных ситуаций на водных объектах – кратковременность воздействия загрязняющих веществ при высоких концентрациях в начальный период. Это ставит задачу проведения оперативных наблюдений за токсичностью проб воды и донных отложений водного объекта или его участков, в том числе трансграничных, при аварийном загрязнении.

Наиболее приемлемым выходом из создавшейся ситуации является введение в практику государственного мониторинга состояния и загрязнения окружающей среды в части поверхностных водных объектов методов биотестирования для интегральной оценки токсичности проб воды и донных отложений. Результаты биотестирования при использовании в комплексе с результатами биоиндикации и химического анализа позволяют получить наиболее полную информацию об эколого-токсикологическом состоянии водных объектов.

Биотестирование является методом оценки качества и загрязненности воды и донных отложений водотоков и водоемов по ответным реакциям водных организмов (гидробионтов), называемых тест-объектами. Биотестирование позволяет получить интегральную оценку токсичности опасных загрязняющих веществ в их взаимодействии в поверхностных водных объектах; такой результат невозможно получить в результате химического анализа.

Биотестирование не является строго количественным методом, а оценки токсичности носят экспертный характер. В этой связи результаты биотестирования должны рассматриваться как сигнальная информация о наличии токсичности и выявленных участках с токсическим загрязнением.

Определение токсичности проб воды и донных отложений на основе биотестирования в пунктах наблюдений, подвергающихся

наиболее значительной антропогенной нагрузке, предусмотрено одним из основополагающих руководящих документов Росгидромета – РД 52.24.309, устанавливающим требования к организации и проведению режимных наблюдений за состоянием и загрязнением поверхностных водных объектов.

К настоящему времени разработано и апробировано большое число методик биотестирования (биотестов). Тем не менее, в условиях аварийной ситуации на водном объекте должны быть использованы биотесты, соответствующие определенным требованиям, прежде всего по экспрессности. Большинство из известных биотестов не являются экспрессными и позволяют получить результат о наличии острой токсичности воды за период от 72 ч до 96 ч. Повышение экспрессности биотестов в случаях аварийного загрязнения – одно из основных направлений оптимизации работ. Необходим выбор методик и тест-объектов, позволяющих получить результат биотестирования в максимально сжатые сроки.

Возможны два варианта получения тест-объектов для выполнения биотестирования:

1) отлов гидробионтов непосредственно на обследуемом водном объекте из природных популяций, обитающих на условно чистых участках, одновременно с отбором проб на оценку их токсичности с помощью биотестирования;

2) культивирование гидробионтов в лаборатории на специальных средах и доставка лабораторных культур к месту работ по биотестированию.

Биотестирование на гидробионтах из природных популяций используется на практике пока недостаточно. Одна из причин – отсутствие нормативных документов с описанием соответствующей технологии биотестирования. Биотестирование на природных популяциях устраняет этап лабораторного культивирования тест-

VI

объектов, что способствует повышению оперативности получения результатов. При этом увеличивается их надежность благодаря устранению стрессового влияния природной воды, отличающейся по составу от воды культивирования.

В настоящих типовых рекомендациях описаны методы получения и использования в биотестировании тест-объектов из природных популяций и лабораторных культур для оперативной оценки токсического загрязнения поверхностных водных объектов (в том числе трансграничных участков) при аварийном загрязнении.

ТИПОВЫЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ОПЕРАТИВНАЯ ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ (В ТОМ ЧИСЛЕ ТРАНСГРАНИЧНЫХ УЧАСТКОВ) ПРИ АВАРИЙНОМ ЗАГРЯЗНЕНИИ С ПОМОЩЬЮ БИОТЕСТИРОВАНИЯ НА ПОПУЛЯЦИЯХ ГИДРОБИОНТОВ

Дата введения – 2022–04–01

Срок действия – до 2027–04–01

1 Область применения

Настоящие типовые рекомендации устанавливают методы оперативной оценки токсического загрязнения поверхностных водных объектов (в том числе трансграничных участков) при аварийном загрязнении с помощью биотестирования воды и донных отложений на гидробионтах из природных популяций и из лабораторных культур.

Настоящие типовые рекомендации предназначены в качестве методической основы для учреждений Федеральной службы по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды и подразделений государственного учреждения «Республиканский центр по гидрометеорологии, контролю радиоактивного загрязнения и мониторингу окружающей среды», осуществляющих организацию и проведение наблюдений за состоянием поверхностных водных объектов, а также для использования природоохранными и научными организациями.

2 Нормативные ссылки

В настоящих типовых рекомендациях использованы ссылки на следующие нормативные документы:

ГОСТ 17.1.3.07–82 Охрана природы. Гидросфера. Правила контроля качества воды водоемов и водотоков

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

ГОСТ 4220–75 Реактивы. Калий двухромовокислый. Технические условия

ГОСТ 19179–73 Гидрология суши. Термины и определения

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

ГОСТ 29227–91 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 1. Общие требования

ГОСТ OIML R 76-1–2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

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

ГОСТ Р 56236–2014 (ИСО 6341:2012) Вода. Определение токсичности по выживаемости пресноводных ракообразных *Daphnia magna Straus*

ГОСТ Р 58144–2018 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ Р 59053–2020 Охрана окружающей среды. Охрана и рациональное использование вод. Термины и определения

ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.2-98 Определение токсичности проб природных, питьевых, хозяйственно-питьевых, хозяйственно-бытовых сточных, очищенных сточных, сточных, талых, технологических вод экспресс-методом с применением прибора серии «Биотестер»

ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.12-06 Токсикологические методы анализа. Методика измерений количества *Daphnia magna Straus* для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных

вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления методом прямого счета

Р 52.24.734-2010 Организация и проведение наблюдений за состоянием и изменением качества поверхностных вод в чрезвычайных ситуациях

Р 52.24.741-2010 Оценка токсичности поверхностных вод суши в условиях чрезвычайных ситуаций методом экспрессного биотестирования

Р 52.24.763-2012 Оценка состояния пресноводных экосистем по комплексу химико-биологических показателей

РД 52.24.309-2016 Организация и проведение режимных наблюдений за состоянием и загрязнением поверхностных вод суши

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

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

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

ТКП 17.13-08-2013 (02120) Охрана окружающей среды и природопользование. Отбор проб и проведение измерений, мониторинг. Правила определения состояния (статуса) водотоков по гидрохимическим показателям

ТКП 17.13-10-2013 (02120) Охрана окружающей среды и природопользование. Аналитический контроль и мониторинг. Правила определения экологического (гидробиологического) статуса речных экосистем

ТКП 17.13-13-2013 (02120) Охрана окружающей среды и природопользование. Аналитический контроль и мониторинг. Правила проведения наблюдений при аварийном загрязнении поверхностных вод

ТКП 17.13-04-2014 (02120) Охрана окружающей среды и природопользование. Отбор проб и проведение измерений, мониторинг. Порядок проведения наблюдений за состоянием поверхностных вод по гидрохимическим и гидробиологическим показателям

Примечание – При пользовании настоящими типовыми рекомендациями целесообразно проверять действие следующих ссылочных нормативных документов на территории Российской Федерации и Республики Беларусь:

- стандартов – в информационной системе общего пользования – на официальных сайтах Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год и Государственного комитета по стандартизации Республики Беларусь в сети Интернет на сайте Национального фонда технических нормативных правовых актов Республики Беларусь по каталогу, составленному по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году;

- нормативных документов Росгидромета – по РД 52.18.5 [1] и ежегодно издаваемому информационному указателю нормативных документов;

- технических кодексов установившейся практики Белгидромета – в глобальной компьютерной сети Интернет на сайте Национального фонда технических нормативных правовых актов Республики Беларусь по каталогу, составленному по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим информационным указателям, опубликованным в текущем году.

Если ссылочный документ заменен (изменен), то при пользовании настоящими типовыми рекомендациями следует руководствоваться замененным (измененным) нормативным документом. Если ссылочный документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящих типовых рекомендациях применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 аварийное загрязнение водных объектов: Загрязнение, обусловленное различными чрезвычайными ситуациями на водных объектах, прежде всего аварийными сбросами загрязняющих веществ [2].

3.2 биологическая индикация воды (биоиндикация): Метод оценки качества воды по наличию водных организмов, являющихся индикаторами ее загрязненности или трофности.

3.3 биологическое тестирование воды или донных отложений (биотестирование): Метод оценки качества воды или донных отложений по их токсичности на основе анализа ответных реакций тест-объектов (гидробионтов) в токсикологическом эксперименте (РД 52.24.868).

3.4 биотест (методика биотестирования): Совокупность приемов получения информации о токсичности объектов окружающей среды (воды, донных отложений или других сред) на основе регистрации реакций тест-объектов.

3.5

водный объект: Природный или искусственный водоем, водоток либо иной объект, постоянное или временное сосредоточение вод в котором имеет характерные формы и признаки водного режима.

[ГОСТ Р 59053–2020, статья 8]

3.6 гидробионты: Все живые организмы, животные и растительные, постоянно обитающие в водной среде и донных отложениях водоемов и водотоков, играющие важную роль в формировании химического состава и гидрохимического режима водных объектов [2].

3.7

донные отложения: Донные наносы и твердые частицы, образовавшиеся и осевшие на дно в результате внутриводоемных физических, химических и биологических процессов, в которых участвуют вещества как естественного, так и антропогенного происхождения.

[ГОСТ Р 59053–2020, статья 22]

3.8 загрязнение токсическое: Загрязнение воды водоемов и водотоков токсичными веществами (РД 52.24.635).

3.9

загрязненность вод: Содержание загрязняющих воду веществ, микроорганизмов и тепла, вызывающее нарушение требований к качеству воды.

[ГОСТ Р 59053–2020, статья 15]

3.10 загрязняющее вещество: Вещество, вызывающее нарушение норм качества воды [2].

3.11

зона влияния источника загрязнения: Часть водоема или водотока, в которой превышены фоновые показатели качества воды, но нарушений нормативов качества воды не наблюдается.

[ГОСТ 17.1.3.07–82, приложение 1]

3.12

качество воды: Характеристика состава и свойств воды, определяющая ее пригодность для конкретных видов водопользования.

[ГОСТ Р 59053–2020, статья 70]

3.13 кратковременное биотестирование: Биологическое тестирование проб воды или донных отложений, результаты которого могут быть получены в течение 24 ч.

3.14 критерий токсичности: Количественная характеристика тест-реакции в токсикологическом эксперименте (РД 52.24.868).

3.15 мониторинг окружающей среды: Комплексная система наблюдений за состоянием окружающей среды, оценки и прогноза её изменений под действием природных и антропогенных факторов [2].

3.16 нативная проба донных отложений: Проба донных отложений без какой-либо дополнительной предварительной обработки (РД 52.24.868).

3.17 острое токсическое действие; ОТД: Эффект воздействия на тест-объект, который проявляется за относительно короткий период времени (от нескольких минут до нескольких суток).

3.18

поверхностные водные объекты: Постоянное или временное сосредоточение вод на поверхности суши в формах ее рельефа, имеющее границы, объем и черты водного режима.

Примечания

1 Поверхностные водные объекты состоят из поверхностных вод и покрытых ими земель в пределах береговой линии.

2 К поверхностным водным объектам относятся моря или их отдельные части (проливы, заливы, в т.ч. бухты, лиманы и др.); водотоки (реки, ручьи, каналы); водоемы (озера, пруды, обводненные карьеры, водохранилища); болота; природные выходы подземных вод (родники, гейзеры); ледники, снежники.

[ГОСТ Р 59053–2020, статья 45]

3.19

поверхностные воды: Воды, находящиеся на поверхности суши в виде различных водных объектов.

[ГОСТ 19179–73, статья 7]

3.20 показатель гибели тест-объектов: Отклонение количества погибших тест-объектов в опытной серии токсикологического эксперимента от контрольной серии, выраженное в процентах.

3.21 показатель хемотаксиса парameций: Количество парameций, переместившихся из культуральной среды в тестируемую пробу воды, выраженное в процентах.

3.22 подострое токсическое действие; пОТД: Воздействие, при котором критерий токсичности по ответной реакции тест-объекта достигается за более длительный промежуток времени, чем ОТД. Экспозиция для выявления пОТД составляет от 2 до 7 сут в зависимости от биологических особенностей вида тест-объекта (РД 52.24.868).

3.23 показатели токсичности (токсикологические показатели):

Показатели, на основании которых делают выводы о вредном действии вещества или загрязненной воды для водного организма (РД 52.24.868).

3.24 популяция: Совокупность особей одного вида, находящихся во взаимодействии между собой и совместно населяющих общую территорию [2].

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

3.26 тест-реакция: Реакция тест-объекта, используемая для определения токсичности проб воды (РД 52.24.868).

3.27 токсикологический эксперимент: Эксперимент в водной токсикологии, в ходе которого оценивают влияние на тест-объект тестируемой воды, донных отложений или химического вещества (например, эталонного токсиканта) (РД 52.24.868).

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

3.29 трансграничные водные объекты: Поверхностные и подземные водные объекты, которые обозначают, пересекают границу между двумя или более иностранными государствами или по которым протекает Государственная граница Российской Федерации [3].

3.30 условно чистый участок: Участок, расположенный вне зоны влияния источника загрязнения (обычно это фоновый створ).

3.31 фоновый участок водного объекта: Участок водного объекта, состояние поверхностных вод которого формируется под влиянием общебиосферных явлений без наложения на них региональных антропогенных воздействий (ТКП 17.13-04).

3.32 фоновый створ наблюдений: Створ, расположенный на расстоянии не менее 1 км выше источника загрязнения [4].

3.33 хемотаксис: Движение микроорганизмов, некоторых подвижных клеток многоклеточных организмов или клеточных органелл, направленное к раздражителю или от него и обусловленное пространственными различиями концентраций какого-либо вещества.

3.34 хроническое токсическое действие; ХТД: Воздействие, при котором критерий токсичности по ответной реакции тест-объекта достигается за относительно длительный промежуток времени – от 3 до 30 сут в зависимости от биологических особенностей вида тест-объекта (РД 52.24.868).

3.35 экспозиция: Период времени, в течение которого тест-объект находится под воздействием исследуемого фактора, например, тестируемой воды или химического вещества (РД 52.24.868).

3.36 экспрессная методика биотестирования: Методика биотестирования, позволяющая получить результат в течение 2-3 ч.

3.37 эталонный токсикант: Токсичное химическое вещество, используемое для установления чувствительности тест-объекта, например, калий двуххромовоокислый.

4 Сокращения

В настоящих типовых рекомендациях введены и применены следующие сокращения:

- Белгидромет – государственное учреждение «Республиканский Центр по гидрометеорологии, контролю радиоактивного загрязнения и мониторингу окружающей среды»;
- ОТД – острое токсическое действие (острая токсичность);
- ПОТД – подострое токсическое действие (подострая токсичность);
- Росгидромет – Федеральная служба по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды;
- ХТД – хроническое токсическое действие (хроническая токсичность).

5 Особенности биотестирования при аварийном загрязнении поверхностных водных объектов

5.1 Цели, задачи и основные принципы биотестирования при аварийном загрязнении

Суть методик биотестирования заключается в одновременном проведении эксперимента на пробе воды или донных отложений с исследуемого участка водного объекта (опытной) и пробе с условно чистого участка (контрольной) и установлении различий между результатами. Тест-объекты из природных популяций и лабораторных культур помещают в тестируемую среду (природную воду или нативные донные отложения) и выдерживают в ней в течение определенного времени (экспозиции), периодически регистрируя показатели токсичности.

Показателями токсичности служат тест-реакции, сопровождающиеся патологическими изменениями, возникающими у тест-объектов под влиянием тестируемой среды, вплоть до их гибели, а критериями токсичности – количественные характеристики тест-реакций.

Критерии токсичности обычно выражают в виде отклонения количественных характеристик тест-реакций от контроля в процентах. Разные методики биотестирования основаны на использовании различных показателей и критериев токсичности.

В результате биотестирования устанавливают наличие и степень токсичности пробы воды или донных отложений. Степень токсичности может быть выражена двумя способами:

1) острое, подострое или хроническое токсическое действие тестируемой среды на гидробионтов (ОТД, ПОТД или ХТД соответственно);

2) условно нетоксичная, токсичная, высоко токсичная, экстремально токсичная тестируемая среда для гидробионтов.

Задачей биотестирования в случаях аварийного загрязнения является выявление ОТД воды и донных отложений на тест-объекты и, в случае его

обнаружения, определение кратности разбавления воды, устраняющей ОТД.

Целевое назначение биотестирования сводится к выполнению следующих задач:

- найти и обозначить участки, подвергшиеся токсическому загрязнению;
- оценить статус экологического благополучия водного объекта и его изменения вследствие аварийного загрязнения;
- оценить в комплексе с данными биоиндикации и гидрохимическими показателями эколого-токсикологическое состояние водного объекта.

Методики биотестирования не позволяют прогнозировать отдаленные биологические эффекты токсичных веществ [5]. В связи с этим результаты биотестирования следует рассматривать как сигнальную информацию о наличии и степени токсического загрязнения воды и донных отложений на отдельных участках водного объекта.

5.2 Требования к оперативности биотестирования

5.2.1 Отличительная особенность оперативной оценки токсичности при аварийном загрязнении является необходимость быстрого получения результата, для чего используют методики кратковременного биотестирования. Они должны обеспечивать получение результата биотестирования до 24 ч экспозиции тест-объектов в тестируемой воде.

5.2.2 Наиболее быстрые результаты (в течение 0,5-2 ч) можно получить с помощью экспрессных методик биотестирования, в которых используются в качестве тест-объектов инфузории.

При биотестировании на низших ракообразных (цериодафниях, дафниях, представителях зоопланктона из природных популяций) и на макрозообентосе результат может быть получен за 24 ч в случаях высокого или экстремально высокого загрязнения воды по гидрохимическим показателям. Если гибели тест-объектов в течение этого времени не происходит, то результат биотестирования обозначают как «отсутствие ОТД».

Показатели ПОТД и ХТД воды и донных отложений для оперативной оценки не используют, так как их устанавливают при более длительной экспозиции.

5.2.3 Характер поведенческих реакций, регистрируемых сразу же после помещения тест-объектов в тестируемую воду, может быть индикатором токсического действия воды и влияния отдельных загрязняющих веществ. Например, при наличии пленки нефтяного загрязнения наблюдается перемещение рачков в поверхностный слой воды из-за дефицита кислорода [6]. Наиболее надежным признаком токсичности воды является ее летальный эффект, определяемый по показателю гибели тест-объектов.

Для получения наиболее оперативного и надежного результата биотестирования используют тест-реакции:

- хемотаксис инфузорий;
- гибель низших ракообразных;
- гибель хирономид.

Перечень соответствующих методик биотестирования приведен в приложении А.

6 Подготовка тест-объектов

6.1 Подготовка тест-объектов из природных популяций гидробионтов

6.1.1 Выбор условно чистого участка для отлова гидробионтов

Для получения тест-объектов из природных популяций отлавливают гидробионтов из популяций зоопланктона и макрозообентоса, обитающих на условно чистом участке обследуемого водного объекта, т.е. на фоновом участке или фоновом створе реки, установленных при

проведении наблюдений за состоянием и загрязнением поверхностных водных объектов Российской Федерации или Республики Беларусь.

Если невозможно найти условно чистый участок, то для отлова тест-объектов используют участок, расположенный выше зоны влияния источника загрязнения на расстоянии не менее 1 км.

6.1.2 Получение тест-объектов из природных популяций

6.1.2.1 Для отлова тест-объектов используют традиционные способы и устройства для отбора качественных проб зоопланктона и макрозообентоса [7]. Гидробионты должны быть отобраны из одного места обитания. В качестве тест-объектов выбирают любых гидробионтов примерно одного размера, встречающихся в массовых количествах.

6.1.2.2 Зоопланктон рекомендуется отлавливать на мелководье, в зарослях водной растительности, так как в этих местах наиболее интенсивно проходят процессы самоочищения воды.

Из представителей зоопланктона в массовых количествах могут присутствовать низшие ракообразные: дафнии, цериодафнии, моины, симоцефалюсы, скафалоберисы, каляноиды и др. (например, *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia reticulata*, *Moina macroscopa*). Наиболее простым и доступным способом отлова тест-объектов является процеживание 100-300 дм³ воды с помощью качественной сети Апштейна из планктонного газа, снабженной металлическим стаканчиком с краном. Для этого последовательно отбирают ведром или другим сосудом по 10 дм³ воды и осторожно процеживают ее через сеть Апштейна. Большая часть сети должна находиться в толще воды. Другой способ отлова зоопланктона заключается в многократном протягивании сети Апштейна в толще воды. Когда количество организмов зоопланктона окажется достаточным, содержимое стаканчика осторожно выливают через кран с полиэтиленовой трубкой на конце в любой сосуд из нетоксичного материала, например, в

стеклянные банки вместимостью 0,5 дм³. При выливании содержимого стаканчика трубка должна касаться стенки сосуда. Сосуды заполняют этой же природной водой полностью (под крышку), чтобы при транспортировке к месту проведения биотестирования не травмировать организмы. Процедуру отлова зоопланктона повторяют не менее 3 раз, помещая организмы в разные сосуды. Одновременно отбирают пробы воды для биотестирования объемом 2 дм³.

6.1.2.3 В лаборатории организмы осторожно переносят в стеклянные стаканы вместимостью 600 см³, в которые предварительно наливают воду из условно чистого участка водотока. Гидробионтов используют сразу после отлова или оставляют до проведения биотестирования в стаканах в лабораторном помещении, но не более чем на 1 сут. Кормление не проводят, так как корм содержится в природной воде.

Перед биотестированием специалист-гидробиолог должен установить таксономическую принадлежность отловленных организмов, выбранных для использования в качестве тест-объектов.

6.1.2.4 Из представителей донных организмов чаще всего используют личинки хирономид и поденок, а также олигохеты. Особенности жизнедеятельности и мест обитания личинок хирономид в донных отложениях описаны в РД 52.24.635.

Из хирономид и поденок предпочтительно выбирать личинок старшего возраста. У хирономид они более крупные, а у поденок имеют зачатки крыльев. Личинок отлавливают до вылета взрослых особей (имаго) в их типичных местообитаниях: на участках с илистым дном и с тихим течением воды или там, где оно отсутствует.

Можно использовать также личинок насекомых *Plecoptera* (веснянок), *Trichoptera* (ручейников).

6.1.2.5 На прибрежных участках представителей макрозообентоса отлавливают скребком или сачком в зоне погруженных в воду растений. На глубоководных участках отбирают донные отложения с организмами

макрозообентоса с помощью дночерпателей, скребков, драг и тралов различной конструкции. На песчаных участках рек донные отложения с макрозообентосом отбирают дночерпателем Петерсена с малой площадью захвата.

Донные отложения порциями помещают в капроновое сито, промывают водой, для чего сито осторожно опускают в воду и вращают его. Личинки хирономид при этом всплывают на поверхность, и их легко собрать аквариумным сачком. Личинки хирономид обычно находятся в верхнем слое донных отложений, но при неблагоприятных условиях выползают на поверхность. Зимой донные отложения достают из проруби.

6.1.2.6 Хранить личинки хирономид и поденок допускается в течение 8-12 дней после отлова при температуре от 2 °С до 6 °С в низких стеклянных сосудах (например, в кристаллизаторах или в чашках Петри), закрывая их. На дно сосуда помещают слой песка высотой 1-2 см и наливают природную воду с места отлова так, чтобы ее уровень был выше слоя песка на 1-2 мм. Личинки хирономид размещают слоем не более 1 см, покрывают сверху влажной тканью. Воду меняют ежедневно, сливая ее и заменяя на свежую из пробы, отобранной на условно чистом участке и хранящейся холодильнике при температуре от 5 °С до 8 °С. Перед использованием температуру воды доводят до комнатной.

6.2 Подготовка тест-объектов из лабораторных культур

Лабораторные культуры тест-объектов можно получить в ряде учреждений, располагающих устойчивыми культурами. Их адаптируют к условиям содержания в лаборатории и поддерживают в состоянии, соответствующем необходимой чувствительности.

Подготовку тест-объектов из лабораторных культур для биотестирования проводят согласно применяемым методикам, приведенным в приложении А.

Особенности тест-объектов и их культивирование в лаборатории описаны в РД 52.24.868.

6.3 Преимущества и ограничения использования гидробионтов из природных популяций в случае аварийного загрязнения

6.3.1 Биотестирование на гидробионтах из природных популяций имеет определенные преимущества по сравнению с использованием лабораторных культур. Наиболее существенным из них является то, что гидробионты с относительно незагрязненных участков реки, помещенные в воду, отобранную на загрязненном участке этой реки, вследствие их естественной адаптации к среде обитания, будут реагировать главным образом на загрязнение токсичными веществами. Тем самым достигается более точный результат по оценке токсичности, чем в случае использования лабораторных культур.

При использовании тест-объектов из природных популяций исключаются этап их культивирования в лаборатории и процедура определения чувствительности адаптированных к естественному составу и свойствам природной воды тест-объектов. Это позволяет повысить оперативность получения результатов биотестирования.

6.3.2 Несмотря на эти очевидные преимущества биотестирования с использованием гидробионтов из природных популяций, их применение имеет ряд ограничений. При сильном цветении воды в реке и низкой численности зоопланктона в холодный период года отлов гидробионтов из природных популяций может быть затруднен. В этом случае при аварийной ситуации биотестирование проводят на тест-объектах из лабораторных культур.

7 Отбор проб для биотестирования

7.1 Отбор проб воды и транспортировку выполняют согласно РД 52.24.309. Используемая для отбора и транспортировки проб

полиэтиленовая или стеклянная посуда должна быть тщательно вымыта, ополоснута дистиллированной водой и высушена. Для мытья посуды используют хромовую смесь или гидрокарбонат натрия. Опасные для гидробионтов органические растворители и поверхностно-активные вещества для мытья посуды применять не допустимо. На месте отбора проб маркированную посуду трижды ополаскивают отобранной из водного объекта водой, а затем заполняют доверху. Желательно, чтобы при закрытии посуды крышкой не оставалось пузырьков воздуха. Это позволит при транспортировке предотвратить взбалтывание и сохранить исходный состав пробы воды.

7.2 Отбор проб донных отложений для биотестирования, транспортировку и хранение проводят в соответствии с РД 52.24.609. На этом же участке отбирают воду (по возможности из придонного слоя), которую используют при биотестировании донных отложений. Из проб донных отложений удаляют различные механические примеси (обломки раковин, камней, мусор и др.) и помещают их в стеклянную посуду или полиэтиленовые пакеты.

Консервирование проб воды и донных отложений не допускается. Отобранные пробы воды и донных отложений помещают в холодильник. Биотестирование воды и донных отложений проводят не позднее, чем через 1 сут после отбора проб.

Характеристику проб воды и донных отложений записывают по форме, приведенной в приложении Б.

8 Подготовка проб для биотестирования

8.1 Подготовка проб воды и донных отложений для определения их токсичности проводят в соответствии с РД 52.24.868. Перед биотестированием, с целью удаления природной биоты, пробы воды

фильтруют через мельничный газ или фильтровальную бумагу (белая лента). Профильтрованные пробы воды оставляют в лабораторном помещении до выравнивания их температуры с комнатной, затем измеряют pH и концентрацию растворенного кислорода для определения соответствия значений этих гидрохимических показателей диапазону оптимальных условий жизнедеятельности тест-объектов. Гидрохимические показатели не корректируют.

8.2 Рекомендуется уточнить показатели минерализации тестируемой воды, так как в некоторых водных объектах вода может иметь повышенную минерализацию, что скажется на результате биотестирования воды вследствие несоответствия оптимальным условиям жизнедеятельности тест-объекта. Если минерализация превышает 1 г/дм³, биотестирование проводят на тест-объектах из природных популяций, отловленных на фоновом участке реки и соответственно адаптированных к повышенной минерализации воды.

8.3 Биотестирование донных отложений проводят на нативных пробах.

9 Выполнение биотестирования на гидробионтах из природных популяций и лабораторных культур

9.1 Общие положения

9.1.1 Для оценки токсичности проб воды рекомендуется использовать кратковременное биотестирование на организмах зоопланктона. Биотестирование проб воды проводят, используя тест-объекты из природных популяций или лабораторных культур низших ракообразных (*Daphnia magna*, *Ceriodaphnia affinis*, *C. reticulata* и др.). При

биотестировании на инфузориях *Paramecium caudatum* (далее – парамеции) используют только лабораторные культуры.

Для биотестирования проб нативных донных отложений следует использовать в качестве тест-объектов организмы макрозообентоса. Массовыми представителями макрозообентоса являются обычно личинки хирономид видов *Chironomus plumosus*, *Ch. dorsalis*, *Ch. riparius*, *Ch. semireductus*. Они занимают важное место в водной экосистеме и трофической цепи (в том числе играют большую роль в пищевом рационе рыб). В соответствии с ТКП 17.13-13 в Республике Беларусь при аварийном загрязнении рек обязательно проводится гидробиологический анализ состояния макрозообентоса.

Результаты кратковременного биотестирования наиболее надежны, поскольку в этом случае изменения состава проб тестируемой воды и донных отложений, вследствие химических и биологических процессов, минимальны.

В результате кратковременного биотестирования устанавливают ОТД по показателю гибели тест-объектов. Критерием ОТД проб воды и донных отложений является увеличение показателя гибели тест-объектов на 50 % и более в опытной серии по сравнению с контрольной при экспозиции до 24 ч.

9.1.2 При авариях, когда загрязненность воды может резко возрасти до уровня высокого или экстремально высокого загрязнения, ОТД может выявляться уже в первые часы биотестирования. В этом случае следует определить кратность разбавления, устраняющую ОТД. Для этого ставят дополнительную серию биотестирования с разбавлением проб воды в 2; 10; 25; 50; 100 и 500 раз. Разбавление проводят природной водой, отобранной на условно чистом участке реки, или дехлорированной водопроводной водой исследуемого региона.

9.1.3 Наиболее быстрый, в течение 2 ч, результат о токсичности воды при аварийном загрязнении можно получить с помощью

экспрессной методики биотестирования с использованием парameций по тест-реакции хемотаксис.

Количество парameций, перемещающихся в тестируемую воду, зависит от ее токсичности. При отсутствии токсичности в тестируемой пробе парameции распределяются относительно равномерно между культуральной средой и тестируемой пробой. С увеличением токсичности количество парameций, переместившихся из культуральной среды в тестируемую пробу, уменьшается, т.е. показатель хемотаксиса снижается.

Критерием токсичности является снижение показателя хемотаксиса парameций до 25 % и менее от их исходного количества при экспозиции 2 ч.

К недостаткам данной методики относится невозможность оценки степени токсичности тестируемых проб. Результатом биотестирования является сигнальная информация о наличии или отсутствии токсичности проб воды.

Использование данной экспрессной методики рекомендуется для быстрого получения информации о токсичности проб воды. В случае отсутствия токсичности по тест-реакции хемотаксис парameций биотестирование по тест-реакции гибель не проводят и пробу оценивают как «нетоксичная».

При выявлении токсичности проб воды по тест-реакции хемотаксис парameций для установления степени токсичности и наличия ОТД рекомендуется провести кратковременное биотестирование на организмах зоопланктона по тест-реакции гибель.

9.1.4 При использовании тест-объектов из лабораторных культур необходимо проверять их чувствительность к действию эталонного токсиканта – калия двуххромовокислого, в соответствии с приложением В.

9.1.5 Биотестирование должно проводиться при оптимальных для жизнедеятельности тест-объектов условиях окружающей среды.

9.2 Постановка токсикологического эксперимента

9.2.1 Токсикологические эксперименты при биотестировании проб воды и донных отложений с использованием тест-реакции гибель ставят в двух сериях: опытной и контрольной. Опытную серию ставят на пробах с аварийного участка. При биотестировании воды контрольную серию для тест-объектов из природных популяций ставят на природной воде, отобранной на условно чистом участке реки, где были отловлены гидробионты, для тест-объектов из лабораторных культур – на дехлорированной водопроводной воде.

При биотестировании нативных донных отложений контрольную серию ставят на пробах, отобранных на условно чистом участке реки.

Биотестирование проб воды и донных отложений проводят в соответствии с методиками, представленными в приложении А.

Основные этапы биотестирования проб воды и донных отложений представлены в приложении Г.

9.2.2 Биотестирование на низших ракообразных в каждой серии проводят в трех стеклянных стаканах вместимостью по 600 см³, в каждый из которых помещают по 10 особей тест-объектов и осторожно по стенке стаканов приливают по 200 см³ воды мерным цилиндром вместимостью 250 см³. Необходимый объем воды для биотестирования в каждой серии составляет 600 см³, а общее количество тест-объектов на каждую серию – 30 особей.

Биотестирование проводят при температуре (24±2) °С без дополнительного освещения и при отсутствии прямых солнечных лучей.

9.2.3 Наблюдения за тест-объектами ведут через каждые 30 мин в первые 2-3 ч. В случае установления ОТД в течение этого времени дополнительно ставят серию экспериментов с разбавлениями по 9.1.2. При отсутствии ОТД в первые часы экспозиции наблюдения продолжают

до 24 ч, по истечении которого рассчитывают показатель гибели тест-объектов по 9.3.1.2.

В случае выявления ОТД при экспозиции 24 ч, токсикологический эксперимент прекращают.

При отсутствии ОТД в течение 24 ч и необходимости выявления ПОТД и ХТД токсикологический эксперимент продолжают в соответствии с методикой, приведенной в РД 52.24.868 (подраздел 7.2).

Форма представления результатов биотестирования на низших ракообразных приведена в разделе Д.1.

9.2.4 При биотестировании на парameциях в качестве тест-реакций используют гибель и хемотаксис.

Биотестирование проб воды проводят на индивидуальных линиях парameций при комнатной температуре в защищенном от прямого солнечного света месте.

9.2.5 Для токсикологического эксперимента по тест-реакции гибель используют планшеты для иммуноферментного анализа с лунками. В каждой серии биотестирования (опытной и контрольной) используют по 40 особей (ставят четыре повторности по 10 лунок). Контрольную серию ставят на дехлорированной водопроводной воде. Объем воды для биотестирования одной пробы составляет 20 см³.

В каждую из 40 лунок планшета для иммуноферментного анализа в опытной и контрольной сериях с помощью пипетки Пастера под микроскопом отсаживают по одной особи парameций. Попавшую с ними воду удаляют с помощью фильтровальной бумаги «белая лента», затем пипеткой вместимостью 1 см³ приливают 0,5 см³ тестируемой пробы воды.

9.2.6 Учет погибших парameций проводят под микроскопом при увеличении 4×12 в первые 2-3 ч через каждые 30 мин. Во время наблюдений под микроскопом содержимое лунок осторожно барботируют пузырьками воздуха из пипетки Пастера для того, чтобы выявить погибших особей. О гибели парameций свидетельствует деформация

тела, разрыв оболочки (пелликулы), лизис клетки, а также сохранение неподвижности после барботирования водной среды.

В случае установления ОТД в первые 2-3 ч токсикологический эксперимент прекращают и дополнительно ставят серию экспериментов с разбавлениями проб по 9.1.2. Если в течение этого периода ОТД не установлено, наблюдения продолжают до 24 ч, по истечении которого рассчитывают показатель гибели парameций по 9.3.1.2.

В случае выявления ОТД при экспозиции 24 ч, токсикологический эксперимент прекращают. При отсутствии ОТД и необходимости выявления ПОТД и ХТД эксперимент продолжают в соответствии с РД 52.24.868 (подраздел 7.3)

Форма записи результатов биотестирования на парameциях по тест-реакции гибель приведена в разделе Д.2.

9.2.7 При биотестировании по тест-реакции хемотаксис влияние тестируемой пробы воды оценивают по двигательной активности парameций.

Для биотестирования в чашку Петри пипеткой вместимостью 1 см³ вносят одну каплю (0,1 см³) культуральной среды с парameциями и под микроскопом подсчитывают в ней исходное количество парameций. Затем на расстоянии 0,5-0,8 см от капли с культуральной средой вносят одну каплю (0,1 см³) тестируемой пробы. С помощью пипетки Пастера делают перемычку между каплей с тестируемой пробой и каплей с культуральной средой и наблюдают за перемещением парameций. Чашки Петри закрывают, чтобы предотвратить высыхание капель культуральной среды и тестируемой пробы.

Биотестирование каждой пробы воды проводят в трех повторностях, каждую из которых ставят в отдельной чашке Петри. Повторности токсикологического эксперимента ставят с интервалом 10 мин для удобства последующего учета парameций.

Регистрацию тест-реакции хемотаксис проводят путём учета в каждой из 3 чашек Петри количества парameций, переместившихся в тестируемую пробу. Учет парameций ведут под микроскопом через 2 ч экспозиции. Показатель хемотаксиса рассчитывают по 9.3.1.3.

9.2.8 Более экспрессной, позволяющей получить результат биотестирования пробы через 30 мин от начала экспозиции, является методика оценки токсичности пробы воды по тест-реакции хемотаксис парameций с использованием прибора «Биотестер» в соответствии с ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.2.

Форма записи результатов биотестирования на парameциях по тест-реакции хемотаксис приведена в разделе Д.3.

9.2.9 Для биотестирования нативных проб донных отложений рекомендуется методика на личинках хирономид в качестве тест-объектов. Показателями токсичности являются их гибель, а также морфологические повреждения.

Для биотестирования донные отложения помещают в 3 чашки Петри таким образом, чтобы высота слоя осадка в них составляла 1-2 см. Дают осадку отстояться в течение 3 ч, после чего осторожно сливают воду декантацией, оставляя над осадком слой воды высотой 1-3 мм. Это обеспечит оптимальные условия жизнедеятельности личинок хирономид в течение токсикологического эксперимента.

Для токсикологического эксперимента отбирают наиболее активных (двигающихся) личинок хирономид приблизительно одинакового размера и помещают в каждую чашку Петри по 10 особей. Чашки Петри закрывают и начинают наблюдения за состоянием личинок хирономид, отмечая развитие патологических изменений и количество погибших личинок. Данные наблюдений регистрируют через 30 мин, 1 ч, 2 ч и 24 ч.

9.2.10 В благоприятных условиях личинки обычно зарываются в донные отложения, тогда как перед гибелью они выбираются на поверхность. Погибшими считают личинок, потерявших подвижность и не реагирующих на прикосновение стеклянной палочкой. Погибшие личинки

хирономид или неестественно вытянуты или свернуты в клубок, иногда изогнуты. В случае сомнений факт гибели личинок хирономид уточняют под бинокулярным микроскопом. У погибших личинок хирономид цвет покровов бледнеет или меняется с ярко-красного на различные оттенки зеленого, коричневого, темно-красного.

Если в первые 2-3 ч ОТД не установлено, наблюдения продолжают до 24 ч, по истечении которого рассчитывают показатель гибели личинок хирономид по 9.3.1.2.

В случае выявления ОТД при экспозиции 24 ч, токсикологический эксперимент прекращают.

При отсутствии ОТД в течение 24 ч и необходимости выявления ХТД эксперимент продолжают в соответствии с РД 52.24.868 (подраздел 7.8)

Форма представления результатов биотестирования на личинках хирономид приведена в разделе Д.4.

9.3 Регистрация показателей и оценка токсичности по результатам биотестирования

9.3.1 Регистрация и расчет показателей токсичности

9.3.1.1 По окончании биотестирования проб воды и донных отложений по тест-реакции гибель регистрируют количество погибших тест-объектов в опытной и контрольной сериях. Доля погибших тест-объектов в контрольной серии не должно превышать 10 %. Если доля погибших тест-объектов в контрольной серии превышает 10 %, результаты биотестирования не учитывают. Токсикологический эксперимент повторяют с использованием другой культуры тест-объекта.

9.3.1.2 Долю погибших тест-объектов в опытной или контрольной сериях N_p , %, рассчитывают по формуле

$$N_{\text{п}} = \frac{\bar{N}_{\text{п}}}{\bar{N}_{\text{исх}}} \cdot 100, \quad (1)$$

где $\bar{N}_{\text{п}}$ – среднее арифметическое значение количества погибших тест-объектов в опытной или контрольной сериях, экз.;

$\bar{N}_{\text{исх}}$ – среднее арифметическое значение исходного количества тест-объектов в опытной или контрольной сериях, экз.

Показатель гибели тест-объектов $A_{\text{г}}$, %, в опытной серии по сравнению с контрольной, рассчитывают по формуле

$$A_{\text{г}} = N_{\text{п}_1} - N_{\text{п}_2} \quad (2)$$

где $N_{\text{п}_1}$ – доля погибших тест-объектов в опытной серии, %;

$N_{\text{п}_2}$ – доля погибших тест-объектов в контрольной серии, %.

9.3.1.3 При биотестировании проб воды по тест-реакции хемотаксис регистрируют количество переместившихся парameций из культуральной среды в тестируемую пробу воды и рассчитывают показатель хемотаксиса $A_{\text{х}}$, %, по результатам трех повторностей по формуле

$$A_{\text{х}} = \frac{\bar{N}_{\text{т}}}{\bar{N}_{\text{к}}} \cdot 100, \quad (3)$$

где $\bar{N}_{\text{т}}$ – среднее арифметическое значение количества переместившихся парameций в тестируемую пробу, экз.;

$\bar{N}_{\text{к}}$ – среднее арифметическое значение исходного количества парameций в одной капле культуральной среды, экз.

9.3.2 Оценка токсичности проб воды и донных отложений

9.3.2.1 Оценку степени токсичности и наличие ОТД проб воды и донных отложений при кратковременном биотестировании по показателю гибели тест-объектов в опытной серии по сравнению с контрольной устанавливают по таблице 1.

Таблица 1 – Оценка токсичности проб воды и донных отложений по показателю гибели тест-объектов из природных популяций и лабораторных культур при кратковременном биотестировании

Показатель гибели тест-объектов, А _Г , %	Оценка степени токсичности, наличие ОТД тестируемых проб
Менее 25	Условно нетоксичная
От 25 до менее 50	Токсичная
От 50 до менее 75	Высоко токсичная; ОТД
От 75 и выше	Экстремально токсичная; ОТД

9.3.2.2 При биотестировании с использованием тест-реакции хемотаксис парameций устанавливают наличие или отсутствие токсичности проб воды. Если показатель хемотаксиса составит 25 % и менее, пробу воды оценивают как «токсичная», если более 25 % – как «нетоксичная».

10 Оценка соответствия результатов биотестирования нормативным требованиям

Природная вода и донные отложения не должны при биотестировании оказывать токсического действия на гидробионтов. Эти требования закреплены в нормативных документах Росгидромета: Р 52.24.734, Р 52.24.741, Р 52.24.763. Требования к качеству воды по токсичности полностью отличаются для воды условно чистого участка и для сточной воды в месте сброса ее в водный объект: вода условно чистого участка не должна оказывать ХТД в биотесте на дафниях, а сточная вода в месте сброса не должна оказывать на дафний ОТД.

Данные биотестирования воды используют также для выявления состояния экологического неблагополучия водной экосистемы поверхностных водных объектов [8]. Этот параметр входит в комплекс

химико-биологических показателей, позволяющих отнести состояние участка, где произошла авария, к чрезвычайной экологической ситуации или даже экологическому бедствию.

В Российской Федерации для оценки состояния пресноводных экосистем используется комплекс химико-биологических показателей в соответствии с нормативным документом Р 52.24.763, в Республике Беларусь – в соответствии с ТКП 17.13-08 и ТКП 17.13-10.

Состояния экологического неблагополучия водной экосистемы устанавливаются по кратности разбавления пробы воды, устраняющей ОТД при биотестировании, в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2 – Шкала для выявления экологического состояния водной экосистемы по данным биотестирования воды по Р 52.24.763

Состояние водной экосистемы	Результаты биотестирования
Условно благополучное	ОТД не обнаружено ни в одной из проб
Чрезвычайная экологическая ситуация	Обнаружено ОТД воды хотя бы в одной пробе, которое устраняется при кратности ее разбавления в 50 раз
Экологическое бедствие	Обнаружено ОТД воды хотя бы в одной пробе, которое устраняется при кратности разбавления в 100 раз и более

11 Оценка токсического загрязнения поверхностного водного объекта или его участка по результатам биотестирования

Основным критерием оценки токсического загрязнения при кратковременном биотестировании служит наличие ОТД.

Если наблюдения на участке аварийного загрязнения проводятся неоднократно в течение определенного времени после аварии с целью определения степени токсичности и установления ОТД, ПОТД и ХТД проб

воды, токсическое загрязнение поверхностного водного объекта или его участка оценивают в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3 – Оценка токсического загрязнения водного объекта или участка по результатам биотестирования проб воды по РД 52.24.868

Токсическое действие	Доля проб, в которых обнаружена токсичность, %	Токсическое загрязнение водного объекта или участка
ХТД	Менее 25	Отсутствует
	От 25 до 50 включ.	Слабое
	Св. 50.	Среднее
пОТД	Менее 25	
	Св. 50	Высокое
ОТД	От 25 до 50 включ.	
	Св. 50	Экстремально высокое

С увеличением количества результатов биотестирования проб воды повышается достоверность оценки токсического загрязнения поверхностного водного объекта или его участка.

Наличие ОТД в пробах донных отложений свидетельствует о накоплении токсичных загрязняющих веществ, которые в определенных ситуациях могут вызвать вторичное загрязнение воды.

12 Условия приемлемости результатов биотестирования воды и донных отложений

Условия приемлемости результатов биотестирования для всех методик биотестирования сводятся к соблюдению требований к отбору проб, их хранению и транспортировке, к получению и содержанию тест-объектов, а также к их чувствительности к эталонному токсиканту, соблюдению процедуры выполнения биотеста.

13 Требования к технике безопасности и квалификации исполнителей

При выполнении работ по отбору проб воды и донных отложений и проведению биотестирования следует соблюдать общие требования к технике безопасности работ на водных объектах и в химических лабораториях.

Работы выполняют лица с высшим или средним профессиональным образованием, освоившие методики водной токсикологии, методы полевых и лабораторных исследований с помощью биотестирования и прошедшие инструктаж по технике безопасности при работе на водных объектах и в химических лабораториях с вредными веществами.

Приложение А (справочное)

Перечень методик биотестирования проб воды и донных отложений для оперативной оценки токсического загрязнения поверхностных водных объектов при аварийном загрязнении

Методики биотестирования, пригодные для кратковременного биотестирования воды и донных отложений, выбирают в зависимости от имеющихся тест-объектов.

Таблица А.1 – Перечень методик биотестирования

Наименование методики биотестирования. Тест-реакция	Библиографическая ссылка	Время выявления ОТД, ч
Биотесты на низших ракообразных		
Методика измерений количества <i>Daphnia magna Straus</i> для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления методом прямого счета. Гибель	ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.12-06 (издание 2014 г.) Токсикологические методы анализа. Методика измерений количества <i>Daphnia magna Straus</i> для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления методом прямого счета	24
Определение токсичности по выживаемости пресноводных ракообразных <i>Daphnia magna Straus</i> (метод Б). Гибель	ГОСТ Р 56236-2014 (ИСО 6341:2012) Вода. Определение токсичности по выживаемости пресноводных ракообразных <i>Daphnia magna Straus</i>	24
Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов производства по смертности цериодафний. Гибель	Биологические методы контроля. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов производства по смертности и изменению плодовитости цериодафний. – М.: «Акварос», 2007. – 56 с.	24

Окончание таблицы А.1

Наименование методики биотестирования. Тест-реакция	Библиографическая ссылка	Время выявления ОТД, ч
Биотесты на инфузориях		
Методика экспрессного биотестирования воды по реакции хемотаксиса инфузорий. Хемотаксис	РД 52.24.868-2017 Использование методов биотестирования воды и донных отложений водотоков и водоемов	2
Методика биотестирования воды и донных отложений на инфузориях. Гибель		24
Методика определения токсичности проб природных, питьевых, хозяйственно-питьевых, хозяйственно-бытовых сточных, очищенных сточных, сточных, талых, технологических вод экспресс-методом с применением прибора серии «Биотестер». Хемотаксис	ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.2-98 (издание 2015 г.) Методика определения токсичности проб природных, питьевых, хозяйственно-питьевых, хозяйственно-бытовых сточных, очищенных сточных, сточных, талых, технологических вод экспресс-методом с применением прибора серии «Биотестер»	0,5
Биотесты на макрозообентосе		
Методика биотестирования нативных донных отложений. Биотесты на личинках хирономид. Гибель	РД 52.24.868-2017 Использование методов биотестирования воды и донных отложений водотоков и водоемов	24

Приложение Б (рекомендуемое)

Форма записи характеристик проб воды и донных отложений

1 Номер пробы	
2 Место отбора пробы воды и донных отложений	
	водный объект, пункт, створ, горизонт, вертикаль
3 Дата отбора, время суток	
4 Температура, °С, воды	
5 Погодные условия	
6 Визуальная характеристика воды:	
- прозрачность	
- характер взвесей	
	минеральные частицы, частицы глины, песок, ил, растительный детрит,
	дрифт водорослей, бактериальная слизь и т.д.
- загрязнение, засорение	
	детрит, обрывки водной растительности, пятна нефтепродуктов, пена
	хозяйственно-бытовой и другой мусор, отходы производства и т.д.
7 Характеристика донных отложений:	
- физические характеристики	
	цвет, температура, pH, Eh, запах
- тип донных отложений	
	песчанистый ил, глинистый ил, илистый песок и т. д.
8 Срок хранения проб	
9 Условия хранения проб	

Приложение В **(рекомендуемое)**

Определение чувствительности тест-объектов

В.1 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы

В.1.1 Весы неавтоматического действия (лабораторные) высокого (II) класса точности по ГОСТ Р 53228 или ГОСТ OIML R 76-1, действительная цена деления (шкалы) 0,001 г или 0,01 г.

В.1.2 Колбы мерные 2-го класса точности исполнения 2 или 2а по ГОСТ 1770 вместимостью: 100 см³ – 12 шт., 250 см³ – 6 шт., 500 см³ – 6 шт.

В.1.3 Пипетки градуированные 2-го класса точности типа 1 и 3 исполнения 1, 2 по ГОСТ 29227 вместимостью: 2 см³ – 1 шт., 5 см³ – 2 шт., 10 см³ – 1 шт., 20 см³ – 1 шт.

В.1.4 Стаканы типа В исполнения 1 из стекла группы ТХС по ГОСТ 25336 вместимостью 150 см³ – 21 шт.

В.1.5 Стаканчики для взвешивания (бюксы) СВ-19/9 или СВ-24/10 по ГОСТ 25336 – 1 шт.

В.1.6 Калий двуххромовокислый по ГОСТ 4220, ч.д.а.

В.1.7 Вода дистиллированная по ГОСТ Р 58144.

В.1.8 Вода водопроводная дехлорированная.

В.2 Определение чувствительности тест-объектов к эталонному токсиканту калию двуххромовокислому

В.2.1 Перед выполнением биотестирования проверяют чувствительность тест-объектов к эталонному токсиканту. При систематическом выполнении работ по биотестированию такая проверка проводится не реже одного раза в месяц.

В случае, когда токсичность устанавливают по тест-реакции гибель тест-объектов, определяют концентрацию эталонного токсиканта, при которой погибает 50 % особей тест-объекта ($ЛК_{50}$) за 24 ч экспозиции.

Как показывает практика токсикологических исследований, показатель $ЛК_{50}$ взятой в эксперимент лабораторной культуры тест-объекта может быть установлен при нескольких концентрациях эталонного токсиканта, находящихся в определенном, характерном для каждого тест-объекта, узком диапазоне.

В.2.2 В качестве эталонного токсиканта чаще всего используют калий двуххромовокислый ($K_2Cr_2O_7$).

Для установления чувствительности тест-объекта готовят исходный раствор $K_2Cr_2O_7$ с концентрацией 10 г/дм³. Для этого взвешивают 5 г $K_2Cr_2O_7$, переносят в мерную колбу вместимостью 500 см³ и растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды. Затем доводят содержимое колбы до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Приготовленный исходный раствор $K_2Cr_2O_7$ перед использованием выдерживают в течение двух часов. Срок хранения исходного раствора калия двуххромовокислого в темной склянке с притертой пробкой – не более 6 мес.

Далее готовят рабочий раствор $K_2Cr_2O_7$ с концентрацией 0,05 г/дм³ (50 мг/дм³). Для этого в мерную колбу вместимостью 500 см³ приливают 2,5 см³ исходного раствора $K_2Cr_2O_7$ 10 г/дм³ пипеткой вместимостью 5 см³, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Рабочий раствор хранению не подлежит.

В.2.3 Для определения чувствительности дафний, цериодафний, парамеций и тест-объектов из природных популяций готовят серию градуировочных растворов калия двуххромовокислого с концентрациями 0,25; 0,50; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 мг/дм³ следующим образом. В мерные колбы вместимостью 250 см³ приливают соответственно по 1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10,5; 12,5 см³ рабочего раствора $K_2Cr_2O_7$ с концентрацией 50 мг/дм³, используя пипетки вместимостью 2, 5, 10 и 20 см³. В каждую колбу приливают до метки водопроводную дехлорированную воду и тщательно перемешивают полученные растворы.

В качестве контроля используют водопроводную дехлорированную воду. Биотестирование на этих растворах проводят в течение 24 ч в соответствии с

методиками по тест-реакции гибель согласно РД 52.24.868 (подразделы 7.2 и 7.3).

В.2.4 ЛК₅₀ эталонного токсиканта определяют графическим методом с применением пробит-анализа [9]. В ходе токсикологического эксперимента учитывают количество погибших особей. Значение показателя гибели выражают в процентах, которые переводят в пробитные значения согласно таблице В.1. Соответствующие концентрации калия двуххромовокислого выражают в значениях десятичных логарифмов.

Таблица В.1 – Пробитные значения в зависимости от показателя гибели тест-объектов, выраженного в процентах

%	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,35	3,44	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,85	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,22	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,81	4,82	4,84	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,30	5,33	5,36	5,38	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,32

В.2.5 В формате Excel строят график линейной зависимости между пробитными значениями показателя гибели (ордината) и концентрациями калия двуххромовокислого (абсцисса), выраженными в значениях десятичных логарифмов. Концентрации калия двуххромовокислого, при которых показатели гибели тест-объектов составили 0 % или 100 %, при графическом определении ЛК₅₀ не учитывают. На оси ординат находят точку пробитного значения 5,0, соответствующего показателю гибели 50 %, и от нее параллельно оси абсцисс проводят линию до пересечения с прямой линией графика, построенного по результатам эксперимента с различными концентрациями калия двуххромовокислого. Точка пересечения опущенного перпендикуляра на ось абсцисс соответствует значению десятичного логарифма ЛК₅₀.

Показатель ЛК₅₀ за 24 ч для дафний должен находиться в диапазоне концентраций K₂Cr₂O₇ от 0,9 до 2,0 мг/дм³, для цериодафний – от 1,2 до 1,9 мг/дм³, для парameций – от 0,5 до 1,5 мг/дм³.

Приложение Г (справочное)

Основные этапы биотестирования проб воды и донных отложений на тест-объектах из природных популяций и лабораторных культур гидробионтов



Рисунок Г.1

Приложение Д (рекомендуемое)

Формы представления результатов биотестирования проб воды и донных отложений

Д.1 Форма представления результатов биотестирования проб воды на тест-объектах из природных популяций и лабораторных культур низших ракообразных

Но- мер про- бы	Водный объект, пункт, створ, географические координаты	Дата		Крат- ность разбав- ления пробы, раз	Экспо- зиция, ч	Количество погибших тест-объектов, экз.						Показа- тель гибели тест- объектов, Аг, %	Оценка степени токсичности и токсического действия пробы
		отбора проб	биотести- рования			в контрольной серии			в опытной серии				
						1	2	3	1	2	3		
1	2	3		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Д.2 Форма представления результатов биотестирования проб воды на тест-объектах из лабораторных культур парameций по тест-реакции гибель

Но- мер про- бы	Водный объект, пункт, створ, географические координаты	Дата		Крат- ность разбав- ления пробы, раз	Экспо- зиция, ч	Пов- тор- ность	Количество парамеций, экз.						Показа- тель гибели тест- объек- тов, А _Г , %	Оцен- ка степени токсично- сти и токсиче- ского действия пробы
		отбора проб	биотес- тирова- ния				в контрольной серии			в опытной серии				
							исход- ное	живых	поги- бших	исход- ное	живых	поги- бших		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
						1								
						2								
						3								
						4								

Д.3 Форма представления результатов биотестирования проб воды на тест-объектах из лабораторных культур парameций по тест-реакции хемотаксис

Номер пробы	Водный объект, пункт, створ, географические координаты	Дата		Экспо- зиция, ч	Повтор- ность	Количество парameций, экз.		Показатель хемотаксиса, А _х , %	Оценка токсичности пробы воды
		отбора проб	биотес- тирования			исходное	переместив- шихся в тестируемую пробу		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
					1				
					2				
					3				
Примечание – В графе 10 пишут: «токсичная» или «нетоксичная»									

Д.4 Форма представления результатов биотестирования проб донных отложений на тест-объектах из природных популяций и лабораторных культур личинок хирономид

[illegible]

Библиография

- [1] Руководящий документ Перечень нормативных
Росгидромета документов (по состоянию на
РД 52.18.5-2012 01.08.2012)
- [2] Никаноров А.М., Иваник В.М. Словарь-справочник по
гидрохимии и качеству вод суши (понятия и определения). –
Ростов-на-Дону, 2014. – 547 с.
- [3] Тимофеева Л.А., Фрумин Г.Т. Трансграничные водные
объекты. – СПб.: СпецЛит, 2017. – 159 с.
- [4] Зенин А.А., Белоусова Н.В. Гидрохимический словарь. – Л.:
Гидрометеиздат, 1988. – 239 с.
- [5] Филенко О.Ф., Терехова В.А. Экологическое предназначение
биотестирования: информативность и универсальность
// Материалы международного симпозиума «Биодиагностика и
оценка качества природной среды: подходы, методы, критерии
и эталоны сравнения в экотоксикологии», Москва, 25–26 окт.
2016 г. – М.: МГУ, 2016. – С. 232 – 239
- [6] Лесников Л.А. Временные методические указания по
установлению предельно допустимых концентраций вредных
веществ в воде рыбохозяйственных водоемов. – Л.:
ГОСНИОРХ, 1975. – 27 с.
- [7] Руководство по гидробиологическому мониторингу
пресноводных экосистем /Под ред. В.А. Абакумова – СПб.:
Гидрометеиздат, 1992. – 318 с.

- [8] Критерии оценки экологической обстановки территорий для выявления зон чрезвычайной экологической ситуации и зон экологического бедствия // Зеленый Мир. Российская экологическая газета. – 1994. – № 12. – С. 8

- [9] Унифицированные методы исследования качества воды. – М.: СЭВ, 1983. – С. 232-245

Ключевые слова: поверхностные водные объекты, аварийное и токсическое загрязнение, оперативная оценка, биотестирование, популяции гидробионтов, трансграничные участки, мониторинг

Лист регистрации изменений

Поряд- ковый номер изме- нения	Номер страницы				Обозначение изменения	Подпись	Дата	
	изме- нённой	заме- нённой	новой	анну- лиро- ванной			введения изменения в действие	внесения изменения