

---

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

---

РЕКОМЕНДАЦИИ

P  
52.24.741 -  
2010

---

ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД СУШИ  
В УСЛОВИЯХ ЧРЕЗВЫЧАЙНЫХ СИТУАЦИЙ  
МЕТОДОМ ЭКСПРЕССНОГО БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Ростов-на-Дону  
2010

### Предисловие

1 РАЗРАБОТАНЫ Государственным учреждением Гидрохимический институт (ГУ ГХИ)

2 РАЗРАБОТЧИКИ Е.Н. Бакаева, д-р биол. наук, Н.А. Игнатова, канд. биол. наук

3 СОГЛАСОВАНЫ с ГУ «НПО «Тайфун» 04.10.2010  
И УМЗА Росгидромета 11.10.2010

4 УТВЕРЖДЕНЫ Заместителем Руководителя Росгидромета 12.10.2010

5 ЗАРЕГИСТРИРОВАНЫ ЦМТР ГУ «НПО «Тайфун» за номером Р 52.24.741-2010 от 19.10.2010

6 ВВЕДЕНЫ ВПЕРВЫЕ



## Введение

Метод биотестирования широко используется в последнее время для оценки токсичности и поверхностных вод, и донных отложений. Информация, получаемая в ходе биотестирования дает информацию о воздействии на гидробиоту всего комплекса находящихся в водном объекте веществ. В случаях экстремально высоких загрязнений и в условиях чрезвычайных ситуаций (ЧС) необходимо получение оперативной информации для принятия управленческих решений. В связи с чем необходимо использовать экспрессные методики биотестирования.

Настоящие рекомендации отвечают требованиям оперативности получения биологической информации: 1) реакция хемотаксиса позволяет практически за 1 ч получить ответную реакцию тест-объектов на воздействие исследуемой пробы воды; 2) выбранный тест-объект (*Ratamacium caudatum*) является одним из центральных видов микрозоопланктеров практически во всех водных объектах, что позволяет использовать его во всех регионах страны; 3) методика биотестирования по выживаемости зоопланктеров позволяет использовать природные популяции исследуемого региона, отобранные в фоновых (незагрязненных участках) водных объектов. В связи с тем, что гидробионты реагируют на специфику гидрохимического состава водных объектов различных регионов предпочтительнее использовать в случаях ЧС природные популяции гидробионтов, отобранные из фоновых (условно чистых участков). Для этого в рекомендациях приведен список возможных тест-объектов с указанием их экологических особенностей в отношении температурного фактора, pH-среды, минерализации.

## РЕКОМЕНДАЦИИ

### ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД СУШИ В УСЛОВИЯХ ЧРЕЗВЫЧАЙНЫХ СИТУАЦИЙ МЕТОДОМ ЭКСПРЕССНОГО БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Дата введения - 2011-10-01

#### 1 Область применения

Настоящие рекомендации устанавливают методику экспрессного биотестирования и порядок проведения оценки токсичности поверхностных вод суши (ПВС) в условиях чрезвычайных ситуаций (ЧС) и проведения оперативных работ в мониторинге ПВС в условиях ЧС.

Рекомендации предназначены для организаций наблюдательной сети Федеральной службы по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды (Росгидромета), осуществляющих организацию и проведение наблюдений за загрязнением ПВС в составе Государственной службы наблюдений за состоянием окружающей среды (ГСН) России.

Настоящие рекомендации могут быть использованы в качестве методического пособия специалистами и практическими работниками природоохранных организаций, осуществляющих наблюдения за загрязнением окружающей среды, а также для оценки токсического загрязнения поверхностных вод суши.

#### 2 Нормативные ссылки

В настоящих рекомендациях использованы ссылки на следующие нормативные документы:

ГОСТ 19179-73 Гидрология суши. Термины и определения

ГОСТ 17.1.1.01-77 Охрана природы. Гидросфера. Использование и охрана вод. Основные термины и определения

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

ГОСТ 27065-86 Качество вод. Термины и определения

Р 52.24.566-94 Рекомендации. Методы токсикологической оценки загрязнения пресноводных экосистем

РД 52.24.609-99 Организация и проведение наблюдений за содержанием загрязняющих веществ в донных отложениях

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

РД 52.24.309-2004 Организация и проведение режимных наблюдений за загрязнением поверхностных вод суши на сети Росгидромета

РД 52.24.662-2004 Рекомендации. Оценка токсического загрязнения природных вод и донных отложений пресноводных экосистем методами биотестирования с использованием коловраток

РД 52.24.670-2005 Унифицированный метод определения острой токсичности проб поверхностных вод суши, содержащих взвешенные вещества

Р 52.24.690-2006 Рекомендации. Оценка токсического загрязнения вод водотоков и водоемов различной солености и зон смешения речных и морских вод методами биотестирования

Р 52.24.695-2007 Рекомендации. Оценка токсического загрязнения природных вод и донных отложений водных экосистем по коэффициенту регенерации популяции

Приложения - Ссылки на остальные нормативные документы приведены в разделе 6, пунктах 7.2 и 8.2.

### 3 Термины, определения и обозначения

В настоящих рекомендациях использованы следующие термины и определения:

#### 3.1

**биотестирование (биологическое тестирование):** Оценка качества объектов окружающей среды (воды и др.) по ответным реакциям живых организмов, являющихся тест-объектами

[ГОСТ 27065-86, статья 39]

3.2 **биотест:** Совокупность приемов получения информации о токсичности воды (донных отложений) для гидробионтов на основе регистрации реакций тест-объекта (Р 52.24.566).

3.3 **водный объект:** Сосредоточение природных вод на поверхности суши, либо в горных породах имеющее характерные формы распространения и черты режима (Р 52.24.566).

3.4 **загрязнение токсическое:** Загрязнение воды водоемов и водотоков токсичными веществами.

3.5 **зоопланктеры:** Представители зоопланктона (совокупность населяющих толщу воды беспозвоночных животных, пассивно переносимых течениями) [1].

#### 3.6

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

[ГОСТ 27065-86, статья 2]

**3.7**

**контроль качества воды:** Проверка соответствия показателей качества воды установленным нормам и требованиям [ГОСТ 27065-86, статья 2]

**3.8 критерий токсичности:** Значение показателя токсичности, на основании которого судят о наличии токсического действия.

**3.9 метрологическая характеристика метода:** Характеристика чувствительности метода, определяемая для тест-объекта по  $LC_{50}$  при воздействии эталонного токсиканта (медь (II) сернокислая, калий двухромовокислый).

**3.10 острое токсическое действие (острая токсичность); ОТД:** Воздействие, вызывающее быструю ответную реакцию тест-объекта. Острое токсическое действие чаще всего определяют по тест-реакции «гибель» или «выживаемость» в условиях кратковременного биотестирования. При использовании коловраток и других организмов микрозоопланктона длительность воздействия составляет от 6 до 24 ч (РД 52.24.662).

**3.11 показатель токсичности:** Признак тест-объекта, используемый для оценки токсичности воды.

**3.12 поверхностные воды суши; ПВС:** Воды, находящиеся на поверхности суши в виде различных водных объектов (Р 52.24.566).

**3.13 проба воды:** Количество воды, предназначенное для исследования.

**3.14 пункт наблюдений за загрязнением поверхностных вод суши Государственной сети наблюдений Росгидромета:** Место на водоеме или водотоке, где проводят комплекс работ для получения данных о качестве воды или донных отложений. (РД 52.24.635).

**3.15 результат биотестирования:** Конечный вывод о токсичности водной среды, установленный в ходе биотестирования.

**3.16 тест-объект:** Организм, который используют при биотестировании (инфузории, дафнии и т.д.) (Р 52.24.566).

**3.17 тест-показатель:** Показатель жизнедеятельности (поведенческие реакции, размножение, выживаемость и т.д.) тест-объекта, используемый для определения токсичности ПВС.

**3.18 токсичность воды:** Свойство воды вызывать патологические изменения или гибель организмов, обусловленные присутствием в ней токсичных веществ (Р 52.24.566).

**3.19 токсикологический эксперимент:** Эксперимент, в ходе которого оценивают влияние на тест-объект испытуемой воды или химического соединения. Состоит из двух серий: опыт (с воздействием воды или химического соединения) и контроль (без воздействия, но в тех же условиях) (Р 52.24.566).

**3.20 условно чистый участок водного объекта:** Обычно это фоловый створ.

**3.21 фоновый створ:** Створ, расположенный на расстоянии не менее 1 км выше источника загрязнения (Р 52.24.566).

**3.22 хемотаксис:** Двигательные реакции свободно передвигающихся растительных и простейших животных организмов, а также клеток (зооспор, сперматозоидов, лейкоцитов и др.) под влиянием химических раздражителей [2].

**3.23 чрезвычайная ситуация;** ЧС: Обстановка на определенной территории, сложившаяся в результате аварии, опасного природного явления, катастрофы, стихийного или иного бедствия, которые могут повлечь или повлекли за собой человеческие жертвы, ущерб здоровью людей или окружающей природной среде, значительные материальные потери и нарушение условий жизнедеятельности людей [3].

**3.24 чувствительность тест-объекта:** Нижняя граница диапазона действия эталонного токсиканта, при которой обнаруживают параметры его токсичности на тест-объект.

**3.25 эталонный токсикант:** Токсическое вещество, используемое для проверки чувствительности биотеста или тест-объекта (Р 52.24.566).

**3.26 LC<sub>50</sub>:** Концентрация токсиканта, приводящая к гибели 50 % взятой для эксперимента выборки.

## 4 Общие положения

4.1 Настоящие рекомендации устанавливают требования и условия по проведению экспрессного биотестирования ПВС в условиях ЧС, обусловленного высоким уровнем загрязнения или присутствием опасных токсических веществ, поступающих в водные объекты в ходе аварий, залповых сбросов, с целью выяснения чрезвычайных экологических ситуаций.

4.2 Экспрессное биотестирование ПВС проводят с целью проверки соответствия качества отдельных исследуемых проб воды установленным нормам без идентификации загрязняющих веществ и их количественных характеристик [4].

4.3 Вода контрольного створа (природная вода) не должна оказывать токсического действия (хронического и, тем более, острого) на тест-объекты, используемые для биотестирования [4].

4.4 Биотестирование ПВС основано на определении показателей токсичности исследуемой пробы воды, отобранный в зоне влияния источника загрязнения, и их отличий от контрольной пробы, отобранный на условно чистом участке водного объекта и водопроводной водой исследуемого региона.

4.5 Экспрессное биотестирование токсичности ПВС в условиях ЧС дает возможность за короткий промежуток времени:

- оценить токсичность пробы воды;

- выявить точки (створы) и участки с чрезвычайной экологической ситуацией;
- оценить влияние источников загрязнения на состояние водной сопровождающей водного объекта;
- оценить экотоксикологический статус водного объекта или его участка;
- оценить эколого-токсикологическое состояние водного объекта в комплексе с методами биоиндикационных и физико-химических исследований.

4.6 Для оценки токсичности ПВС используют не менее трех биотестов с разными тест-объектами, либо трех тест-показателей одного тест-объекта. Набор биотестов и тест-показателей должен экологически соответствовать региону исследования согласно приложениям А, Б и (Р 52.24.690).

4.7 В составе системы мониторинга ПВС режимные наблюдения и наблюдения в условиях ЧС по токсикологическим показателям методом биотестирования проводят по программам работ оперативно-производственных подразделений территориальных управлений по гидрометерологии и мониторингу окружающей среды (УГМС) Росгидромета в соответствии с требованиями РД 52.24.309 – для поверхностных вод суши, РД 52.24.609 и РД 52.24.635 – для вод и донных отложений.

4.8 Результаты по оценке токсичности вод методом биотестирования в условиях ЧС, в зависимости от их масштаба, представляют в органы управления Единой государственной системы предупреждения и ликвидации ЧС (РСЧС) соответствующего уровня (региональный, территориальный и местный, объектовый).

## 5 Основные принципы биотестирования поверхностных вод суши в условиях ЧС

5.1 В ходе биотестирования ПВС в условиях ЧС устанавливают:

- наличие либо отсутствие токсического действия отдельных проб воды;
- острое токсическое действие отдельных проб воды;
- кратность разбавления вод, снимающую ОТД, в случае его обнаружения;
- район экологического неблагополучия исследуемой акватории.

5.2 Экспрессное биотестирование ПВС проводят с использованием различных тест-объектов: инфузорий, коловраток, ракообразных, микроводорослей, макрофитов, а также природных популяций гидробионтов, отобранных из условно чистых (фоновых) участков исследуемого водного объекта.

5.3 Использование природных популяций гидробионтов имеет преимущества:

- гидробионты из исследуемого водного объекта исключают реакцию на физико-химические особенности воды, которая может иметь место у лабораторных культур гидробионтов;

- возможность прогнозирования состояния конкретных популяций гидробионтов в исследуемом регионе в связи с произошедшим загрязнением.

Использование природных популяций гидробионтов имеет недостатки:

- адаптация к слабому постоянному воздействию загрязнения на фоновом участке, если оно имеет идентичную природу с воздействием на загрязненном участке;

- заранее нельзя предвидеть, какие именно организмы можно будет выделить на фоновом участке исследуемого водного объекта.

5.4 Оптимальным является проведение одновременного биотестирования на природных популяциях гидробионтов и лабораторных культурах тест-объектов с известными характеристиками и известной чувствительностью к загрязняющим веществам (проверка пригодности культуры к биотестированию по эталонному токсиканту).

5.5 Наиболее важным показателем, на основе которого можно дать прогноз развития популяции, является размножение. Время получения результатов по показателю размножения на общепринятом тест-объекте *Daphnia magna* составляет 30 сут. В условиях ЧС информация должна быть оперативной, поэтому преимущество среди тест-объектов нужно отдать короткоцикличным тест-объектам: инфузориям, коловраткам, микроводорослям.

5.6 Экспрессное биотестирование ПВС проводят:

а) с использованием экспрессных тест-показателей:

- скорость потребления пищи организмами-фильтраторами инфузориями, коловратками в соответствии с РД 52.24.662 (раздел 10) и РД 52.24.670;

- скорость фотосинтеза растительных тест-объектов, А-З-Рн-тест на микроводорослях в соответствии с Р 52.24.566;

- поведенческие реакции – хемотаксис в соответствии с приложением В.

б) с использованием тест-показателей:

- выживаемость или гибель на тест-объектах, экологически соответствующих исследуемому водному объекту; выживаемость на тест-объектах из представителей крупного ракового планктона можно наблюдать визуально без микроскопирования в соответствии с РД 52.24.662, Р 52.24.690, Р 52.24.695;

- размножение, позволяющее при использовании короткоциклических тест-объектов (микроводоросли, инфузории, коловратки) в короткие сроки определить не только их выживаемость, но и размножение, и по-

казывающее возможность сохранения популяции в соответствии с РД 52.24.662, Р 52.24.690, Р 52.24.695;

- комплекс показателей (выживаемость и размножение) в сопряженности со временем (24, 48, 72 ч), позволяющее при использовании короткоциклических гидробионтов (инфузории, коловратки) дать прогноз развития популяции в соответствии с Р 52.24.566, РД 52.24.662.

5.7 Длительность биотестирования (продолжительность экспозиции) зависит от жизненного цикла выбранного тест-объекта. Микроводоросли за сутки дают до 8 поколений, инфузории – до 4-6, коловратки – до 3.

5.8 В ходе биотестирования используют два контроля: дехлорированную водопроводную воду региона и воду из условно чистого (фонового) участка исследуемого водного объекта.

5.9 Каждый биотест проводят не менее чем в трех повторностях.

5.10 Оценку токсичности ПВС проводят по набору биотестов (не менее трех). Например, с тест-объектами парамеции, коловратки, дафнии. Либо по двум тест-объектам (парамеции, дафнии) и нескольким тест-показателям одного из тест-объектов (хемотаксис и гибель парамеций).

5.11 Обязательным в условиях ЧС при обнаружении ОТД вод является определение кратности разбавления исследуемой пробы воды, снимающей токсическое воздействие. Кратность разбавления – 2; 10; 25; 50; 100 и 500 раз. Разбавление проводят водой, отобранный из фонового створа, или отстоянной дехлорированной водопроводной водой исследуемого региона.

5.12 Требования к порядку проведения и оценке результатов биотестирования проводят согласно РД 52.24.669.

## **6 Отбор, хранение и подготовка проб поверхностных вод суши для биотестирования**

6.1 Пробы ПВС для биотестирования отбирают с учетом требований ГОСТ 17.1.5.05 и Р 52.24.566.

6.2 Объем пробы не менее 0,05 дм<sup>3</sup> (при использовании в биотестировании тест-объектов из числа микрозоопланктона) и не менее 1,5 дм<sup>3</sup> (при использовании микроводорослей и раккового планктона).

6.3 Сосуды должны быть из материала, не содержащего токсичных примесей (полиэтиленовые емкости для пищевых продуктов, стеклянные баллоны и бутыли).

6.4 Сосуды необходимо маркировать.

6.5 Перед заполнением сосудов воду фильтруют через мельничный газ № 70-76 (для удаления природного планктона) и несколько раз ополаскивают сосуд. Заполняют водой полностью.

6.6 Анализ проб воды по определению токсичности проводят не позднее 6 ч после отбора проб.

6.7 В случае невозможности проведения исследований не позднее 6 ч после отбора пробы охлаждают до 4 °С или замораживают согласно РД 52.24.309 и хранят до 30 сут.

6.8 Консервирование проб химическими веществами не допускается.

6.9 Перед биотестированием измеряют концентрацию кислорода, значения рН (с целью дифференцирования токсического воздействия каких-либо загрязняющих веществ и измеренных значений рН и кислорода, если эти параметры не обеспечивают нормальной жизнедеятельности гидробионтов).

6.10 Пробу делят на две части для проведения биотеста на фильтрованной (пропущенной через бумажный фильтр для удаления взвешенных веществ) и нефильтрованной воде.

## 7 Биотест по реакции хемотаксиса парамеций

### 7.1 Принцип метода

Биотест по реакции хемотаксиса основан на способности зоопланктеров, в частности парамеций, перемещаться в направлении или от источника химического воздействия. Хемотаксис положителен, если движение парамеций направлено к источнику химического раздражителя (по градиенту его концентрации воде), и отрицателен, если движение направлено от источника. Влияние исследуемой воды оценивают по количеству переместившихся особей.

ОТД исследуемой воды на парамеций устанавливают за время экспозиции 2 часа.

Показателем реакции хемотаксиса служит среднее количество парамеций, переместившихся в исследуемую воду.

Критерием ОТД является положительный хемотаксис, когда средний процент исходного количества тест-объектов, переместившихся в исследуемую воду, составляет не более 25 %.

### 7.2 Необходимые материалы, оборудование, реактивы

7.2.1 Культура парамеций *Paramcetium caudatum*. Описание основных характеристик вида, источники получения культуры и условий культивирования даны в приложениях Г и Д.

7.2.2 Микроскоп бинокулярный стереоскопический марки МБС по ГОСТ 8074-82.

7.2.3 Дрожжи пекарские сухие.

7.2.4 Пипетки выдувные капиллярные (ластеровские, укороченные с двух сторон или глазные с оттянутым носиком) по ГОСТ 29230-91.

7.2.5 Чашки Петри по ГОСТ 25336-82.

7.2.6 Фильтровальная бумага синяя лента.

7.2.7 Стаканы вместимостью 0,5-1,0 дм<sup>3</sup> по ГОСТ 23932-90.

7.2.8 Вода дехлорированная водопроводная исследуемого региона.

### **7.3 Подготовка к биотестированию**

Исходный материал для биотестирования получают за 1-3 сут до опыта. Для этого парамеций пересаживают в чистые чашки Петри с дехлорированной водопроводной водой, в которую предварительно вносят корм (один-два кусочка сухих пекарских дрожжей размером 1 мм<sup>3</sup> на одну чашку Петри).

Биотестирование проводят при комнатной температуре без смены воды в нестерильных условиях, в защищенном от прямого солнечного света месте.

### **7.4 Проведение биотестирования**

Общий объем воды для биотестирования одной пробы воды 50 см<sup>3</sup>.

Для проведения токсикологического эксперимента в чашку Петри вносят каплю (0,1 см<sup>3</sup>) культуральной среды с парамециями. Под микроскопом марки МБС подсчитывают исходное количество парамеций. Далее в эту же чашку Петри рядом с первой каплей вносят каплю исследуемой воды. С помощью пипетки делают перемычку из капли контрольной воды в исследуемую воду. Наблюдают за скоростью перехода парамеций из исходной капли в опыт.

Используют два контроля: дехлорированную водопроводную воду исследуемого региона и воду из фонового условно чистого участка исследуемого водного объекта.

Каждую пробу воды исследуют в трех повторностях с двумя контролями, т.е. необходимо 6 чашек Петри на одну исследуемую пробу. Постановку каждого варианта проводят через 5 мин, необходимых для учета исходного количества парамеций в контрольной капле под бинокулярной лупой.

### **7.5 Регистрация реакции хемотаксиса**

Регистрация реакции хемотаксиса основана на учете численности переместившихся парамеций в каждом варианте. Для оценки реакции хемотаксиса учитывают количество особей, переместившихся из контрольной капли воды в исследуемую пробу воды.

Учет парамеций ведут под бинокулярной лупой (увеличение 4x12,4) через 15, 30, 60, 120 мин.

## 7.6 Обработка результатов, расчеты и оценка токсичности воды

В таблицу Е.1 (приложение Е) заносят дату проведения биотестирования, номер пробы, номер повторности, количество парамеций, переместившихся в исследуемую воду (в каждой повторности).

Результаты биотестирования оценивают по положительному хемотаксису, т.е. количеству парамеций, переместившихся из контрольной воды в исследуемую.

В каждом варианте токсикологического эксперимента рассчитывают процент парамеций, переместившихся в исследуемую воду. Затем подсчитывают средний процент переместившихся особей на основании результатов трех параллельных определений в контроле и в опыте.

Если количество переместившихся из контрольных вариантов в исследуемую воду парамеций составляет не более 25 %, то воду оценивают как оказывающую ОТД.

Полученные результаты биотестирования заносят в таблицу Е.1 (приложение Е).

## 7.7 Метрологическая характеристика метода

Диапазон перемещения парамеций из контрольной в исследуемую воду в случае положительного хемотаксиса составляет от 0 % до 100 % с внутрилабораторной прецизионностью 25 %.

# 8 Биотест по выживаемости зоопланктеров

## 8.1 Принцип метода

Методика основана на оценке влияния исследуемой воды, отобранный из водных объектов, на зоопланктеров. Тест-объектами могут служить лабораторные культуры парамеций, коловраток, дафний, цериодафний, а также природные популяции этих зоопланктеров, отобранные из фоновых (условно чистых) участков водного объекта. Природные популяции используют в экспедиционных условиях при ЧС. Принципы биотестирования на природных популяциях в основном те же, что и на лабораторных культурах.

В случае ЧС оценивают ОТД пробы воды по изменению показателя выживаемости тест-объектов при экспозиции в исследуемой воде. Показателем выживаемости служит среднее количество тест-объектов, выживших в исследуемой воде за время опыта.

Критерием ОТД является снижение выживаемости тест-объектов не менее чем на 50 % в исследуемой воде по сравнению с контролем. Выживаемость в контроле при этом должна быть не менее 90 %. Наблюде-

ния за выживаемостью проводят через 15; 30; 60 мин, далее через каждый час. Продолжительность биотестирования 24 ч.

## **8.2 Необходимые материалы, оборудование, реактивы**

8.2.1 Культура тест-объекта из представителей зоопланктеров (см. приложения А и Б).

8.2.2 Микроскоп бинокулярный стереоскопический марки МБС по ГОСТ 8074-82.

8.2.3 Пипетки выдувные капиллярные (пастеровские, укороченные с двух сторон или глазные с оттянутым носиком) по ГОСТ 29230-91.

8.2.4 Чашки Петри по ГОСТ 25336-82.

8.2.5 Стаканы вместимостью 0,5-1,0 дм<sup>3</sup> по ГОСТ 23932-90.

8.2.6 Вода дехлорированная водопроводная исследуемого региона.

## **8.3 Проведение биотестирования**

При использовании в качестве тест-объектов парамеций, коловраток берут по капле массовых культур этих зоопланктеров и помещают в чашку Петри. Фильтровальной бумагой отбирают излишки воды, добавляют 1 см<sup>3</sup> исследуемой воды. Под микроскопом подсчитывают исходное количество парамеций. Через 15; 30; 60 и 120 мин подсчитывают количество выживших парамеций.

При использовании в качестве тест-объектов крупного ракового планктона (дафнии, цериодафнии, симоцефалусы), их отсаживают по 10 экземпляров в стаканы вместимостью 0,5- 1,0 дм<sup>3</sup> и добавляют 0,5 дм<sup>3</sup> исследуемой воды.

При использовании в качестве тест-объектов бокоплавов их отсаживают по 10 экземпляров в чашки Петри.

В качестве контроля используют воду фонового (условно чистого) участка, на котором отловлены используемые в качестве тест-объектов виды, и дехлорированную водопроводную воду исследуемого региона. В контроле выживаемость должна быть не менее 90 %.

Все варианты опыта и контроля ставят не менее, чем в трех повторностях. Общее количество организмов в опыте должно быть не менее 30.

## **8.4 Регистрация показателя выживаемости и оценка токсичности воды**

В качестве тест-показателя токсичности используют выживаемость тест-объектов. Количество живых зоопланктеров регистрируют через 15; 30; 60; 120 мин и через 24 ч.

ОТД исследуемой воды на зоопланктеров устанавливают при кратковременном биотестировании (24 ч). Критерием токсичности служит

процент от контроля выживших тест-объектов (при расчете по средним значениям всех повторностей). В случае выживаемости не более 50 % тест-объектов от контроля исследуемую воду оценивают как оказывающую ОТД.

Выживаемость в контроле должна быть не менее 90 % от исходного количества зоопланктеров. В случае значения выживаемости тест-объектов в контроле ниже 90 % токсикологический эксперимент проводят на другой популяции тест-объектов.

Результаты заносят в таблицу Е.2 (приложение Е).

## 9 Определение кратности разбавления воды, снимающего острое токсическое действие воды

### 9.1 Биотест при разбавлении воды, снимающей ОТД

В случае обнаружения ОТД необходимо выявить кратность разбавления исследуемой воды, которая снимает токсическое действие.

Кратность разбавления – 2; 10; 25; 50; 100; 500 раз. Разбавление проводят водой, отобранной из фонового створа, или отстойной дезхлорированной водопроводной водой исследуемого региона.

Биотестирование проводят согласно разделам 7 и 8.

### 9.2 Оценка токсичности воды на основе кратности разбавления пробы

В случае ЧС и при оперативных работах токсическое состояние оценивают на конкретный момент времени исследования. В этом случае при установлении ОТД воды находят кратность разбавления исследуемой воды, при которой токсичность не проявляется.

Оценку токсичности воды и экотоксикологического статуса водного объекта или его участка с точки зрения благополучия водной экосистемы проводят согласно шкале таблицы 1.

Т а б л и ц а 1 - Шкала оценки токсичности и экотоксикологического статуса водного объекта или его участка [5]

Кратность разбавления	Класс токсичности	Экотоксикологический статус
До 1 : 1 включ.	0 Нетоксичная	Чистая
Св. 1 : 1 до 1 : 25 включ.	1 Слабо токсичная	Олиготоксичная
" 1 : 25 " 1 : 50 "	2 Умеренно токсичная	Бета-мезотоксичная
" 1 : 50 " 1 : 100 "	3 Остро токсичная	Альфа-мезотоксичная
" 1 : 100 " 1:500 "	4 Весьма токсичная	Политоксичная
" 1 : 500	5 Чрезвычайно токсичная	Гипертоксичная

Результаты биотестирования заносят в таблицу Е.3 (приложение Е).

## **10 Оценка токсичности воды методом биотестирования с использованием набора биотестов**

10.1 Оценку токсичности исследуемой воды проводят по набору биотестов (см. 5.10). Использование набора биотестов с разными по чувствительности тест-объектами и тест-показателями увеличивает вероятность обнаружения токсичности исследуемой воды.

10.2 Итоговая оценка токсичности ПВС является экспертной. Окончательную оценку проводят по тест-объекту и тест-показателю, проявившему наибольшую чувствительность к воздействию исследуемой воды.

10.3 Токсичность воды оценивается словесно: «оказывает» или «не оказывает острое токсическое действие».

## **11 Требования безопасности, охраны окружающей среды**

11.1 При выполнении работ следует соблюдать общие требования к безопасности на водных объектах и в химических лабораториях, установленные в национальных стандартах и соответствующих нормативных документах.

11.2 Особых требований по экологической безопасности не предъявляется.

## **12 Требования к квалификации оператора**

К выполнению экспериментальных работ по оценке токсичности ПВС методом экспрессного биотестирования допускаются лица, имеющие биологическое, экологическое образование, знакомые с основами водной токсикологии, методами полевых и лабораторных гидробиологических исследований.

**Приложение А**  
**(рекомендуемое)**

**Экологические характеристики гидробионтов,  
используемых в качестве тест-объектов при биотестировании**

Т а б л и ц а А.1 - Наименование гидробионтов, используемых в качестве тест-объектов, в связи с их экологическими особенностями

Наименование гидробионтов	Экологические характеристики						
	Пресноводные	Солоноватоводные	Теплолюбивые	Холодолюбивые	Олигосалбрьы	Мезосалбрьы	Ацидофиллы
<b>PROTOZOA (Простейшие):</b>							
Paramecium caudatum	+	+			+	+	
Paramecium putrinum	+	+			+		
Tetrachimena pyriformis	+	+			+	+	+
Colpidium sp.	+				+		
Styloynchia mytilus	+				+		
Euplotis harpa		+		+			
Euplotis vannus (бентический)			Мор-ской	+			
Cristira sp. (бентический)	+		+				
Uronema marinum (бентический)	+		+				
Pavella sp. (пелагический)	+		+	+			
Balanoin sp. (пелагический)	+		+	+			
<b>ROTATORIA (Коловратки):</b>							
Brachionus calyciflorus	+		+			+	+
Brachionus rubens	+		+	+			+
Brachionus plicatilis		+	+			+	+
Philodina roseola	+		+			+	
Pilodina acuticornis odiosa	+		+			+	
<b>CRUSTACEA (Ракообразные):</b>							
Daphnia magna	+		+			+	
Moina macrocopa	+		+			+	
Bosmina longirostris	+		+	+	+		
Ceriodaphnia reticulata	+		+			+	
Artemia salina		+				+	

## Окончание таблицы А.1

Наименование гидробионтов	Экологические характеристики						
	Пресноводные	Солоноватоводные	Теплолюбивые	Холодолюбивые	Олигосапробы	Мезосапробы	Ацидофилы
<b>MOLLUSCA (Моллюски):</b>							
<i>Lymnaea stagnalis</i>	+		+				
<i>Anadonta sp.</i>	+		+				
<i>Dreissena sp.</i>	+	+	+	+			
<i>Crassostrea virginica</i> устрицы		+	+	+	+		+
<i>Ostrea irridentes</i> устрицы		+	+		+		+
<i>Mytilus galloprovincialis</i> мидии		+	+		+		+
<i>Mytilus edulis</i> мидии		+	+		+		+
<i>Mya arenaria</i>		+	+		+		+
<i>Mytilaster sp.</i>		+	+		+		+
<i>Patella vulgata</i>		+	+		+		+
<i>Rapana venosa</i>		+	+	+	+		+
<b>OLIGOCHAETA</b>							
<b>(малощетинковые черви)</b>							
<i>Aeolosoma hemprichi</i>	+		+			+	
<b>INSECTA (Насекомые):</b>							
<i>Chironomus plumosus</i>	+		+	+			+
П р и м е ч а н и е – Знаком «+» обозначено наличие указанных экологических особенностей гидробионтов.							

**Приложение Б**  
**(рекомендуемое)**

**Гидробионты, используемые в качестве тест-объектов,  
и методы учета популяционных характеристик**

Т а б л и ц а Б.1 - Наименование гидробионтов и методы учета популяционных характеристик

Тест-объект	Метод учета	
	Молодь (ювенильные особи)	Гибель (отмершие особи)
<b>PROTOZOA (Простейшие)</b> родов Paramecium, Tetrachimena, Colpodium, Styloynchia	Микроскопирование: -индивидуальные линии -подсчет численности	Микроскопирование: подсчет количества погибших особей
<b>ROTATORIA (Коловратки)</b> Brachionus calyciflorus, B. gibbens, B. plicatilis, Philodina roseola, P. Acuticornis	Микроскопирование: -индивидуальные линии - подсчет молоди	То же
<b>CRUSTACEA (Ракообразные)</b> Daphnia magna, Moina macrocopa, Ceriodaphnia reticulata, Artemia salina	Визуально: - поведение - подсчет молоди	Визуально подсчет количества погибших особей
<b>OLIGOCHAETA (Малощетинковые черви)</b> Aeolosoma hemprichi	Визуально: - поведение - наличие кладок	То же
<b>Mollusca (Моллюски)</b> Lymnaea stagnalis, Anadonta sp., p. Mytilis, p. Dreissena	Визуально: - количество кладок - количество молоди	"_"
<b>Рыбы</b> Poecilia reticulata, Brachydanio rerio	Визуально: количество молоди	"_"
<b>Insecta (Насекомые)</b> Chironomus plumosus	Визуально: наличие коконов	"_"

## Приложение В (справочное)

### Хемотаксис

**В.1** Хемочувствительность биоты возникла в истории жизни на Земле очень давно. С самого начала эволюции прокариоты были погружены в водную среду. Способность реагировать на химический состав среды была критичной для выживания. Хемотаксис - двигательные реакции свободно передвигающихся растительных и простейших животных организмов, а также клеток (зооспор, сперматозоидов, лейкоцитов и др.) под влиянием химических раздражителей. Хемотаксис может быть положительным — движение направлено к источнику химического раздражителя (по градиенту его концентрации в воздухе или воде), и отрицательным — движение направлено от источника. Явление хемотаксиса известно для ряда микроорганизмов и беспозвоночных животных.

**В.2** Для возникновения хемотаксисов необходимо в среде создать градиент (неоднородность распределения) химического вещества, чтобы организм мог выбрать направление уменьшения вредного воздействия. Характеристиками таксиса служит концентрация организмов в исследуемой зоне через определенное время, которая измеряется оптическими приборами (бинокулярная лупа) (см. рисунок В. 1)

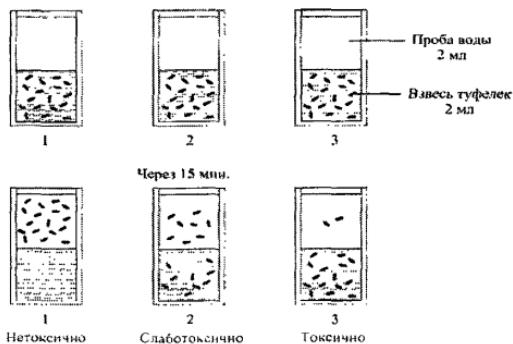


Рисунок В. 1 – Реакция хемотаксиса на примере парамеций (туфелек) [2]

## Приложение Г (справочное)

### Характеристика тест-объекта инфузории *Paramecium caudatum*

#### Г.1 Систематическое положение

Тип - Ciliophora, подтип - Ciliata, класс - Oligohymenophora, отряд - Hymenostomatida, подотряд - Peniculina, род - Paramecium, вид – *Paramecium caudatum Ehrenberg, 1838* (в дальнейшем – парамеция).

Инфузории данного вида как тест-объект обладают рядом достоинств: высокая чувствительность к токсикантам, короткий жизненный цикл, высокая скорость размножения, сочетание признаков эукариотной клетки и организма, ярко выраженные таксисы, достаточно широкая терпимость по отношению к температуре и солености, простота содержания в лабораторных условиях.

#### Г.2 Местообитание

*P. caudatum* – свободноживущая широко распространенная ресничная инфузория. Предпочитает альфа-мезосапробные условия, близкие к нейтральному значения  $\text{pH}=6,5\text{--}7,5$ , температурный оптимум в пределах  $24\text{--}28^{\circ}\text{C}$ . Обитает в пресных водоемах.

#### Г.3 Морфология, биология

Парамеции – наиболее сложно организованные простейшие, очень чувствительные к изменению химического состава среды. Парамеции, представляющие собой одноклеточные организмы. Имеют сигарообразное или веретенообразно вытянутое в поперечном сечении округлое тело. Ресничный покров густой, равномерный. Сзади чуть удлиненный. Длина тела составляет 180-300 мкм [6]. Клетка парамеций содержит два типа ядер: вегетативное и генеративное. Размножаются парамеции либо поперечным делением клеток (бесполое размножение), либо путем, носящим характер коньюгации. Клетки делятся 1-2 раза в сутки.

## Приложение Д (справочное)

### **Получение исходного материала и содержание парамеций в лабораторных условиях**

#### **Д.1 Получение исходного материала для культуры парамеций**

Получить исходный материал для культуры парамеций можно в институтах и учреждениях, занимающихся биотестированием с использованием парамеций (в том числе в ГХИ). Обычно этот вид встречается в местных водоемах, поэтому можно самостоятельно вырастить культуру парамеций.

Выделяют парамеций из природных вод методом концентрирования [7]. Для этого из водоема отбирают пробу воды объемом 5 л. Затем путем фильтрации ее через мембранный фильтр с размером пор 3-5 мкм получают концентрированную пробу объемом 0,04 дм<sup>3</sup>. Полученный концентрат пробы сливают в стакан. Затем осадок с фильтра смывают полученным концентратом в чашки Петри. Высота слоя воды в чашке составляет 0,5-0,8 см. В чашки Петри добавляют корм – сухие пекарские дрожжи (один-два кусочка размером 1 мм<sup>3</sup>). Полученные пробы оставляют на 1-3 сут. Часто уже через сутки начинается массовое развитие разных видов микрозоопланктона. В лаборатории специалист определяет нужный вид инфузорий (парамеций) под микроскопом. Заранее подготовленные чашки Петри наполняют дехлорированной водопроводной водой и в них переносят парамеций с помощью капиллярной пипетки. Такую пипетку используют в дальнейшем при пересадке инфузорий. Начальная плотность размещения парамеций – 5-10 особей на одну чашку Петри. В течение 1-3 сут инфузорий адаптируют к лабораторным условиям и используют полученную культуру как исходную.

#### **Д.2 Содержание культуры, кормление**

Культуру инфузорий выращивают в климатостате, боксе или в любом помещении, не содержащих токсических паров или газов. Оптимальная температура для культивирования и биотестирования 22±2 °С. Дополнительного освещения не требуется. Не допускается освещать парамеций прямыми солнечными лучами. Стеклянную посуду для содержания инфузорий моют водопроводной водой, нельзя использовать для мытья синтетические моющие средства и органические растворители. В помещении, в котором находится культура парамеций, не хранят летучие вещества и не работают с ними.

Для культивирования парамеций используют водопроводную дез chlorированную воду или природную воду из незагрязненного водоема. Вода для культивирования должна удовлетворять следующим требованиям: pH=6,5-7,5, жесткость общая 3-4 ммоль/л. концентрация растворенного кислорода не менее 6,0 мг/л.

Оптимальная плотность культуры 10-20 особей на 1 см<sup>3</sup> воды. Один раз в 7-10 сут культуру пересевают. Чтобы обеспечить стандартные условия культивирования, поддерживающие культуру парамеций в стационарной фазе роста.

В качестве корма для парамеций используют сухие пекарских дрожжей. Для содержания парамеций в одной чашке Петри достаточно 1-2 кусочков сухих пекарских дрожжей размером 1мм<sup>3</sup>.

### **Д.3 Транспортировка культуры**

Культуру парамеций транспортируют в пробирках, не допуская перегрева и переохлаждения. Хранить ее без пересева можно в холодильнике при температуре 8-10 °С в течение 2-3 нед. Период акклиматации к лабораторным условиям составляет 24 ч.

**Приложение Е**  
**(обязательное)**

**Формы представления результатов биотестирования**

**Е.1 Форма результатов биотестирования исследуемой воды по реакции хемотаксиса *Paramecium caudatum***

Т а б л и ц а Е.1 – Результаты биотестирования исследуемой воды по реакции хемотаксиса *Paramecium caudatum* на территории деятельности \_\_\_\_\_ УГМС

Наименование		Дата		Номер пробы	Положительный хемотаксис, %	Оценка токсичности воды
Водного объекта	Пункта наблюдений	Отбора пробы	Проведения биотестирования			
1	2	3	4	5	6	7

Примечание - В графе 7 пишут: «Оказывает острое токсическое действие» или «Не оказывает острое токсическое действие».

**E.2 Форма результатов биотестирования исследуемой воды по показателю выживаемости зоопланктеров**

Т а б л и ц а Е.2 – Результаты биотестирования исследуемой воды по показателю выживаемости \_\_\_\_\_ на территории дея-  
тельности \_\_\_\_\_ УГМС вида зоопланктера

Наименование Водного объекта	Дата		Проведения биотестирования	Номер пробы	Выживаемость, % от контроля	Оценка токсичности воды
	1	2				
<b>П р и м е ч а н и я</b>						
1 В наименовании таблицы указывают вид использованного в качестве тест-объекта зоопланктера (парамеции, коловратки, дафний, симоцефалюсы и т.д.).						
2 В графе 7 пишут: «Оказывает острое токсическое действие» или «Не оказывает острое токсическое действие».						

**Е.3 Форма результатов биотестирования по кратности разбавления исследуемой воды, снимающей острое токсическое действие**

Т а б л и ц а Е.3 – Результаты биотестирования по кратности разбавления исследуемой воды, снимающей острое токсическое действие, на территории деятельности \_\_\_\_\_ УГМС

Наименование		Дата		Проведения биотестирования	Номер пробы	Кратность разбавления	Положительный хемотаксис, %	Оценка опасности воды		
Водного объекта	Пункта наблюдений	Отбора пробы	1							
2	3	4	5	6	7	8				

П р и м е ч а н и е - В графе 8 пишут: «Оказывает острое токсическое действие» или «Не оказывает острое токсическое действие».

**Приложение Ж**  
**(справочное)**

**Библиография**

- [1] Константинов А.С. Общая гидробиология. - М.: Высшая школа, 1986. – 470 с.
- [2] Методика определения токсичности почвы и донных осадков по хемотаксической реакции инфузорий. - М., 1998. - 22 с.
- [3] Федеральный закон РФ "О защите населения и территорий от чрезвычайных ситуациях природного и техногенного характера" от 21.12.94 № 68-ФЗ.
- [4] Правила охраны поверхностных вод (типовые положения). – М.: Госкосмоприрода СССР, 1991
- [5] Брагинский Л.П. Некоторые принципы классификации пресноводных экосистем по уровням токсической загрязненности // Гидробиологический журнал. - 1985. - № 6, Т. 21. - С. 65-74.
- [6] Банина Н.Н. Тип Инфузории //Фауна аэротенков. Атлас. – Л.: Наука, Ленингр., 1984. – С.136-186.
- [7] Бакаева Е.Н., Никаноров А.М. Гидробионты в оценке качества вод. - М.: Наука, 2006. – 238 с.

## **Лист регистрации изменений**

## Содержание

<b>1 Область применения.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Нормативные ссылки .....</b>	<b>1</b>
<b>3 Термины, определения и обозначения.....</b>	<b>2</b>
<b>4 Общие положения .....</b>	<b>4</b>
<b>5 Основные принципы биотестирования поверхностных вод суши в условиях ЧС .....</b>	<b>5</b>
<b>6 Отбор, хранение и подготовка проб поверхностных вод суши для биотестирования.....</b>	<b>7</b>
<b>7 Биотест по реакции хемотаксиса парамеций .....</b>	<b>8</b>
<b>7.1 Принцип метода.....</b>	<b>8</b>
<b>7.2 Необходимые материалы, оборудование, реагенты.....</b>	<b>8</b>
<b>7.3 Подготовка к биотестированию.....</b>	<b>9</b>
<b>7.4 Проведение биотестирования .....</b>	<b>9</b>
<b>7.5 Регистрация реакции хемотаксиса .....</b>	<b>9</b>
<b>7.6 Обработка результатов, расчеты и оценка токсичности воды..</b>	<b>10</b>
<b>7.7 Метрологическая характеристика метода.....</b>	<b>10</b>
<b>8 Биотест по выживаемости зоопланктеров.....</b>	<b>10</b>
<b>8.1 Принцип метода.....</b>	<b>10</b>
<b>8.2 Необходимые материалы, оборудование, реагенты.....</b>	<b>11</b>
<b>8.3 Проведение биотестирования .....</b>	<b>11</b>
<b>8.4 Регистрация показателя выживаемости и оценка токсичности воды .....</b>	<b>11</b>
<b>9 Определение кратности разбавления воды, снимающего острое токсическое действие воды.....</b>	<b>12</b>
<b>9.1 Биотест при разбавлении воды, снимающей ОТД.....</b>	<b>12</b>
<b>9.2 Оценка токсичности воды на основе кратности разбавления пробы .....</b>	<b>12</b>
<b>10 Оценка токсичности воды методом биотестирования с использованием набора биотестов .....</b>	<b>13</b>
<b>11 Требования безопасности, охраны окружающей среды .....</b>	<b>13</b>
<b>12 Требования к квалификации оператора .....</b>	<b>13</b>
<b>Приложение А (рекомендуемое) Экологические характеристики гидробионтов, используемых в качестве тест-объектов при биотестировании .....</b>	<b>14</b>
<b>Приложение Б (рекомендуемое) Гидробионты, используемые в качестве тест-объектов, и методы учета популяционных характеристик .....</b>	<b>16</b>
<b>Приложение В (справочное) Хемотаксис.....</b>	<b>17</b>
<b>Приложение Г (справочное) Характеристика тест-объекта инфузории <i>Paramecium caudatum</i>.....</b>	<b>18</b>
<b>Приложение Д (справочное) Получение исходного материала и содержание парамеций в лабораторных условиях .....</b>	<b>19</b>

Приложение Е (обязательное) Формы представления результатов биотестирования .....	21
Приложение Ж (справочное) Библиография.....	24