МИНИСТЕРСТВО ПРИРОДНЫХ РЕСУРСОВ И ЭКОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральная служба по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды (Росгидромет)

Р У К О В О Д Я Щ И Й Д О К У М Е Н Т

РД 52.24–868 2017

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ВОДЫ И ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ВОДОТОКОВ И ВОДОЕМОВ

Ростов-на-Дону
2017

Предисловие

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

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

3 СОГЛАСОВАН с Федеральным государственным бюджетным учреждением «Научно-производственное объединение «Тайфун» (ФГБУ «НПО «Тайфун») 11.09.2017 и Управлением мониторинга загрязнения окружающей среды, полярных и морских работ (УМЗА) Росгидромета 22.11.2017

4 УТВЕРЖДЕН Руководителем Росгидромета 23.11.2017

ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ приказом Росгидромета от 10.01.2018 от № 2

5 ЗАРЕГИСТРИРОВАН ФГБУ «НПО «Тайфун» от 04.12.2017 за номером РД 52.24.868–2017

6 ВЗАМЕН Р 52.24.566-94 «Методы токсикологической оценки загрязнения пресноводных экосистем»

7 СРОК ПЕРВОЙ ПРОВЕРКИ 2023 год
ПЕРИОДИЧНОСТЬ ПРОВЕРКИ 5 лет

© Росгидромет, ФГБУ «ГХИ», 2017

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 2
4 Общие положения 6
5 Отбор, транспортировка и хранение проб 7
6 Подготовка проб воды и донных отложений для биотестирования 8
7 Основные методы биотестирования воды и донных отложений водотоков и водоемов 9
7.1 Метод биотестирования воды на водорослях 9
7.1.1 Принцип метода 9
7.1.2 Необходимые материалы, оборудование, реактивы 9
7.1.3 Подготовка культуры водорослей 10
7.1.4 Выполнение биотестирования 11
7.1.5 Регистрация численности клеток водорослей 12
7.1.6 Обработка результатов, расчеты и оценка токсичности воды 12
7.2 Метод биотестирования воды на дафниях 14
7.2.1 Принцип метода 14
7.2.2 Необходимые материалы, оборудование 14
7.2.3 Подготовка к биотестированию 15
7.2.4 Выполнение биотестирования 15
7.2.5 Регистрация показателей выживаемости и плодовитости дафний 15
7.2.6 Обработка результатов, расчеты и оценка токсичности воды 16
7.3 Метод биотестирования воды и донных отложений на инфузориях 17
7.3.1 Принцип метода 17
7.3.2 Необходимые материалы, оборудование, реактивы 18
7.3.3 Подготовка к биотестированию 18
7.3.4 Выполнение биотестирования 19
7.3.5 Регистрация показателей гибели и плодовитости 19
7.3.6 Обработка результатов и оценка токсичности воды 20
7.4 Экспресс-метод биотестирования воды по реакции хемотаксиса инфузорий 22
7.4.1 Принцип метода 22
7.4.2 Необходимые материалы, оборудование, реактивы 22
7.4.3 Подготовка к биотестированию 23
7.4.4 Выполнение биотестирования 23
7.4.5 Регистрация реакции хемотаксиса 24
7.4.6 Обработка результатов и оценка токсичности воды 24

7.5 Метод биотестирования воды и донных отложений на коловратках 24
7.5.1 Принцип метода 24
7.5.2 Необходимые материалы, оборудование, реактивы 25
7.5.3 Подготовка к биотестированию 25
7.5.4 Выполнение биотестирования 26
7.5.5 Регистрация показателей гибели и плодовитости коловраток 26
7.5.6 Обработка результатов и оценка токсичности 27
7.6 Экспресс-метод биотестирования воды и водной вытяжки донных отложений по пищевой активности коловраток 29
7.6.1 Принцип метода 29
7.6.2 Необходимые материалы, оборудование, реактивы 29
7.6.3 Подготовка к биотестированию 30
7.6.4 Выполнение биотестирования 30
7.6.5 Регистрация численности клеток водорослей 31
7.6.6 Обработка результатов и оценка токсичности 31
7.7 Метод биотестирования воды с использованием покоящихся яиц коловраток 32
7.7.1 Принцип метода 32
7.7.2 Необходимые материалы, оборудование, реактивы 32
7.7.3 Подготовка к биотестированию 33
7.7.4 Выполнение биотестирования 33
7.7.5 Регистрация показателя выклева коловраток 34
7.7.6 Обработка результатов и оценка токсичности 34
7.8 Метод биотестирования нативных донных отложений на личинках хирономид 35
7.8.1 Принцип метода 35
7.8.2 Необходимые материалы, оборудование, реактивы 35
7.8.3 Подготовка к биотестированию 36
7.8.4 Выполнение биотестирования 36
7.8.5 Регистрация нарушений жизнедеятельности и гибели личинок хирономид 37
7.8.6 Обработка результатов и оценка токсического действия воды и донных отложений 37
8 Дополнительные методы биотестирования воды и донных отложений водотоков и водоемов 38
8.1 Метод биотестирования воды на цериодафниях 38
8.2 Метод биотестирования воды на рыбах 38
8.3 Метод биотестирования воды и донных отложений на популяциях гидробионтов 38
8.4 Метод оценки токсического влияния фитоценозов планктона на формирование качества вод 39

9 Выбор методов биотестирования и оценка токсичности проб воды и донных отложений водотоков и водоемов 39
10 Оценка токсического загрязнения водного объекта 40
11 Условия приемлемости результатов биотестирования 41
12 Требования к технике безопасности и квалификации исполнителей 41
Приложение А (справочное) Общая схема и этапы работ по определению токсичности воды и донных отложений методами биотестирования 42
Приложение Б (рекомендуемое) Форма записи характеристик проб воды и донных отложений 43
Приложение В (справочное) Приготовление питательной среды для культивирования водорослей и для биотестирования 44
Приложение Г (рекомендуемое) Проверка пригодности тест-объектов для биотестирования 46
Приложение Д (рекомендуемое) Формы записи данных и результатов биотестирования проб воды 49
Приложение Е (справочное) Алгоритм статистической обработки результатов биотестирования 54
Библиография 55

Введение

Число загрязняющих веществ, поступающих в водоемы и водотоки, постоянно растет, а контроль токсичных компонентов недостаточен из-за трудностей их аналитического определения, невозможности учета их суммарных эффектов и процессов трансформации в водной экосистеме. Наиболее приемлемым выходом из создавшейся ситуации является введение в практику государственного мониторинга состояния и загрязнения окружающей среды в части поверхностных вод водных объектов методов биотестирования токсичности – интегральной оценки токсичности воды и донных отложений. Данные биотестирования должны использоваться в комплексе с данными биоиндикации и химического анализа, что позволяет получить наиболее полную оценку эколого-токсикологического состояния водных объектов.

Методология биотестирования изначально относилась к компетенции специалистов по водной токсикологии, однако в настоящее время применяется в мировой практике экологами и гидробиологами широкого профиля. Во многих странах биотестирование стало необходимым элементом системы охраны поверхностных вод, обеспеченным нормативами качества воды.

Наблюдения за токсичностью поверхностных вод на основе биотестирования в мониторинге Росгидромета предусмотрены РД 52.24.309. Предложено значительное число новых и усовершенствованных методов биотестирования воды и донных отложений (биотестов), разработаны различные нормативно-методические документы. Последние, однако, многоцелевого назначения (предназначены для тестирования воды, вытяжки из почв, осадков сточных вод, донных отложений и отходов), в связи с чем они не позволяют учитывать особенности биотестирования поверхностных вод.

В настоящий руководящий документ вошли актуализированные и наиболее апробированные и перспективные для мониторинга поверхностных вод водных объектов современные биотесты на гидробионтах разных систематических групп: водорослях, ракообразных, инфузориях, коловратках, рыбах, а также на популяциях гидробионтов.

Важными представляются вопросы выбора метода биотестирования и необходимости использования набора биотестов. Биотестирование на наборе из нескольких биотестов, благодаря различной чувствительности тест-объектов к загрязняющим веществам, позволяет с большей надежностью уловить присутствие в воде или донных отложениях веществ, обуславливающих токсичность. В набор биотестов должны быть включены специально выделенные в руководящем документе «основные методы биотестирования»; в них используются тест-объекты, наиболее широко применяемые в мировой и отечественной практике.

В группу «дополнительных» вошли методы, которые не являются обязательными, но могут быть также включены в набор биотестов.

Особое внимание уделено экспресс-методам, позволяющим получить результат за короткое время (от 2 до 6 ч).

Результаты определения токсичности проб воды с помощью биотестирования дают возможность оценить качество воды по токсичности и перейти к общей оценке токсического загрязнения водного объекта или его участка.

В связи с актуальностью проблемы эвтрофирования водоемов, цветения синезеленых водорослей и токсичности их метаболитов в руководящий документ включен метод биотестирования токсического влияния фитоценоза планктона на формирование качества воды.

Р У К О В О Д Я Щ И Й Д О К У М Е Н Т

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ВОДЫ И ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ВОДОТОКОВ И ВОДОЕМОВ

Дата введения – 2018–10–01

1 Область применения

Настоящий руководящий документ устанавливает методы биотестирования воды и донных отложений водотоков и водоемов, оценки качества воды по токсичности и токсическому загрязнению.

Настоящий руководящий документ предназначен для подразделений Росгидромета, осуществляющих организацию и проведение наблюдений за состоянием поверхностных вод, а также для использования природоохранными организациями, выполняющими мониторинг состояния и загрязнения окружающей среды.

2 Нормативные ссылки

В настоящем руководящем документе использованы нормативные ссылки на следующие нормативные документы:

ГОСТ 31861−2012 Вода. Общие требования к отбору проб

ГОСТ Р 54496−2011 (ИСО 8692:2004) Вода. Определение токсичности с использованием зеленых пресноводных одноклеточных водорослей

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

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

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

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

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

Р 52.24.809−2014 Методы оценки токсического влияния фитоценозов планктона на формирование качества поверхностных вод суши

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

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

Примечания

1 Ссылки на остальные нормативные документы приведены в разделах 7, В.1 (приложение В).

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

- национальных стандартов − в информационной системе общего пользования - на официальном сайте национального органа Российской Федерации по стандартизации в сети Интернет или по ежегодно издаваемому информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по соответствующим ежемесячно издаваемым информационным указателям, опубликованным в текущем году;

- нормативных документов Росгидромета и типовых нормативных документов - по РД 52.18.5 и дополнений к нему − ежегодно издаваемым информационным указателям нормативных документов.

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

3 Термины и определения

В настоящих рекомендациях введены и применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **биологическая индикация воды (биоиндикация)**: Оценка качества воды по наличию водных организмов, являющихся индикаторами ее загрязненности или трофности.

3.2 **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.

3.3 **водный объект:** Природный или искусственный водоем, водоток либо иной объект, постоянное или временное сосредоточение вод в котором имеет характерные формы и признаки водного режима [1].

3.4

водоем: Водный объект в углублении суши, характеризующийся замедленным движением воды или полным его отсутствием.

Примечание - Различают естественные водоемы, представляющие собой природные скопления воды во впадинах, и искусственные водоемы – специально созданные скопления воды в искусственных или естественных углублениях земной поверхности.

[ГОСТ 19179-73, статья 18]

3.5

водоток: Водный объект, характеризующийся движением воды в направлении уклона в углублении земной поверхности.

[ГОСТ 19179-73, статья 15]

3.6.**выживаемость тест-объекта**: Способность тест-объектов сохранять жизнедеятельность при воздействии токсичных химических веществ, токсичной воды или донных отложений в токсикологическом эксперименте.

3.7 **гидробионты**: Все живые организмы, животные и растительные, развивающиеся и существующие в воде и донных отложениях водоемов и водотоков [2].

3.8 **гидробиологические показатели качества воды**: Показатели качества воды, определяемые по состоянию гидробионтов [2].

3.9

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

[ГОСТ 27065-86, статья 15]

3.10

загрязняющее воду вещество (загрязняющее вещество): Вещество в воде, вызывающее нарушение норм качества воды.

[ГОСТ 17.1.1.01-77, статья 40]

3.11

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

[ГОСТ 17.1.1.01-77, статья 4]

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

3.13 **«нативная» проба донных отложений**: Проба донных отложений без какой-либо дополнительной предварительной обработки.

3.14

нормы качества воды: Установленные значения показателей качества воды для конкретных видов водопользования.

[ГОСТ 27065-86, статья 3]

3.15 **острое токсическое действие;** ОТД: Воздействие, при котором критерий токсичности по ответной реакции тест-объекта достигается за

относительно короткий промежуток времени (от нескольких минут до 4 сут в зависимости от биологических особенностей вида тест-объекта).

3.16 **питательная среда**: Смесь дистиллированной (деионизированной) воды и питательных веществ, которая используется для культивирования водорослей и приготовления контрольной пробы (ГОСТ Р 54496).

3.17 **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.

3.18 **популяция**: Совокупность особей одного вида с общим генофондом, в течение большого числа поколений населяющих определенное пространство с относительно однородными условиями обитания. Популяция имеет сложную, обычно самоподдерживающуюся структуру; ее разделяют по полу, возрасту, пространственным и близкородственным объединениям особей [3].

3.19 **плодовитость**: Показатель размножения тест-объектов в токсикологическом эксперименте.

3.20

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

[ГОСТ 19179-73, статья 7]

3.21 **показатели токсичности (токсикологические показатели)**: Показатели, на основании которых делают выводы о вредном действии вещества или загрязненной воды для водного организма.

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

3.23 **регенерация популяции**: Показатель восстановления популяции по соотношению молоди и погибших особей.

3.24 **скорость осветления среды;** СОС: Объем среды, который осветляется одной коловраткой в единицу времени при потреблении микроводорослей.

3.25 **створ пункта наблюдений**: Условное поперечное сечение водоема или водотока, в котором производят комплекс работ для получения данных о показателях качества воды [2].

3.26 **тестируемая проба:** Проба воды или донных отложений, в которой определяется токсичность при биотестировании.

3.27 **тест-объект**: Организм или популяция организмов, используемых для установления токсичности воды или донных отложений при биотестировании.

3.28 **тест-реакция:** Реакция тест-объекта, используемая для определения токсичности воды.

3.29 **токсикологический эксперимент**: Эксперимент в водной токсикологии, в ходе которого оценивают влияние на тест-объект тестируе-

мой воды, донных отложений или химического вещества (например, эталонного токсиканта).

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

3.31 **токсичность воды (донных отложений)**: Характеристика качества воды (донных отложений) по способности вызывать патологические изменения или гибель организмов.

3.32 **«токсичные» виды водорослей**: Виды синезеленых водорослей, образующие в процессе жизнедеятельности токсины.

Примечание – Наиболее распространены «токсичные» виды водорослей: *Microcystis aeruginosa, Aphanizomenon flos-aquae, Anabaena flos-aquae, Oscillatoria limnetica* и другие.

3.33 **токсичные вещества**: Вещества, способные при воздействии на живые организмы, вызывать патологические изменения или их гибель.

3.34 **фоновый створ**: Створ, расположенный на расстоянии не менее 1 км выше источника загрязнения [2].

3.35 **хемотаксис**: Двигательные реакции свободно передвигающихся 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.

3.36 **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.

3.37

цветение вод: Массовое развитие фитопланктона, вызывающее изменение окраски воды.

[ГОСТ 17.1.1.01-77, статья 49]

3.38 **численность (плотность) водорослей**: Количество клеток в единице объема питательной среды или анализируемой пробы.

Примечание – Плотность (численность) клеток выражается количеством клеток на кубический сантиметр (клеток/см^3) (ГОСТ Р 54496).

3.39

эвтрофирование вод: Повышение биологической продуктивности водных объектов в результате накопления в воде биогенных элементов.

[ГОСТ 17.1.1.01-77, статья 48]

3.40 **экосистема**: Сообщество живых организмов и среда их обитания, которые функционируют совместно (обмен веществ и энергии происходит во взаимной связи) [4].

3.41 **экспозиция**: Период времени, в течение которого тест-объект находится под воздействием исследуемого фактора, например, тестируемой воды или химического вещества (РД 52.24.635).

3.42 **эталонный токсикант:** Токсичное вещество, используемое для установления пригодности тест-объекта для биотестирования.

4 Общие положения

4.1 Биотестирование является методом оценки качества и загрязненности воды и донных отложений водотоков и водоемов по ответным реакциям водных организмов (гидробионтов), являющихся тест-объектами. Биотестирование представляет собой токсикологический эксперимент, принятый в водной токсикологии.

4.2 Методы биотестирования, будучи биологическими по сути, близки по назначению к методам химического анализа: как и химические методы, они отражают свойства проб воды или донных отложений.

Эти методы отличаются от методов биоиндикации (традиционных гидробиологических методов биологического анализа), которые позволяют получать информацию о качестве воды по наличию организмов - индикаторов загрязнения.

4.3 О наличии токсичности воды и донных отложений судят главным образом по проявлениям патологических изменений у тест-объектов под влиянием воды и донных отложений при биотестировании, вплоть до их гибели.

4.4 Показателем токсичности является тест-реакция, изменения которой регистрируют в ходе токсикологического эксперимента в течение определенного времени (экспозиции), а критерием токсичности – количественная характеристика этой тест-реакции.

4.5 Для определения токсичности донных отложений используют два подхода: биотестирование «нативных» проб донных отложений (осадков) и биотестирование водной вытяжки.

4.6 До проведения биотестирования проб воды или донных отложений определяют пригодность тест-объекта по его реакции на эталонный токсикант.

4.7 Токсикологические эксперименты проводят в условиях, оптимальных для жизнедеятельности тест-объектов с учетом их особенностей (режима температуры, освещения, питания, минерализации воды и т.д.).

4.8 В результате биотестирования устанавливают степень токсичности пробы, для оценки которой используют следующие характеристики качества воды: условно нетоксичная, слаботоксичная, токсичная, очень токсичная, экстремально токсичная или вода, оказывающая острое, подострое или хроническое токсическое действие (ОТД, пОТД или ХТД соответственно).

4.9 Результат биотестирования пробы должен быть выражен одной степенью токсичности или токсического действия.

4.10 Биотестирование проводят с использованием набора из нескольких биотестов (не менее трёх) на тест-объектах разных трофических уровней. Это связано с различной чувствительностью тест-объектов гидробионтов к загрязняющим веществам, фазностью и особенностью их реагирования на токсичность.

4.11 Заключение о токсичности пробы при использовании набора биотестов делают по данным того биотеста, в котором выявлена наибольшая степень токсичности, т.е. «по наихудшему результату».

Оценка токсичности пробы воды или донных отложений по результатам биотестирования на наборе биотестов является экспертной.

4.12 Биотестирование воды и донных отложений имеет ряд общих этапов выполнения: подготовка тест-объекта, культивирование, проверка пригодности тест-объекта по чувствительности к действию эталонного токсиканта, отбор проб воды и/или донных отложений, транспортировка проб и хранение в лаборатории, подготовка проб для биотестирования, выполнение биотестирования, обработка и оценка результата, представление результатов биотестирования по установленным формам. Общая схема и этапы работ по определению токсичности приведены в приложении А.

4.13 Особенностью биотестирования воды и донных отложений водотоков и водоемов является постановка двух контрольных серий: на дехлорированной (отстоянной в течение 5 сут) водопроводной воде и на воде, отобранной из фонового («условно чистого») створа.

Контроль на водопроводной воде обычно используют для характеристики состояния тест-объектов. Их выживаемость в этой серии должна быть не менее 90 %. Если вода фонового створа оказажется токсичной, данные биотестирования проб опытной серии сравнивают с контролем на водопроводной воде.

Для нескольких проб из одного водного объекта ставят по одной контрольной серии: 1) на дехлорированной водопроводной воде и 2) на воде из фонового участка этого водного объекта.

4.14 Формирование сети пунктов и программ наблюдений проводят согласно РД 52.24.309.

5 Отбор, транспортировка и хранение проб

5.1 Отбор проб воды и их транспортировку выполняют согласно РД 52.24.309.

Посуда из полиэтилена и стекла, используемая для отбора проб и биотестирования, должна быть тщательно вымыта, ополоснута дистиллированной водой и высушена при комнатной температуре. Для мытья посуды используют гидрокарбонат натрия. Органические растворители и

поверхностно-активные вещества для мытья посуды применять недопустимо. Подготовленную посуду, а также материалы помещают в полиэтиленовые пакеты, которые вскрывают непосредственно перед биотестированием. До заполнения посуды ее трижды ополаскивают водой водного объекта.

5.2 Отбор проб донных отложений для биотестирования, транспортировку, хранение проб и установление типа донных отложений проводят в соответствии с РД 52.24.609.

Помимо проб донных отложений, на этом же участке отбирают воду (по возможности из придонного слоя) для использования в биотестировании.

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

6 Подготовка проб воды и донных отложений для биотестирования

6.1 Перед биотестированием воду фильтруют через мельничный газ или фильтровальную бумагу для удаления естественной биоты, доводят до комнатной температуры (достают из холодильника и оставляют на некоторое время до выравнивания температур).

6.2 Измеряют pH и концентрацию растворенного кислорода в воде, чтобы определить их соответствие диапазону оптимальных условий жизнедеятельности тест-объекта и не корректируют.

6.3 Рекомендуется уточнить показатели минерализации тестируемой воды, так как в некоторых водных объектах вода может иметь повышенную минерализацию, что скажется на ее токсичности вследствие несоответствия оптимальным условиям жизнедеятельности тест-объекта. В случае, если минерализация превышает 1 г/дм^3, биотестирование не проводят, либо используют солоноватоводные тест-объекты согласно Р 52.24.690.

6.4 Подготовку «необработанных» проб донных отложений и их водных вытяжек для биотестрования проводят в соответствии с РД 52.24.609.

6.5 При выполнении измерений в лаборатории должны быть соблюдены следующие условия:

– температура окружающего воздуха, °С…….. 20±5;

– атмосферное давление, кПа (мм рт. ст.) ……от 84,0 до 106,7 (от 630 до 800);

– влажность воздуха при температуре 25 °С, %, не более…… 80;

– окружающая среда не должна содержать веществ, которые могут оказывать токсическое действие на тест-объекты.

7 Основные методы биотестирования воды и донных отложений водотоков и водоемов

7.1 Метод биотестирования воды на водорослях

7.1.1 Принцип метода

Метод основан на установлении токсичности (ОТД и степени токсичности) тестируемой воды по угнетению роста лабораторной культуры зеленых протококковых водорослей *Scenedesmus quadricauda (Turp.) Breb. или Chlorella vulgaris Beijer.*

Показателем токсичности является коэффициент прироста численности клеток водорослей при экспозиции в тестируемой пробе воды.

Критерием токсичности является снижение коэффициента прироста численности клеток водорослей в опытной серии по сравнению с контрольной от 35 % до 50 % и более за 72 или 96 ч экспозиции. При этом устанавливают наличие ОТД и степень токсичности (вода условно нетоксичная, слаботоксичная или очень токсичная).

7.1.2 Необходимые материалы, оборудование, реактивы

7.1.2.1 Культура водорослей Scenedesmus quadricauda (Turp.) Breb. или Chlorella vulgaris Beijer. Основные характеристики водорослей, источники их получения, условия культивирования и содержания в лаборатории изложены в ГОСТ Р 54496.

7.1.2.2 Устройство для фильтрования с использованием мембранных или бумажных фильтров.

7.1.2.3 Шкаф сушильный общелабораторного назначения.

7.1.2.4 Холодильник бытовой.

7.1.2.5 Насос вакуумный любого типа.

7.1.2.6 Камера для счета форменных элементов крови и клеточных элементов спинно-мозговой жидкости (Горяева) по ТУ 64-1-816-84.

7.1.2.7 Люминостат с освещением рабочей зоны 3000-6000лк от ламп люминесцентных по ГОСТ 6825-91.

7.1.2.8 Микроскоп инструментальный ИМ 100х50, А по ГОСТ 8074-82 или МБС-10 или другой с аналогичными характеристиками.

7.1.2.9 Пинцет медицинский по ТУ 2-31-32-73.

7.1.2.10 Стекла покровные для микропрепаратов по ГОСТ 6672-75.

7.1.2.11 Дозаторы пипеточные на 0,1 и 0,5 $см^3$ П1 по ТУ 64-1-3329.

7.1.2.12 Пипетки с одной отметкой 2-го класса точности исполнения 2 по ГОСТ 29169-91 вместимостью 10 $см^3$ – 3 шт.

7.1.2.13 Центрифуга лабораторная роторная любого типа

7.1.2.14 Фильтры мембранные «Владипор МФАС-ОС-2», 0,45 мкм, по ТУ 6-55-221-1-29-89 или другого типа, равноценные по характеристикам.

7.1.2.15 Колбы конические типа Кн исполнения 2 по ГОСТ 25336-82 вместимостью 250 $см^3$ – 20 шт.

7.1.2.16 Цилиндры мерные исполнения 1, 3 по ГОСТ 1770-74 вместимостью 100 $см^3$ – 2 шт.

7.1.2.17 Стаканы типа В, исполнения 1, ТХС по ГОСТ 25336-82 вместимостью: 50 $см^3$ – 2 шт., 1000 $см^3$ – 1 шт.

7.1.2.18 Фильтры бумажные обеззоленные «белая лента» по ТУ 6-09-1678-86.

7.1.2.19 Марля медицинская по ГОСТ 9412-93.

7.1.2.20 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72.

7.1.2.21 Вода водопроводная дехлорированная.

7.1.2.22 Спирт этиловый для обезжиривания покровных стекол по ГОСТ Р 5962-2013

Примечание – Допускается использование других типов средств измерений, вспомогательных устройств, в том числе импортных, с характеристиками не хуже, чем у приведенных в 7.1.2; спирта этилового, изготовленного по другой нормативно-технической документации, с квалификацией не ниже указанной в 7.1.2.22.

7.1.3 Подготовка культуры водорослей

7.1.3.1 В коническую колбу вместимостью 250 $см^3$ помещают питательную среду для культивирования, полученную в соответствии с приложением В, и 10 $см^3$ культуры водорослей Scenedesmus quadricauda (Turp.) Breb. или Chlorella vulgaris Beijer, закрывают ватно-марлевой пробкой, стерилизованной в сушильном шкафу в течение 1 ч при 100 °С, и помещают в люминостат. Культура пригодна для получения суспензии на стадии экспоненциального роста. Длительность периода экспоненциального роста от 5 до 7 сут.

7.1.3.2 Подготовка мембранных фильтров

Мембранные фильтры подготавливают следующим образом. На глянцевой (рабочей) поверхности фильтра ставят метку простым карандашом. Фильтры помещают в термостойкий стакан вместимостью 1000 $см^3$, приливают 300-400 $см^3$ дистиллированной воды и кипятят в течение 20 мин. Эту процедуру повторяют трижды, сливая воду после каждого кипячения. Фильтры хранят во влажном состоянии. После длительного хранения (10 дней и более) фильтры перед использованием вновь кипятят в дистиллированной воде в течение 10 мин.

7.1.3.3 Получение суспензии для биотестирования

Перед биотестированием культуру водорослей по 7.1.3.1 сгущают, фильтруя через мембранный фильтр с помощью устройства для фильтрования. Водоросли на фильтре пересушивать недопустимо.

Сконцентрированную на фильтре культуру водорослей с помощью пипетки вместимостью 10 $см^3$ смывают в стакан питательной средой для культивирования, приготовленной в соответствии с приложением В.

Для этого фильтр снимают с воронки пинцетом и помещают в чистый стакан вместимостью 50 $см^3$, прислонив к стенкам стакана так, чтобы фильтр не доставал 2-3 см до дна стакана. По каплям выпускают воду из пипетки на фильтр, смывая клетки водорослей в стакан мягкой кисточкой.

Клетки водорослей можно также сконцентрировать путем центрифугирования в течение 10 мин при 4000-4500 об/мин.

Численность клеток в полученной суспензии должна быть в пределах от $5×10^6$ до $10×10^6$ клеток/$см^3$.

Перед выполнением биотестирования проводят проверку пригодности культуры водорослей в соответствии с Г.2.3 (приложение Г).

7.1.4 Выполнение биотестирования

7.1.4.1 Для биотестирования ставят опытные и контрольную серии. Желательно использовать две контрольные серии: на дехлорированной водопроводной воде и, по возможности, на воде, отобранной на фоновом створе водного объекта и отфильтрованной через бумажный фильтр «белая лента». Для всех опытных серий ставят по одной контрольной серии на дехлорированной водопроводной воде и на воде, отобранной на фоновом створе по 4.13.

Каждую серию ставят в трех повторностях. Опытные и контрольные серии ставят одновременно.

7.1.4.2 Для приготовления опытной серии помещают в каждую из трех конических колб вместимостью 250 $см^3$ по 100 $см^3$ тестируемой воды и по 0,1 $см^3$ питательной среды для биотестирования, приготовленную согласно приложению В, и суспензию водорослей. Объем суспензии рассчитывают таким образом, чтобы численность клеток в каждой из трех колб находилась в пределах от $25×10^3$ до $50×10^3$ клеток/$см^3$.

Для проведения биотестирования колбы перемешивают встряхиванием, закрывают ватно-марлевыми пробками, стерилизованными в сушильном шкафу в течение 1 ч при 100 ^oC. Определяют исходную численность клеток водорослей согласно 7.1.5. Подсчет повторяют трижды в каждой колбе и рассчитывают среднее арифметическое исходной численности клеток водорослей. Содержимое колб вновь перемешивают, закрывают стерильными ватно-марлевыми пробками и помещают в люминостат на экспозицию 72 ч при постоянном освещении 3000-6000 лк. Ежедневно 1-2 раза в день колбы перемешивают встряхиванием.

7.1.4.3 Для приготовления контрольной серии помещают в каждую из трех конических колб вместимостью 250 $см^3$ по 100 $см^3$ дехлорированной водопроводной воды (или отфильтрованной воды, отобранной на фоновом створе водного объекта) и по 0,1 $см^3$ питательной среды для биотестирования, приготовленную согласно приложению В, и суспензию водорослей в каждую. Объем суспензии рассчитывают таким образом, чтобы численность клеток в каждой из трех колб находилась в пределах от $25×10^3$ до $50×10^3$ клеток/$см^3$.

Биотестирование контрольной серии проводят аналогично 7.1.4.2.

7.1.4.4 Через 72 ч проводят подсчет численности клеток водорослей в контрольной и опытных сериях. Если через 72 ч в опытной серии токсичность выявляется (7.1.5), эксперимент прекращают, считая его законченным. В противном случае эксперимент продолжают до 96 ч.

7.1.5 Регистрация численности клеток водорослей

Численность клеток водорослей определяют путем подсчета под микроскопом в камере Горяева.

Примечание - Изменения численности клеток водорослей можно определить также путем измерения оптической плотности культуры водорослей согласно ГОСТ Р 54496.

При использовании камеры Горяева увеличение объектива микроскопа должно быть 20×, а окуляра от 10× до 15×. Все элементы камеры Горяева обезжиривают спиртом, накрывают камеру покровным стеклом и притирают его до образования радужных колец интерференции. Из каждой колбы стеклянной палочкой вносят по одной капле тщательно перемешанной суспензии на верхний и нижний края покровного стекла. Камеру заполняют так, чтобы не образовывались пузырьки воздуха, избыток суспензии вытесняется по канавкам. Просматривают 16 малых квадратов по диагонали или все поле камеры. Если по результату подсчета численность в 16 квадратах более 50 клеток, то учитывают полученное значение и все поле камеры не обсчитывают.

Вычисляют численность клеток водорослей в 1 см^3 суспензии по формуле

$$M = \left(\frac{m}{nV} \right) \cdot 10^3, \qquad (1)$$

где M − численность клеток водорослей, клеток/см^3;

m − число подсчитанных клеток в малых квадратах камеры, клеток;

n − число просчитанных малых квадратов камеры;

V − объем части камеры, соответствующий площади малого квадрата, см^3.

7.1.6 Обработка результатов, расчеты и оценка токсичности воды

Для оценки токсичности тестируемой воды рассчитывают коэффициенты прироста численности клеток водорослей B_t, отн. ед, за 72 или 96 ч экспозиции в опытной и контрольной сериях, используя формулу

$$B_t = \frac{\overline{M}_t}{\overline{M}_{\text{исх}}}, \qquad (2)$$

где $\overline{M}_t$ − среднее арифметическое значение численности клеток водорослей в опытной и в контрольной сериях через 72 или 96 ч экспозиции, клеток/см^3;

$\overline{M}_{исх}$ − среднее арифметическое значение исходной численности клеток водорослей в опытной и в контрольной сериях, клеток/см^3.

Рассчитывают отклонение коэффициента прироста численности клеток водорослей Δ_t, % по формуле

$$\Delta_t = \frac{(B_{k_t} - Bo_t)}{B_{k_t}} \cdot 100, \quad (3)$$

где B_{k_t} – коэффициент прироста численности клеток водорослей в контрольной серии, отн. ед.;

Bo_t – коэффициент прироста численности клеток водорослей в опытной серии, отн. ед.;

t – экспозиция, ч.

Снижение коэффициента прироста численности клеток водорослей в опытной серии по сравнению с контрольной свидетельствуют об угнетении роста водорослей и указывает на токсичность пробы воды. Оценку токсичности воды: токсического действия и степени токсичности, - проводят по значениям отклонения коэффициента прироста численности клеток водорослей, используя таблицу 1.

Таблица 1 – Оценка токсичности воды по отклонению коэффициента прироста численности клеток водорослей (угнетению роста водорослей)

Отклонение коэффициента прироста численности клеток водорослей в опытной серии от контрольной, %	Токсическое действие пробы воды	Степень токсичности воды
До 35 включ.	Отсутствует	Условно нетоксичная
Св. 35 до 50 включ.	Отсутствует ОТД	Слаботоксичная
Св. 50	Оказывает ОТД	Очень токсичная

Наиболее надежной является оценка по ОТД, о наличии которого судят по снижению коэффициента прироста численности водорослей на 50 % и более за 72 или 96 ч экспозиции.

В отдельных случаях коэффициенты прироста численности клеток водорослей в опытной серии могут быть больше, чем в контрольной (Δ_t будет иметь отрицательное значение). В этих случаях тестируемая вода оказывает стимулирующее влияние на рост водорослей, которое отмечают в журнале.

Полученные результаты записывают по форме таблицы Д.1 (приложение Д).

7.2 Метод биотестирования воды на дафниях

7.2.1 Принцип метода

Метод основан на установлении токсического действия: ОТД, пОТД или ХТД – тестируемой воды на лабораторную культуру дафний *Daphnia magna St.* Токсическое действие тестируемой воды устанавливают по снижению выживаемости или плодовитости дафний в опытной серии по сравнению с контрольной при определенной экспозиции.

Показателями токсичности служат выживаемость и плодовитость дафний. Выживаемость выражают как среднее число выживших дафний, плодовитость – как среднее число выметанной молоди в расчете на одну выжившую (на момент регистрации) особь, в течение экспозиции в тестируемой воде.

Критерием токсичности является снижение выживаемости дафний на 50 % по сравнению с контрольной серией для ОТД при экспозиции 96 ч (4 сут), для пОТД – при экспозиции св. 4 до 7 сут. Выживаемость дафний в контрольной серии не должна быть ниже 90 %. Критерием ХТД является статистически достоверное снижение плодовитости дафний по сравнению с плодовитостью в контрольной серии при экспозиции св. 7 до 30 сут. Статистическую обработку проводят в соответствии с приложением Е.

7.2.2 Необходимые материалы, оборудование

7.2.2.1 Культура дафний *Daphnia magna St.* Основные характеристики дафний, источники их получения, условия культивирования и содержания в лаборатории изложены в ГОСТ Р 56236.

7.2.2.2 Одноклеточные протококковые водоросли для кормления дафний родов *Chlorella* и *Scenedesmus*. Культивирование водорослей производится на питательной среде в соответствии с приложением В.

7.2.2.3 Фильтры бумажные обеззоленные «белая лента» по ТУ 6-09-1678-86.

7.2.2.4 Цилиндры мерные исполнения 1, 3 по ГОСТ 1770-74 вместимостью 250 $см^3$ – 2 шт.

7.2.2.5 Стаканы типа В исполнения 2 по ГОСТ 25336-82 вместимостью 600 $см^3$ – 1 шт.

7.2.2.6 Устройство для фильтрования с использованием мембранных или бумажных фильтров.

7.2.2.7 Аквариумы вместимостью 10-30 $дм^3$.

7.2.2.8 Стеклянная палочка диаметром 4 мм и длиной 1500 мм по ГОСТ 27460-87 – 1 шт.

7.2.2.9 Ткани для сит из шелковых и синтетических нитей (мельничный газ № 76) по ГОСТ 4403-91.

7.2.3 Подготовка к биотестированию

Для биотестирования рекомендуется использовать молодь дафний: односуточных особей из синхронизированной культуры (например, третье поколение, полученное путем ациклического партеногенеза в определенных условиях разведения (в соответствии с ИСО 6341:2012) или одновозрастных дафний из несинхронизированной культуры.

Перед выполнением биотестирования:

1) пробы воды фильтруют через мельничный газ или бумажный фильтр для удаления природного зоопланктона;

2) проводят проверку пригодности культуры дафний в соответствии Г.2.4 (приложение Г.)

7.2.4 Выполнение биотестирования

Непосредственно перед выполнением биотестирования молодь дафний отлавливают стеклянной палочкой из аквариума, где содержится культура, и помещают в стеклянный стакан вместимостью 600 $дм^3$ для удобства их последующего переноса в стаканы для биотестирования.

Каждую серию ставят в трех повторностях.

Для приготовления опытной серии в три стакана вместимостью 600 $см^3$ помещают по 10 особей дафний в каждый, удаляют излишек аквариумной воды пипеткой и сразу осторожно (по стенке, чтобы не травмировать дафний!) приливают мерным цилиндром по 250 $см^3$ тестируемой воды.

Для приготовления контрольной серии в 3 стакана вместимостью 600 $см^3$ помещают вначале по 10 особей дафний в каждый, удаляют излишек аквариумной воды пипеткой и сразу осторожно (по стенке, чтобы не травмировать дафний!) приливают мерным цилиндром по 250 $см^3$ аквариумной воды.

Таким образом, необходимый общий объем одной пробы воды для биотестирования составляет 600 $см^3$, а общее количество дафний на одну пробу – 30 особей.

В течение первых двух суток дафний не кормят, с третьих – начинают кормить, приливая 1-2 капли взвеси водорослей ежедневно. Количество корма, вносимое в сосуды для биотестирования, должно быть одинаковым.

7.2.5 Регистрация показателей выживаемости и плодовитости дафний

Наблюдения за дафниями ведут в первый час непрерывно, затем в течение 6 ч – каждый час, в дальнейшем 2 раза в день ежедневно.

Регистрируют показатели выживаемости и плодовитости. Кроме того, учитывают поведение рачков, изменение окраски тела и другие показатели жизнедеятельности. Погибшими считают дафний, которые лежат на дне стакана и не совершают плавательных движений после его покачивания в течение 15 с (даже если их антенны колеблются). Погибших дафний учитывают и удаляют из стакана. По мере появления молоди ее изымают из стаканов, просчитывают и удаляют.

Опыт прекращают и эксперимент считают завершенным, если вода проявит токсичность по показателю выживаемости, которую оценивают как ОТД или пОТД или продолжают до тех пор, пока не будет установлено ХТД по показателю плодовитости (в соответствии с 7.2.6).

При обнаружении ОТД или пОТД биотестирование прекращают.

Данные о количестве выживших дафний и выметанной молоди за каждые сутки наблюдений записывают по формам таблиц Д.2 и Д.3 (приложение Д).

7.2.6 Обработка результатов, расчеты и оценка токсичности воды

Показатель выживаемости дафний в опытной серии $\overline{X}_{\text{о}}$, %, рассчитывают по формуле

$$\overline{X}_{\text{о}} = \frac{\sum X_{\text{о}_t}}{\sum N_{\text{о}}} \cdot 100, \qquad (4)$$

где $X_{\text{о}_t}$ − количество выживших дафний в каждой повторности при экспозиции i, экз.;

$N_{\text{о}}$ − исходное количество дафний в каждой повторности, экз.

Выживаемость дафний в контрольной серии $\overline{X}_{\text{к}}$, %, рассчитывают по формуле

$$\overline{X}_{\text{к}} = \frac{\sum X_{\text{к}_i}}{\sum N_{\text{к}}} \cdot 100, \qquad (5)$$

где $X_{\text{к}_i}$ − количество выживших дафний в каждой повторности при экспозиции *i*, экз.;

$N_{\text{к}}$ − исходное количество дафний в каждой повторности, экз.

Показатель плодовитости дафний в опытной серии $\overline{X}$, %, по сравнению с контрольной рассчитывают по формуле

$$\overline{X} = \frac{(\overline{X}_{\text{к}} - \overline{X}_{\text{о}})}{\overline{X}_{\text{к}}} \cdot 100 \qquad (5а)$$

Плодовитость дафний *D*, %, в тестируемой воде и в контроле рассчитывают по формуле

$$D = \frac{\sum M_j}{\sum N_j} \cdot 100, \quad (6)$$

где M_j − численность молоди в каждом вымете при экспозиции j, экз.;

N_j − количество дафний, выметавших молодь и выживших к моменту учета данных по плодовитости, экз.

Результаты биотестирования по снижению выживаемости и плодовитости используют для оценки токсичности тестируемой воды.

Острое, подострое и хроническое токсическое действие (ОТД, пОТД и ХТД соответственно) тестируемой воды на дафний устанавливают в соответствии с критерием токсичности согласно 7.2.1.

Если плодовитость в опытной серии увеличена по сравнению с контрольной, считают, что проба тестируемой воды не токсична, а оказывает стимулирующее действие на дафний.

Полученные данные биотестирования записывают в соответствии с формами таблицы Д.2 и таблицы Д.3 (приложение Д).

Статистическую обработку результатов биотестирования по установлению ХТД проводят согласно приложению Е.

Результаты биотестирования проб, отобранных на различных участках водного объекта, используют для оценки уровня токсического загрязнения водного объекта согласно разделу 11.

7.3 Метод биотестирования воды и донных отложений на инфузориях

7.3.1 Принцип метода

Метод основан на установлении токсического действия тестируемой воды или водной вытяжки донных отложений по влиянию на лабораторную культуру инфузорий *Paramecium caudatum Ehrenberg 1838*, *п/т Ciliata*. Влияние оценивают по изменению показателей гибели и плодовитости инфузорий при определенной экспозиции в опытной серии по сравнению с контрольной.

Токсичность оценивают по показателю гибели (среднее количество погибших инфузорий) или показателю плодовитости (средний прирост численности инфузорий, появившихся от одной особи) в течение экспозиции.

Критерием токсичности служит увеличение показателя гибели на 25 % и более, снижение плодовитости на 50 % и более в опытной серии по сравнению с контрольной в зависимости от экспозиции.

Острое, подострое и хроническое токсическое действие тестируемой воды или водной вытяжки донных отложений на инфузорий уста-

навливают в зависимости от времени, по истечении которого показатели гибели и плодовитости достигают критерия токсичности: ОТД устанавливают при экспозиции от 1 до 24 ч, пОТД – 48 ч, ХТД – 72 ч.

7.3.2 Необходимые материалы, оборудование, реактивы

7.3.2.1 Культура инфузорий *Paramecium caudatum Ehrenberg 1838, п/т Ciliata*. Основные характеристики *Paramecium caudatum*, источники получения, условия культивирования и содержания в лаборатории изложены в Р 52.24.741.

7.3.2.2 Микроскоп инструментальный ИМ 100х50, А по ГОСТ 8074-82 или МБС-10 или другой с аналогичными характеристиками.

7.3.2.3 Фильтры бумажные обеззоленные «белая лента» по ТУ 6-09-1678-86.

7.3.2.4 Дрожжи хлебопекарные прессованные по ГОСТ Р 54731-2011.

7.3.2.5 Пипетки Пастера по ТУ 9464-001-52876351-2000 – 3 шт.

7.3.2.6 Пипетки второго класса точности на 1 $см^3$ ГОСТ 29228-91 – 3 шт.

7.3.2.7 Планшеты иммуноферментные с крышками на 96 лунок, плоскодонные по ТУ 9398-058-00480230-2009 – 2 шт.

7.3.2.8 Чашки биологические ЧБН (Петри) по ГОСТ 25336-82 диаметром 100 мм – 4 шт.

7.3.2.9 Стаканы типа В, исполнения 1 по ГОСТ 25336-82 вместимостью 100 $см^3$ – 2 шт.

7.3.2.10 Вода водопроводная дехлорированная (отстоянная в течение 5 сут).

7.3.2.11 Стеклянная палочка диаметром 4 мм и длиной 1500 мм по ГОСТ 27460-87 – 1 шт.

Примечание – Допускается применение других типов средств измерений, вспомогательных устройств, в том числе импортных, с аналогичными и лучшими метрологическими и техническими характеристиками.

7.3.3 Подготовка к биотестированию

Исходный материал инфузорий для биотестирования получают за 1-3 сут до опыта.

Для этого в чистую чашку Петри приливают 60 $см^3$ дехлорированной водопроводной воды и помещают 1-2 кусочка размером 1 $мм^3$ высушенных хлебопекарных прессованных дрожжей. Содержимое чашки Петри тщательно размешивают стеклянной палочкой и вносят 1 каплю культуральной среды инфузорий по 7.3.2.1.

Перед выполнением биотестирования проводят проверку пригодности культуры инфузорий для использования в биотесте по чувствительности к эталонному токсиканту в соответствии с Г.2.5 (приложение Г).

Пробу тестируемой воды фильтруют через бумажный фильтр «белая лента» для удаления взвеси.

Водную вытяжку из донных отложений готовят согласно Р 52.24.662.

7.3.4 Выполнение биотестирования

7.3.4.1 Общий объем воды и водной вытяжки донных отложений для биотестирования одной пробы составляет 20 $см^3$.

Биотестирование проводят на индивидуальных линиях инфузорий при комнатной температуре в нестерильных условиях в защищенном от прямого солнечного света месте. Для этого используют иммуноферментный планшет. В каждой серии биотестирования (опытной и контрольной) используют по 40 особей (четыре повторности из 10 лунок).

7.3.4.2 Для проведения биотестирования в каждую из 40 лунок иммуноферментного планшета с помощью пипетки Пастера под микроскопом отсаживают по одной особи инфузорий.

7.3.4.3 Попавшую с инфузориями воду удаляют с помощью фильтровальной бумаги «белая лента» и пипеткой вместимостью 1 $см^3$ приливают 0,5 $см^3$ тестируемой воды или водной вытяжки донных отложений.

7.3.4.4 Одновременно ставят две контрольные серии. Для этого в каждую из 80 лунок второго иммуноферментного планшета с помощью пипетки Пастера под микроскопом отсаживают по одной особи инфузорий. В 40 лунок добавляют по 0,5 $см^3$ дехлорированной (отстоянной в течение 5-ти сут) водопроводной воды, в остальные 40 лунок - воды, отобранной из фонового («условно чистого») створа.

7.3.4.5 Через 24 ч от начала биотестирования инфузорий кормят суспензией дрожжей хлебопекарных прессованных. Суспензию готовят посредством внесения 1-2 кусочков высушенных дрожжей хлебопекарных прессованных размером 1 $мм^3$ в стакан с 50 $см^3$ дехлорированной водопроводной воды. Далее содержимое стакана перемешивают стеклянной палочкой и выдерживают в течение 1 ч. Полученную суспензию объемом 0,05 $см^3$ вносят в каждую лунку пипеткой вместимостью 1 $см^3$.

7.3.5 Регистрация показателей гибели и плодовитости

Регистрацию показателей гибели и плодовитости проводят путем учета количества и состояния инфузорий в каждой лунке. Учет количества инфузорий ведут под микроскопом при увеличении 4×12 через 24, 48 и 72 ч.

Во время наблюдений под микроскопом содержимое лунок осторожно барботируют пузырьками воздуха из пипетки Пастера для того, чтобы выявить неподвижных погибших особей.

Показателем гибели инфузорий служит деформация тела, разрыв оболочки (пелликулы), лизис клетки, а также сохранение неподвижности после барботирования водной среды.

Исходную численность инфузорий, число живых и погибших особей в контрольных и опытной сериях в течение биотестирования записывают в соответствии с таблицей Д.4 (приложение Д).

7.3.6 Обработка результатов и оценка токсичности воды

7.3.6.1 Результаты биотестирования оценивают по показателям гибели и плодовитости инфузорий за 24, 48 и 72 ч.

При обработке результатов биотестирования вначале сравнивают показатели гибели в контрольных сериях на дехлорированной водопроводной воде и на воде из фонового створа при условии, что гибель в дехлорированной водопроводной воде не выше 10 %. Если увеличение показателя гибели инфузорий в воде фонового створа по сравнению с дехлорированной водопроводной водой не превышает 25 % (вода фонового створа не токсична), то результаты в опытной серии сравнивают с контролем на воде из фонового створа. Если в воде фонового створа увеличение показателя гибели инфузорий по сравнению с контрольной серией на дехлорированной водопроводной воде составляет 25 % и более, то воду фонового створа оценивают как токсичную и результаты опытной серии сравнивают с контрольной серией на водопроводной воде.

7.3.6.2 Относительное количество особей погибших инфузорий в опытной или контрольной сериях $N_{ги}$,%, рассчитывают по формуле

$$N_{ги} = \frac{\overline{N}_{и}}{\overline{N}_{исх}} \cdot 100, \qquad (7)$$

где $\overline{N}_{и}$ – среднее арифметическое значение количества особей погибших инфузорий в опытной или контрольной сериях, экз.;

$\overline{N}_{исх}$ – среднее арифметическое значение исходного количества особей инфузорий в опытной или контрольной сериях, экз.

7.3.6.3 Изменение показателя гибели инфузорий $A_{ГИ}$, %, в опытной серии по сравнению с контрольной, выбранной согласно 7.3.6.1, рассчитывают по формуле

$$A_{ГИ} = N_{ги_1} - N_{ги_2} \qquad (8)$$

где $N_{ги_1}$ – относительное количество особей погибших инфузорий в опытной серии,%;

$N_{ги_2}$ – относительное количество особей погибших инфузорий в контрольной серии,%.

Увеличение гибели инфузорий в опытной серии по сравнению с контрольной на 25 % и более свидетельствует о наличии токсического действия тестируемой воды или водной вытяжки донных отложений.

7.3.6.4 Если увеличение показателя гибели в опытной серии менее 25 %, то далее рассчитывают среднее значение показателя плодовитости инфузорий $\overline{G}_{и}$ (количество особей, полученных от одной инфузории) на основе прироста их численности для каждой экспозиции (24, 48, 72 ч) в опытной и контрольной сериях по формуле

$$\overline{G}_{и} = \frac{\sum \overline{N}_{и_t} - \sum \overline{N}_{и_{исх}}}{\sum \overline{N}_{и_{исх}}}, \quad (9)$$

где $\sum \overline{N}_{и_t}$ – общее количество инфузорий для соответствующей экспозиции t, экз.;

$\sum \overline{N}_{и_{исх}}$ – общее исходное количество инфузорий, экз.

Отклонение значений показателя средней плодовитости инфузорий опытной серии от контрольной $A_{GИ}$, %, рассчитывают по формуле

$$A_{Gи} = \frac{\overline{G}_{и_1} - \overline{G}_{и_2}}{\overline{G}_{и_2}} \cdot 100, \quad (10)$$

где $\overline{G}_{и_1}$ и $\overline{G}_{и_2}$ – значения показателей средней плодовитости инфузорий в опытной и контрольной сериях соответственно.

Отклонения значения показателя плодовитости в опытной серии от контрольной могут быть отрицательными и положительными. Положительные значения отклонения свидетельствуют об увеличении плодовитости по сравнению с выбранной контрольной серией. Это может быть обусловлено наличием достаточного количества в тестируемой воде (или водной вытяжке) бактерий и органических веществ. В этом случае действие оценивают как стимулирующее.

Токсическое действие тестируемой воды или водных вытяжек донных отложений по показателям гибели и плодовитости инфузорий в зависимости от времени выявления (экспозиции) проводят в соответствии с таблицей 3.

Результаты биотестирования записывают по форме таблицы Д.5 (приложение Д).

Таблица 3 – Оценка токсического действия воды или водных вытяжек донных отложений по данным биотестирования на инфузориях

Экспозиция, ч	Увеличение значений показателя гибели относительно контрольной серии, %	Снижение значений показателя плодовитости относительно контрольной серии, %	Оценка токсического действия воды или водных вытяжек
От 1 до 24	До 25 включ.	До 50 включ.	Отсутствует ОТД
		Св. 50	ОТД
	Св. 25	Не рассчитывают	
48	До 25 включ.	До 50 включ.	Отсутствует пОТД
		Св. 50	пОТД
	Св. 25	Не рассчитывают	
72	До 25 включ.	До 50 включ.	Отсутствует ХТД
		Св. 50	ХТД
	Св. 25	Не рассчитывают	
Примечание − В случае увеличения плодовитости в сравнении с контролем отмечают стимулирующее действие тестируемой воды.			

7.4 Экспресс-метод биотестирования воды по реакции хемотаксиса инфузорий

7.4.1 Принцип метода

Экспресс-метод основан на установлении токсичности тестируемой воды по влиянию на хемотаксис инфузорий *Paramecium caudatum Ehrenberg 1838, п /т Ciliata*. Далее – парамеций.

Влияние тестируемой воды оценивают по двигательной реакции инфузорий. Показателем токсичности служит положительный хемотаксис: количество инфузорий, переместившихся в тестируемую воду в течение 2 ч экспозиции. Количество особей, перемещающихся в тестируемую воду, зависит от ее токсичности. При отсутствии токсичности в тестируемой воде парамеции распределяются относительно равномерно между исходной и тестируемой водой. С увеличением токсичности число переместившихся в тестируемую воду парамеций уменьшается, т.е. положительный хемотаксис снижается.

Критерием токсичности является снижение количества переместившихся в тестируемую воду парамеций (положительного хемотаксиса) до 25 % и менее от их исходного числа.

7.4.2 Необходимые материалы, оборудование, реактивы

7.4.2.1 Культура инфузорий *Paramecium caudatum Ehreberg* 1838, п/т Ciliata. Основные характеристики *Paramecium caudatum*, источники получения, условия культивирования и содержания в лаборатории изложены в Р 52.24.741.

7.4.2.2 Микроскоп инструментальный ИМ 100х50, А по ГОСТ 8074-82 или МБС-10 или другой с аналогичными характеристиками.

7.4.2.3 Пипетки Пастера по ТУ 9464-001-52876351-2000 – 3 шт.

7.4.2.4 Пипетки концевые 2-го класса точности по ГОСТ 29228-91 вместимостью 1 $см^3$ – 3 шт.

7.4.2.5 Чашки биологические ЧБН (Петри) по ГОСТ 25336-82 диаметром 100 мм – 3 шт.

7.4.2.6 Стеклянная палочка диаметром 4 мм и длиной 1500 мм по ГОСТ 27460-87 – 1 шт.

7.4.2.7 Дрожжи хлебопекарные прессованные по ГОСТ Р 54731-2011.

7.4.2.8 Фильтры бумажные обеззоленные «белая лента» по ТУ 6-09-1678-86.

Примечание – Допускается применение других типов средств измерений, вспомогательных устройств, в том числе импортных, с аналогичными и лучшими метрологическими и техническими характеристиками.

7.4.3 Подготовка к биотестированию

Исходный материал парамеций получают за 1-3 сут до биотестирования. Для этого в чистую чашку Петри приливают 60 $см^3$ дехлорированной водопроводной воды и помещают 1-2 кусочка размером 1 $мм^3$ высушенных хлебопекарных прессованных дрожжей. Содержимое чашки Петри тщательно размешивают стеклянной палочкой и вносят 1 каплю культуральной среды парамеций по 7.4.2.1.

Перед выполнением биотестирования проводят проверку пригодности культуры парамеций для использования в биотесте по чувствительности к эталонному токсиканту в соответствии с Г.2.5 (приложение Г).

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

Пробу тестируемой воды фильтруют через бумажный фильтр «белая лента» для удаления взвеси.

7.4.4 Выполнение биотестирования

7.4.4.1 Общий объем воды для биотестирования одной пробы составляет 50 $см^3$.

7.4.4.2 Биотестирование проводят на культуральной среде парамеций, полученной по 7.4.3. Для этого в чашку Петри пипеткой вместимостью 1 $см^3$ вносят одну каплю (0,1 $см^3$) культуральной среды с парамециями. Под микроскопом подсчитывают исходное количество парамеций.

7.4.4.3 Далее в эту же чашку Петри на расстоянии 0,5-0,8 см с первой каплей вносят одну каплю (0,1 $см^3$) тестируемой воды. С помощью пипетки Пастера делают перемычку между каплей с тестируемой водой и каплей с культуральной средой и наблюдают за перемещением парамеций в тестируемую воду.

7.4.4.4 Биотестирование каждой пробы воды проводят в трех повторностях. Для тестирования одной пробы воды необходимы 3 чашки Петри. Парамеций в чашки Петри вносят с интервалом в 10 мин для удобства последующей регистрации.

7.4.5 Регистрация реакции хемотаксиса

Регистрацию реакции хемотаксиса проводят путём учета в каждой из 3 чашек Петри количества особей парамеций, переместившихся в тестируемую воду.

Учет парамеций ведут под микроскопом через 30 и 120 мин.

7.4.6 Обработка результатов и оценка токсичности воды

Результаты биотестирования оценивают по положительному хемотаксису, т.е. количеству парамеций, переместившихся в тестируемую воду.

Рассчитывают средний процент парамеций, переместившихся в тестируемую воду на основании результатов трех параллельных определений. Если количество переместившихся в тестируемую воду парамеций составит не более 25 %, то воду оценивают как токсичную.

Полученные результаты биотестирования записывают по форме таблицы Д.6 (приложение Д).

7.5 Метод биотестирования воды и донных отложений на коловратках

7.5.1 Принцип метода

Метод основан на установлении токсического действия тестируемой воды или водной вытяжки донных отложений по влиянию на лабораторную культуру коловраток *Brachionus calyciflorus Pallas (кл. Rotatoria / Rotifera).* Влияние тестируемой воды оценивают по изменению показателей гибели (число погибших особей) и плодовитости коловраток (количество молоди, полученное от одной самки) в зависимости от экспозиции в опытной серии по сравнению с контрольной.

Критерием токсичности является увеличение показателей гибели на 30 % и более, снижение показателей плодовитости на 50 % и более в опытной серии по сравнению с контрольной в зависимости от экспозиции.

ОТД, пОТД и ХТД тестируемой пробы на коловраток устанавливают в зависимости от времени, по истечении которого показатели гибели и плодовитости достигают критерия токсичности: ОТД устанавливают при экспозиции от 1 до 24 ч, пОТД – 48 ч, ХТД – 96 ч.

7.5.2 Необходимые материалы, оборудование, реактивы

7.5.2.1 Культура коловраток *Brachionus calyciflorus Pallas*. Основные характеристики коловраток, источники их получения, условия культивирования и содержания в лаборатории изложены в Р 52.24.662.

7.5.2.2 Одноклеточные протококковые водоросли родов *Chlorella* и *Scenedesmus* для кормления дафний. Культуру водорослей готовят на питательной среде в соответствии с приложением В.

7.5.2.3 Микроскоп инструментальный ИМ 100х50, А по ГОСТ 8074-82 или МБС-10 или другой с аналогичными характеристиками.

7.5.2.4 Фильтры бумажные обеззоленные «белая лента» по ТУ 6-09-1678-86.

7.5.2.5 Стаканы типа В, исполнения 1 по ГОСТ 25336-82 вместимостью 100 $см^3$ – 2 шт.

7.5.2.6 Пипетки Пастера по ТУ 9464-001-52876351-2000 – 3 шт.

7.5.2.7 Пипетки второго класса точности по ГОСТ 29228-91 вместимостью 1 $см^3$ - 3 шт., на 10 $см^3$ – 1шт. – 3 шт.

7.5.2.8 Планшеты иммуноферментные с крышками на 96 лунок, плоскодонные по ТУ 9398-058-00480230-2009 – 2 шт.

7.5.2.10 Вода водопроводная дехлорированная (отстоянная в течение 5 сут).

Примечание – Допускается применение других типов средств измерений, вспомогательных устройств, в том числе импортных, с аналогичными и лучшими метрологическими и техническими характеристиками.

7.5.3 Подготовка к биотестированию

Для биотестирования используют культуру коловраток в начале стационарной фазы роста. Получают такую культуру за 5-7 сут до проведения биотестирования. Для этого 20-30 особей коловраток с помощью пипетки Пастера отсаживают в стаканы вместимостью 100 $см^3$, наполненные 60 $см^3$ дехлорированной водопроводной воды. Затем в стакан пипеткой вместимостью 10 $см^3$ вносят 10 $см^3$ суспензии микроводорослей родов *Chlorella, Scenedesmus.* Стакан с коловратками и водорослями помещают в оптимальные условия при температуре (22±4) ^{o}С, без принудительного освещения и продолжают культивирование в течение 5-7 сут. Развитие коловраток в замкнутом объеме происходит по общим для микроорганизмов закономерностям и проходит такие же стадии роста: лаг-фазу, фазу логарифмического роста, стационарную фазу и фазу отмирания. Фазу роста популяции коловраток определяют при ежедневном подсчете их количества в единице объема. Отсутствие прироста количества коловраток в популяции свидетельствует о наступлении стационарной фазы роста.

Перед выполнением биотестирования проводят проверку пригодности культуры коловраток для использования в биотесте по их чувствительности к эталонному токсиканту в соответствии с Г.2.5 (приложение Г).

Воду, предназначенную для тестирования, фильтруют через бумажный фильтр «белая лента» для удаления взвеси.

Водную вытяжку из донных отложений готовят согласно Р 52.24.662.

7.5.4 Выполнение биотестирования

7.5.4.1 Общий объем воды и водной вытяжки донных отложений для биотестирования одной пробы составляет 20 $см^3$.

Биотестирование проводят методом индивидуальных линий при комнатной температуре в нестерильных условиях в защищённом от прямого солнечного света месте. Для этого используют иммуноферментные планшеты. В каждой серии биотестирования (опытной и контрольной) используют по 40 особей коловраток (4 повторности из 10 лунок).

7.5.4.2 Для проведения биотестирования в каждую из 40 лунок иммуноферментного планшета с помощью пипетки Пастера под микроскопом отсаживают по одной особи коловраток.

7.5.4.3 Попавшую с коловратками воду удаляют с помощью фильтровальной бумаги «белая лента» и приливают по 0,5 $см^3$ тестируемой воды или водной вытяжки донных отложений.

7.5.4.4 Одновременно ставят две контрольные серии. Для этого в каждую из 80 лунок второго иммуноферментного планшета с помощью пипетки Пастера под микроскопом отсаживают по одной особи коловраток. В 40 лунок пипеткой вместимостью 1$см^3$ добавляют по 0,5 $см^3$ дехлорированной (отстоянной в течение пяти сут) водопроводной воды, в остальные 40 – по 0,5 $см^3$ воды, отобранной из фонового («условно чистого») створа.

7.5.4.5 Через 24 ч от начала биотестирования коловраток кормят суспензией протококковых водорослей родов *Chlorella, Scenedesmus*, добавляя по 0,05 $см^3$ суспензии плотностью не ниже 250 тыс.клеток/$см^3$.

7.5.5 Регистрация показателей гибели и плодовитости коловраток

Регистрацию показателей гибели и плодовитости проводят путём учета количества и состояния коловраток в каждой лунке.

Учет погибших особей и родившейся молоди коловраток проводят в каждой лунке с помощью микроскопа при увеличении 2×14 в течение 4 сут. Наблюдения за гибелью в первые сутки проводят через 1, 3, 5, 24 ч, а затем строго через 48 и 96 ч. Погибшими считают коловраток, сохранивших неподвижность после барботирования среды пузырьками воздуха пипеткой Пастера.

Наблюдения за размножением коловраток для расчета плодовитости проводят через 24, 48 и 96 ч. При наблюдении за размножением учитывают общее количество родившейся жизнеспособной молоди за экспозицию и количество молоди в расчете на одну самку. Патология размножения проявляется в виде абортирования яиц, уродливой, мертворожденной и нежизнеспособной молоди.

Родившуюся молодь и погибших особей из лунок удаляют.

7.5.6 Обработка результатов и оценка токсичности

7.5.6.1 Результаты биотестирования оценивают по показателям гибели и плодовитости за 24, 48 и 96 ч.

При обработке результатов биотестирования вначале сравнивают показатели гибели в контрольных сериях на дехлорированной водопроводной воде и на воде из фонового створа при условии, что гибель в дехлорированной водопроводной воде не превышает 10 %. Если в воде фонового створа увеличение показателя гибели по сравнению с дехлорированной водопроводной водой не превышает 25 % (вода фонового стовора не токсична), то результаты в опытной серии сравнивают с контрольной на воде из фонового створа. Если в воде фонового створа увеличение показателя гибели коловраток по сравнению с контрольной серией на дехлорированной водопроводной воде составляет 25 % и более, то воду фонового створа оценивают как токсичную и результаты опытной серии сравнивают с контрольной серией на дехлорированной водопроводной воде.

7.5.6.2 Относительное количество особей погибших коловраток в опытной или контрольной сериях $\overline{N}_{г.к}$,%, рассчитывают по формуле

$$N_{г.к} = \frac{\overline{N}_{к_t}}{\overline{N}_{к_{исх}}} \cdot 100, \qquad (11)$$

где $\overline{N}_{к_t}$ – среднее арифметическое значение количества особей погибших коловраток в опытной или контрольной сериях при экспозиции *t*, экз.;

$\overline{N}_{к_{исх}}$ – среднее арифметическое значение исходного количества особей коловраток в опытной или контрольной сериях, экз.

7.5.6.3 Изменение показателя гибели коловраток $A_{гк}$, %, в опытной серии по сравнению с контрольной, выбранной согласно 7.5.6.1, рассчитывают по формуле

$$A_{гк} = N_{г.к_1} - N_{г.к_2} \qquad (12)$$

где $N_{г.к_1}$ – относительное количество особей погибших коловраток в опытной серии, экз.;

$N_{г.к_2}$ – относительное количество особей погибших коловраток в контрольной серии, экз.

Увеличение показателя гибели коловраток в опытной серии по сравнению с контрольной на 25 % и более свидетельствует о наличии токсического действия тестируемой воды.

7.5.6.4 Если показатель гибели коловраток в опытной серии менее 25 %, то оценку токсичности тестируемой пробы проводят далее с использованием показателя плодовитости.

Среднее значение показателя плодовитости коловраток (количество молоди, полученное от одной самки) $\overline{G}_к$ рассчитывают по формуле

$$\overline{G}_к = \frac{\sum \overline{N}_{к_t} - \sum \overline{N}_{к_{исх}}}{\sum \overline{N}_{к_{исх}}}, \quad (13)$$

где $\overline{N}_{к_t}$ – среднее арифметическое значение количества особей коловраток на момент времени t, экз.;

$\overline{N}_{к_{исх}}$ – среднее арифметическое значение исходного количества особей коловраток, экз.

Отклонение среднего значения показателя плодовитости коловраток в опытной серии от контрольной $A_{G_к}$,%.

$$A_{G_к} = \frac{\overline{G}_{к_1} - \overline{G}_{к_2}}{\overline{G}_{к_2}} \cdot 100, \quad (14)$$

где $\overline{G}_{к_1}$ и $\overline{G}_{к_2}$ – среднее значение показателя плодовитости коловраток в опытной и контрольной сериях соответственно, экз.

Отклонения значений показателя плодовитости в опытной серии от контрольной могут быть отрицательными и положительными. Положительные отклонения свидетельствуют об увеличении плодовитости по сравнению с выбранной контрольной серией. Это может быть обусловлено наличием достаточного количества бактерий и органических веществ в тестируемой воде. В этом случае действие воды оценивают как стимулирующее.

Токсическое действие (ОТД, пОТД, ХТД) определяют по показателям гибели и плодовитости коловраток в зависимости от времени выявления, т.е. от экспозиции, в соответствии с таблицей 4. В случае увели-

чения показателя плодовитости в сравнении с контролем отмечают стимулирующее действие тестируемой воды.

Таблица 4 – Оценка токсического действия воды или водных вытяжек донных отложений по данным биотестирования на коловратках

Экспозиция, ч	Увеличение значений показателя гибели коловраток относительно контрольной серии, %	Снижение значений показателя плодовитости коловраток относительно контрольной серии, %	Оценка токсического действия воды или водных вытяжек
От 1 до 24	До 30 включ.	До 50 включ.	Отсутствует ОТД
		Св. 50	ОТД
	Св. 30	Не рассчитывают	
48	До 30 включ.	До 50 включ.	Отсутствует пОТД
		Св. 50	пОТД
	Св. 30	Не рассчитывают	
96	До 30 включ.	До 50 включ.	Отсутствует ХТД
		Св. 50	ХТД
	Св. 30	Не рассчитывают	

Результаты биотестирования записывают по форме таблицы Д.7 (приложение Д).

7.6 Экспресс-метод биотестирования воды и водной вытяжки донных отложений по пищевой активности коловраток

7.6.1 Принцип метода

Экспресс-метод основан на установлении острого токсического действия (ОТД) тестируемой воды или водных вытяжек донных отложений по влиянию на функцию питания протококковыми водорослями лабораторной культуры коловраток *Brachionus calyciflorus Pallas (кл. Rotatoria / Rotifera).*

Показателем ОТД служит снижение скорости осветления среды (СОС) коловратками в опытной серии по сравнению с контрольной.

Критерием ОТД является снижение СОС на 50 % и более в опытной серии по сравнению с контрольной за 30 мин экспозиции.

7.6.2 Необходимые материалы, оборудование, реактивы

7.6.2.1 Культура коловраток *Brachionus calyciflorus Pallas*. Основные характеристики коловраток, источники их получения, условия культивирования и содержания в лаборатории изложены в Р 52.24.662.

7.6.2.2 Одноклеточные протококковые водоросли (далее − микроводоросли) родов *Chlorella* и *Scenedesmus* для кормления коловраток.

Культуру микроводорослей готовят на питательной среде в соответствии с приложением В.

7.6.2.3 Микроскоп инструментальный ИМ 100х50, А по ГОСТ 8074-82 или МБС-10 или другой с аналогичными характеристиками.

7.6.2.4 Центрифуга лабораторная роторная любого типа.

7.6.2.5 Камера для счета форменных элементов крови и клеточных элементов спинно-мозговой жидкости (Горяева) по ТУ 64-1-816-84 – 1 шт.

7.6.2.6 Пробирки Уленгута ПУ1-8х40 вместимостью 2 $см^3$ по ТУ 9461-008-52876351-2008 – 6 шт.

7.6.2.7 Фильтры бумажные обеззоленные «белая лента» по ТУ 6-09-1678-86.

7.6.2.8 Стаканы типа В, исполнения 1 по ГОСТ 25336-82 вместимостью 100 $см^3$ – 4 шт.

7.6.2.10 Пипетки Пастера по ТУ 9464-001-52876351-2000 – 2 шт.

7.6.2.12 Пипетки второго класса точности на 1 $см^3$ ГОСТ 29228-91 – 2 шт.

7.6.2.13 Вода водопроводная дехлорированная (отстоянная в течение 5 сут).

Примечание – Допускается применение других типов средств измерений, вспомогательных устройств, в том числе импортных, с аналогичными и лучшими метрологическими и техническими характеристиками.

7.6.3 Подготовка к биотестированию

Для биотестирования используют культуру коловраток в начале стационарной фазы роста (см. 7.5.3).

Перед выполнением биотестирования проводят проверку пригодности культуры коловраток для использования в биотесте по чувствительности к эталонному токсиканту в соответствии с Г.2.5 (приложение Г).

Воду, предназначенную для тестирования, фильтруют через бумажный фильтр «белая лента» для удаления взвеси.

Водную вытяжку из донных отложений готовят согласно Р 52.24.662.

7.6.4 Выполнение биотестирования

7.6.4.1 Общий объём воды и водной вытяжки донных отложений для биотестирования одной пробы составляет 50 $см^3$.

7.6.4.2 Под микроскопом с помощью пипетки Пастера отсаживают по 10 коловраток в каждую пробирку Уленгута вместимостью 2 $см^3$. Избыток попавшей с коловратками воды убирают с помощью фильтровальной бумаги «белая лента».

7.6.4.3 В пробирки Уленгута опытной серии добавляют по 1,0 $см^3$ тестируемой воды или водной вытяжки донных отложений, в контрольную серию - 1,0 $см^3$ дехлорированной водопроводной воды.

Каждую серию ставят в трех повторностях.

7.6.4.4 В каждую пробирку Уленгута опытной и контрольной серий вносят пипеткой 0,1 см^3 суспензии водорослей. Концентрация вносимых водорослей должна быть не ниже 2 млн. клеток/см^3. Если плотность водорослей низка, то их концентрируют с помощью лабораторной роторной центрифуги.

7.6.4.5 Для корректности подсчета исходной численности водорослей их вносят в каждую пробирку Уленгута с интервалом времени от 10 до 15 мин. Этот интервал времени необходимо соблюдать и при подсчете микроводорослей в конце биотестирования.

7.6.5 Регистрация численности клеток водорослей

Регистрацию численности водорослей проводят дважды (в начале и в конце биотеста) в каждой пробирке Уленгута вместимостью 2 см^3 опытной и контрольной серий. При первом подсчёте учитывают исходное количество клеток водорослей непосредственно после внесения в пробирки Уленгута с коловратками. Второй подсчет проводят в конце эксперимента – по истечении 30 мин.

В каждой пробирке Уленгута подсчёт водорослей ведут в камере Горяева, просчитывая трижды по 10 больших квадратов (увеличение 20×10), расположенных по диагонали камеры. Для расчетов СОС используют среднее значение количества клеток водорослей.

7.6.6 Обработка результатов и оценка токсичности

Токсичность тестируемой воды или водной вытяжки донных отложений оценивают по изменению величины отклонения СОС опытной серии от контрольной.

Среднее (из повторностей) значение показателя СОС, мм^3/(экз.·мин) рассчитывают в контрольной и опытной сериях по формуле

$$\text{СОС} = \frac{\overline{C}_{\text{исх}} - \overline{C}_t}{\overline{C}_0 \cdot \overline{N}_{\text{к}} \cdot t} \cdot V, \qquad (15)$$

где СОС − среднее значение показателя скорости осветления среды в опытной или контрольной сериях;

$\overline{C}_{\text{исх}}$ и $\overline{C}_t$ − среднее количество клеток микроводорослей в одном большом квадрате камеры Горяева в начале и в конце биотестирования соответственно;

$\overline{N}_{\text{к}}$ − среднее количество коловраток в чашке Петри, экз.;

t − экспозиция, мин;

V − объем воды в пробирке Уленгута, см^3.

Поскольку при биотестировании объем среды, в котором находятся коловратки (1,1 см^3), количество коловраток (10 экз.) и время биотести-

рования (30 мин) одинаковы во всех сериях, то для сравнения с контрольной серией можно использовать упрощенную формулу

$$\text{СОС} = \frac{\overline{C}_{\text{исх}} - \overline{C}_t}{\overline{C}_{\text{исх}}} \qquad (16)$$

Отклонение показателя СОС $A_{\text{СОС}}$, % в опытной серии от контрольной определяют по формуле

$$A_{\text{СОС}} = \frac{\text{СОС}_1 - \text{СОС}_2}{\text{СОС}_2} \cdot 100, \qquad (17)$$

где СОС_1 и СОС_2 − показатели СОС в опытной и контрольной сериях соответственно, мм^3/(экз.·мин).

Отклонения могут быть положительными (увеличение) и отрицательными (снижение). Если снижение СОС составляет 50 % и более, то это указывает на ОТД тестируемой воды или водной вытяжки донных отложений, если наблюдается увеличение СОС на 50 % и более - на стимулирующее действие.

Результаты биотестирования записывают по форме таблицы Д 8 (приложение Д).

7.7 Метод биотестирования воды с использованием покоящихся яиц коловраток

7.7.1 Принцип метода

Метод основан на установлении острого или хронического токсического действия тестируемой воды по влиянию на выклев коловраток *Brachionus calyciflorus Pallas* (кл. *Rotatoria/Rotifera*) из покоящихся яиц.

Показателем токсичности служит снижение выклева коловраток: числа молоди, вышедшей из покоящихся яиц, при экспозиции в тестируемой воде по сравнению с контрольной.

Критерием токсичности служит снижение выклева коловраток из покоящихся яиц на 50 % и более. ОТД определяют при экспозиции 24 ч, ХТД – 72 ч.

7.7.2 Необходимые материалы, оборудование, реактивы

7.7.2.1 Покоящиеся яйца коловраток *Brachionus calyciflorus Pallas*. Основные характеристики коловраток, источники их получения, условия культивирования и содержания в лаборатории, получения покоящихся яиц изложены в Р 52.24. 662.

7.7.2.2 Микроскоп инструментальный ИМ 100х50, А по ГОСТ 8074-82 или МБС-10 или другой с аналогичными характеристиками.

7.7.2.3 Чашки биологические ЧБН (Петри) диаметром 40 мм по ГОСТ 25336-82 – 9 шт.

7.7.2.4 Весы неавтоматического действия среднего (III) класса точности по ГОСТ Р 53228-2008, максимальная нагрузка не более 500 г, дискретность отсчета 0,001 г.

7.7.2.5 Лампы люминесцентные по ГОСТ 6825-91.

7.7.2.6 Вода водопроводная дехлорированная (отстоянная в течение 5 сут).

7.7.3 Подготовка к биотестированию

Для биотестирования используют покоящиеся яйца коловратки *Brachionus calyciflorus Pallas*. Рекомендуется использовать покоящиеся яйца, полученные искусственным путем, поскольку точно известны условия их получения (Р 52.24.662). Допускается использовать покоящиеся яйца, собранные в естественных водоемах (прудах, на мелководьях рек), которые идентифицируют согласно (Р 52.24.662).

Проводят проверку пригодности покоящихся яиц и отбор их для эксперимента. Для этого вначале под микроскопом проверяют целостность покрова покоящихся яиц и отбирают покоящиеся яйца с неповрежденной оболочкой.

В чашки Петри диаметром 40 мм приливают 30 $см^3$ дехлорированной водопроводной воды, помещают по 50-100 штук отобранных яиц и ставят их под люминесцентные лампы. Через 1 сут подсчитывают количество выклюнувшейся из яиц молоди. Если выклев коловраток превышает 50 %, то покоящиеся яйца считают пригодными для биотестирования.

7.7.4 Выполнение биотестирования

7.7.4.1 Для биотестирования берут либо навеску покоящихся яиц (0,1- 0,2 мг), прошедших проверку пригодности, либо подсчитанное под микроскопом их количество.

7.7.4.2 При любом из вариантов для биотестирования отсчитывают под микроскопом по 50-100 шт. яиц коловраток и помещают в чашки Петри диаметром 40 мм.

7.7.4.3 В опытную серию добавляют по 2 $см^3$ тестируемой воды, в контрольные серии – по 2 $см^3$ дехлорированной водопроводной воды и воды из фонового «условно чистого» створа.

7.7.4.4 Каждую серию ставят в трех повторностях.

7.7.4.5 Все взятые в эксперимент чашки Петри помещают под люминесцентные лампы.

7.7.5 Регистрация показателя выклева коловраток

Учет выклюнувшейся из покоящихся яиц молоди коловраток проводят строго через 24, 48 и 72 ч под микроскопом при увеличении 2×14. Выклюнувшаяся молодь подвижна, легко регистрируется.

Молодь подсчитывают и отсаживают.

7.7.6 Обработка результатов и оценка токсичности

Оценку токсичности проводят по показателю выклева молоди коловраток в опытной серии по сравнению с контрольной.

По результатам биотестирования вначале сравнивают показатели выклева молоди из покоящихся яиц в контрольных сериях $К_1$ и $К_2$. Если в $К_2$ отклонение выклева коловраток по сравнению с $К_1$ не превышает 25 % (вода контрольной серии $К_2$ не токсична), то результаты в опытной серии сравнивают с контролем на воде из фонового створа. Если в $К_2$ снижение выклева коловраток по сравнению с контрольной серией $К_1$ составляет 25 % и более, то воду фонового створа оценивают как токсичную и результаты опытной серии сравнивают с контрольной серией на водопроводной воде.

Отклонение показателя выклева молоди коловраток выклева $A_{в.к}$, %, в опытной серии по сравнению с контрольной проводят по формуле

$$A_{в.к} = \frac{\overline{N}_{в.к_2} - \overline{N}_{в.к_1}}{\overline{N}_{в.к_2}} \cdot 100, \qquad (18)$$

где $\overline{N}_{в.к_1}$ и $\overline{N}_{в.к_2}$ – средние значения (из повторностей) количества выклюнувшейся молоди в опытной и контрольной сериях соответственно, экз.

Если снижение показателя выклева молоди из покоящихся яиц в опытной серии от контрольной составляет 50 % и более, то воду оценивают как токсичную. При этом если снижение выклева молоди на 50 % и более отмечено через 1 сут экспозиции, то тестируемую воду оценивают как проявляющую ОТД. При снижении выклева молоди на 50 % и более, отмеченного при экспозиции 48 или 72 ч, тестируемую воду оценивают как проявляющую ХТД.

Результаты биотестирования записывают по форме таблицы Д.9 (приложение Д).

7.8 Метод биотестирования нативных донных отложений на личинках хирономид

7.8.1 Принцип метода

Метод основан на установлении ОТД или ХТД тестируемых донных отложений по влиянию на личинок хирономид видов *Chironomus plumosus, Ch.dorsalis, Ch.riparius, Ch. semireductus (класс Insecta, отр. Diptera, сем. Chironomidae)* или других видов в кратковременных или длительных экспериментах.

Влияние на личинок хирономид устанавливают по различию показателей токсичности в опытной и контрольной сериях.

Показателями токсичности служат:

- гибель личинок хирономид, повреждения, угрожающие жизни, изменение метаморфоза (числа и сроков вылета взрослых комаров).

Дополнительно могут быть использованы другие показатели: развитие морфологических повреждений, изменение линейных размеров тела, замедление превращения личинок хирономид в куколки, изменение поведенческих реакций.

Критерием токсичности служат отклонения в показателях токсичности на 25 % и более между результатами в опытной серии (пробе донных отложений, отобранной на исследуемом участке) и контрольной серии (пробе, отобранной на фоновом створе водного объекта).

ОТД устанавливают при экспозиции 96 ч. При более длительной экспозиции, до 30 сут, устанавливают ХТД.

Биотестирование опытной и контрольной серий должно быть проведено: 1) на личинках хирономид одного и того же вида и 2) на донных отложениях одного и того же типа.

7.8.2 Необходимые материалы, оборудование, реактивы

7.8.2.1 Популяция личинок хирономид видов *Chironomus plumosus, Ch.dorsalis, Ch.riparius, Ch. semireductus.* Основные характеристики личинок хирономид, источники их получения, условия культивирования и содержания в лаборатории изложены в РД 52.24.635.

7.8.2.2. Микроскоп инструментальный ИМ 100х50, А по ГОСТ 8074-82 или МБС-10 или другой с аналогичными характеристиками.

7.8.2.3 Холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 ^{0}С до 6 ^{0}С

7.8.2.4 Термометр лабораторный по ТУ 25-2021.003-88

7.8.2.5 Весы неавтоматического действия среднего (III) класса точности по ГОСТ Р 53228-2008, максимальная нагрузка не более 500 г, дискретность отсчета 0,001 г.

7.8.2.6 Фильтры бумажные обеззоленные «белая лента» по ТУ 6-09-1678-86.

7.8.2.7 Чашки биологические ЧБН (Петри) диаметром 100 мм по ГОСТ 25336-82 – 9 шт.

7.8.2.8 Пинцеты по ГОСТ 21241-89 – 2 шт.

7.8.2.9 Стаканы типа В, исполнения 1, ТХС по ГОСТ 25336-82 вместимостью: 50 $см^3$ – 2 шт., 1000 $см^3$ – 1 шт.

7.8.2.10 Колбы конические плоскодонные по ГОСТ 25336-82 вместимостью 250 $см^3$ – 3 шт., 500 $см^3$ – 3 шт.

7.8.2.11 Стеклянная палочка диаметром 4 мм и длиной 1500 мм по ГОСТ 27460-87 – 1 шт.

7.8.2.12 Дрожжи хлебопекарные прессованные по ГОСТ Р 54731-2011.

7.8.3 Подготовка к биотестированию

Биотестирование проводят на нативной (необработанной) пробе донных отложений, подготовленной в соответствии с РД 52.24.609.

Популяцию личинок хирономид видов *Chironomus plumosus, Ch.dorsalis, Ch.riparius, Ch. semireductus* хранят в холодильнике при температуре от 4 ^{0}С до 15 ^{0}С. Перед биотестированием проверяют на пригодность личинок хирономид по их состоянию в соответствии с РД 52.24.635.

Непосредственно перед биотестированием пинцетом отбирают из имеющейся популяции наиболее активных особей размером от 3 до 5 мм, помещают их в чашку Петри с влажной фильтровальной бумагой и оставляют при комнатной температуре.

Подготавливают две серии эксперимента: опытную - на пробе донных отложений, отобранной на исследуемом участке и контрольную - на пробе, отобранной на фоновом створе водного объекта. В обеих сериях необходимо использовать донные отложения одного и того же типа.

Пробы донных отложений подготавливают следующим образом. Взвешивают в чашках Петри по 100 г донных отложений для опытной и контрольных серий (по 2 повторности для каждой серии), добавляют воду из фонового створа и оставляют при комнатной температуре на 2 ч для отстаивания. Необходимая высота слоя донных отложений в чашке Петри должна составлять от 1 до 2 см, а слоя воды после отстаивания от 1 до 3 мм (для обеспечения оптимальных условий жизнедеятельности личинок хирономид).

7.8.4 Выполнение биотестирования

В каждую чашку Петри с донными отложениями помещают по 10 особей популяции личинок хирономид видов *Chironomus plumosus, Ch.dorsalis, Ch.riparius, Ch. semireductus*, закрывают чашки и сразу же начинают наблюдения за выживаемостью, развитием повреждений и поведением. Следят за тем, чтобы уровень воды над осадком составлял

не менее 3 мм, доливая ее из соответствующих проб воды, которые в течение эксперимента хранят в холодильнике. Погибших личинок хирономид подсчитывают и удаляют пинцетом, в том числе и из грунта.

В течение 96 ч (кратковременный эксперимент) личинок хирономид не кормят.

7.8.5 Регистрация нарушений жизнедеятельности и гибели личинок хирономид

Проявлением ОТД донных отложений (кратковременные эксперименты до 96 ч) у личинок хирономид является первоначальное усиление двигательной активности, которое сменяется ее снижением и последующим параличом.

Гибель личинок хирономид устанавливают по следующим признакам. Погибшими считают личинок хирономид, потерявших подвижность и не реагирующих на прикосновение стеклянной палочкой. Погибшие особи или неестественно вытянуты, или свернуты в клубок, иногда зигзагообразно изогнуты. Факт гибели можно уточнить под микроскопом: цвет покровов бледнеет или меняется с ярко-красного на различные оттенки зеленого, коричневого, темно-красного.

Построенные в токсических условиях домики не прочные, личинки хирономид часто покидают их и погибают.

В кратковременных экспериментах данные наблюдений вначале регистрируют через 30 мин экспозиции, а затем через 1, 2, 4, 6, 24, 48, 72, 96 ч. Отклонения в поведении личинок хирономид в опытной серии по сравнению с контрольной записывают в произвольной форме.

В длительных экспериментах (экспозиция от 4 до 30 сут) также наблюдается гибель личинок хирономид на разных стадиях метаморфоза, замедление роста, ускорение или замедление сроков окукливания и вылета взрослой особи, «кровоизлияний» в крыло, появление уродливых взрослых особей (нарушения в брюшных сегментах, конечностях, антеннах).

7.8.6 Обработка результатов и оценка токсического действия воды и донных отложений

Оценка токсического действия – экспертная, поэтому специалист должен учитывать особенности жизнедеятельности личинок хирономид, которые изложены в РД 52.24.635 и в [4]. При действии токсичных химических веществ у личинок хирономид выявляются различные симптомы отравления, от нарушения поведенческих реакций до гибели. Перед гибелью личинки хирономид всплывают на поверхность; в благоприятных условиях среды они обычно зарываются в донные отложения.

Следует учитывать, что в неблагоприятных условиях рост личинок хирономид замедляется, тогда как в благоприятных они быстро увеличивают биомассу. На темпы роста существенно влияет температура окружающей среды. При высоких температурах темп роста увеличивается. Например, в естественных условиях личинка *Ch. dorsalis* при температурах 15 ^{0}C; 20 ^{0}C; 25 ^{0}C; 30 ^{0}C достигает массы тела 12 мг за разное время: соответственно за 17; 15; 13; 9 сут [4].

Если в опытной серии выявляют ОТД, эксперимент прекращают. Если в пробах ОТД не выявляют, эксперимент продолжают до 30 сут для выявления возможного ХТД.

Данные и результаты биотестирования записывают по форме таблицы Д.10 (приложение Д).

8 Дополнительные методы биотестирования воды и донных отложений водотоков и водоемов

8.1 Метод биотестирования воды на цериодафниях

Влияние тестируемой воды оценивают по изменению выживаемости и плодовитости цериодафний *Ceriodaphnia affinis Lilljeborg* при экспозиции в тестируемой воде по сравнению с контролем. ОТД, пОТД и ХТД тестируемой воды на цериодафний устанавливают по аналогии с методикой на дафниях, но при более короткой экспозиции: в остром опыте, длительностью до 48 ч, и хроническом, примерно до 7 сут. Условия разведения, содержания цериодафний и проведения эксперимента описаны в руководстве [6].

8.2 Метод биотестирования воды на рыбах

Метод основан на оценке влияния тестируемой воды на выживаемость односуточной молоди аквариумных рыб гуппи *Poecilia reticulata Peters.* ОТД тестируемой воды устанавливают по снижению выживаемости рыб на 50 % и более при экспозиции в тестируемой воде в течение 96 ч по сравнению с контролем. Условия разведения, содержания рыб и проведения эксперимента описаны в [6].

8.3 Метод биотестирования воды и донных отложений на популяциях гидробионтов

Метод основан на установлении ОТД, пОТД или ХТД проб воды и донных отложений. Для биотестирования используют лабораторные культуры микроводорослей, зоопланктона (ракообразных, инфузорий, коловраток) и рыб.

Показателем токсичности служит коэффициент регенерации популяции, рассчитываемый по гибели (среднее число погибших особей) и

количеству молоди (среднее количество появившейся молоди) в ходе одного эксперимента.

Длительность эксперимента зависит от биологических особенностей вида тест-объекта. Предпочтительно использовать организмы с коротким жизненным циклом, способные давать новые поколения от 1 до 10 сут (Р 52.24.695).

8.4 Метод оценки токсического влияния фитоценозов планктона на формирование качества вод

Некоторые виды синезеленых водорослей, которые массово развиваются при «цветении» водохранилищ, в ходе жизнедеятельности образуют токсины, которые приводят к токсичности воды водоемов [7] - [10].

Для оценки токсического влияния природных фитоценозов на формирование качества вод проводят биотестирование проб воды цветущего водоема и проб биомассы водорослей на гидробионтах, охватывающих основные трофические уровни водной экосистемы (например, на водорослях, ракообразных и рыбах) и при оценке учитывают содержание загрязняющих веществ по данным сети наблюдений Росгидромета (Р 52.24.809).

9 Выбор методов биотестирования и оценка токсичности проб воды и донных отложений водотоков и водоемов

9.1 Наиболее достоверные результаты получают при использовании набора биотестов на тест-объектах – гидробионтах разного трофического уровня.

9.2 Различные тест-объекты обладают разной чувствительностью к загрязняющим веществам, в связи с чем использование набора биотестов позволяет выявлять токсическое действие более широкого перечня загрязняющих веществ в воде и донных отложениях водотоков и водоемов.

9.3 Обязательным элементом набора биотестов в системе биотестирования токсичности воды и донных отложений водотоков и водоемов должны быть наиболее апробированные биотесты: на водорослях, дафниях, инфузориях. Эти биотесты позволяют в большинстве случаев уловить присутствие в воде даже относительно небольших концентраций загрязняющих веществ, особенно если эти вещества отнесены к 1–2 классам опасности для водных объектов рыбохозяйственного значения.

9.5 Для режимного мониторинга рекомендуется использовать набор из трех биотестов основного перечня и при необходимости – 1–2 из дополнительного. Целесообразно также использовать не одну, а несколько тест-реакций, поскольку их чувствительность к загрязнению не одинакова.

Рекомендуемые наборы биотестов представлены в таблице 5.

Таблица 5 − Наборы биотестов для режимного мониторинга

Основные биотесты			Дополнительные биотесты
Вода			
1 На дафниях	На водорослях	На инфузориях	На рыбах или цериодафниях
2 На дафниях	На водорослях	На коловратках	На популяциях гидробионтов
Донные отложения			
Нативные	Водная вытяжка		
1 На личинках хирономид	На дафниях	На водорослях	На популяциях гидробионтов

9.6 Для оперативного мониторинга рекомендованы экспресс-методы: биотест по хемотаксису инфузорий и биотест по СОС коловратками.

Общая оценка токсичности пробы воды или донных отложений по результатам биотестирования по набору биотестов является экспертной. Заключение делают «по наихудшему результату» (принципу, принятому в водной токсикологии): при наличии в одном из использованных биотестов токсичности, независимо от результатов других биотестов, пробу считают токсичной.

10 Оценка токсического загрязнения водного объекта

Оценку токсического загрязнения проводят по данным съемок на створах наблюдений сети Росгидромета или на отдельных участках водного объекта, используя таблицу 6. По доле проб, в которых обнаружена токсичность, оценивают степень токсического загрязнения водного объекта или его участка.

По наличию токсичности в различных пробах донных отложений судят о расположении участков накопления токсичных загрязняющих веществ в водном объекте, а также о зонах влияния источников загрязнения.

Таблица 6 – Оценка токсического загрязнения водного объекта (участка) по результатам биотестирования проб воды

Токсическое действие	Доля проб, в которых обнаружена токсичность, %	Токсическое загрязнение воды водного объекта
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

11 Условия приемлемости результатов биотестирования

Условия приемлемости результатов биотестирования для всех методов биотестирования сводятся к соблюдению требований к отбору проб, хранению и транспортировке, а также требований к содержанию тест-объектов в культуре и к чувствительности по данным проверки пригодности тест-объектов, соблюдению процедур выполнения биотеста.

12 Требования к технике безопасности и квалификации исполнителей

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

Приложение А
(справочное)

Общая схема и этапы работ по определению токсичности воды и донных отложений методами биотестирования

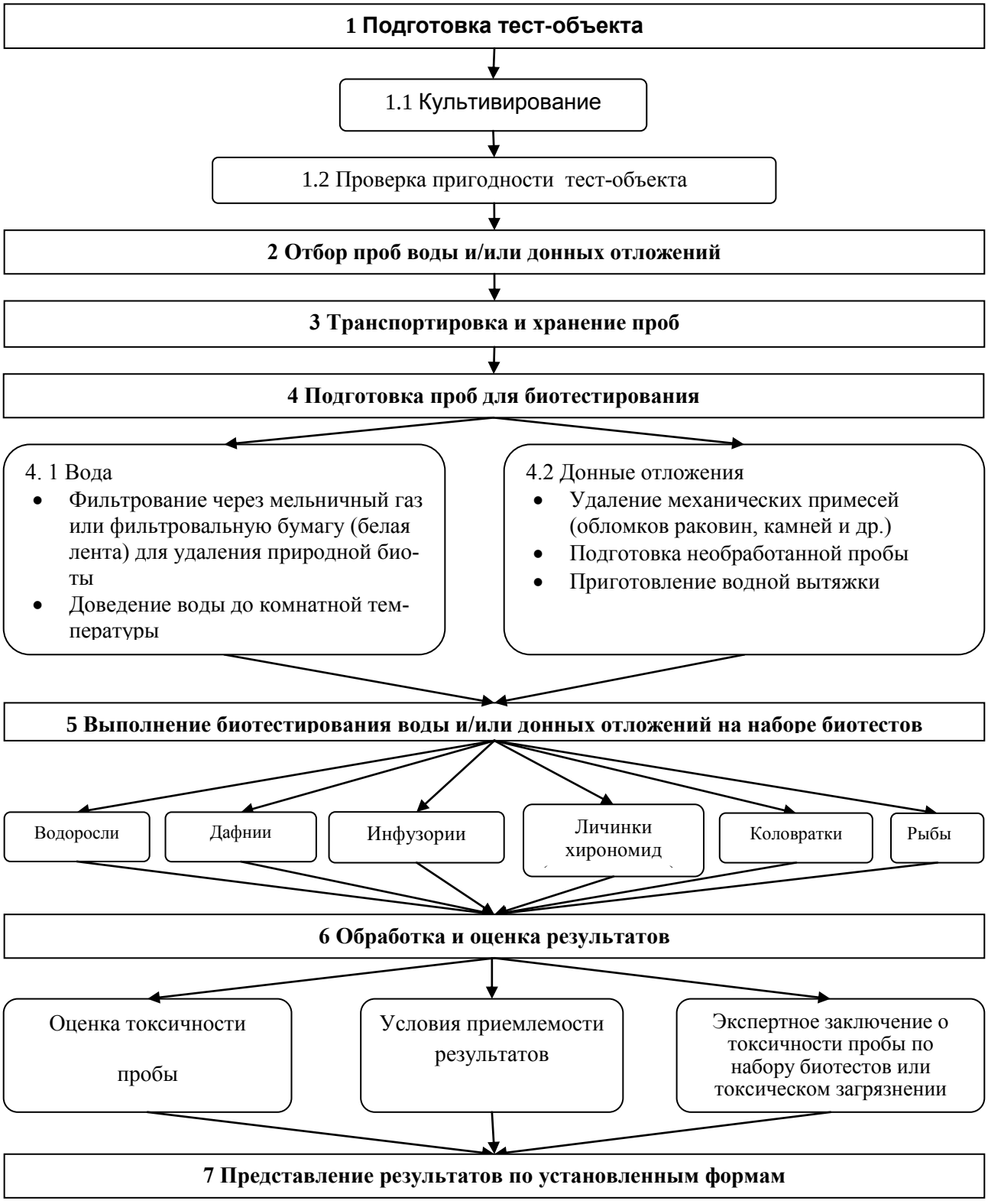

Рисунок А.1

Приложение Б
(рекомендуемое)

Форма записи характеристик проб воды и донных отложений

1 Номер пробы _____
2 Место отбора пробы воды и донных отложений на территории деятельности _____УГМС
_____
водный объект, пункт, створ, горизонт, вертикаль

3 Дата отбора, время суток_____
4 Температура воды, воздуха_____
5 Погодные условия_____
6 Визуальная характеристика воды:
- прозрачность _____;
- характер взвесей_____
минеральные частицы; частицы глины, песка; 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, температуру, pH, Eh, запах
-тип донных отложений_____
песчанистый ил, глинистый ил, илистый песок и т. д.

8 Срок хранения _____
9 Условия хранения _____

Приложение В
(справочное)

Приготовление питательной среды для культивирования водорослей и для биотестирования

В.1 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы

В.1.1 Колбы мерные 2-го класса точности исполнения 2, 2а по ГОСТ 1770-74 вместимостью: 100 $см^3$ – 1 шт., 1000 $см^3$ – 3 шт.

В.1.2 Пипетка с одной отметкой 2-го класса точности исполнения 2 по ГОСТ 29169-91 вместимостью 1 $см^3$ – 1 шт.

В.1.3 Аммоний ванадиево-кислый мета по ГОСТ 9336-75, ч.д.а.

В.1.4 Кислота борная по ГОСТ 18704-78.

В.1.5 Калий азотнокислый по ГОСТ 4217-77, х.ч.

В.1.6 Калий углекислый по ГОСТ 4221-76, ч.д.а.

В.1.7 Калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 4198-75, ч.д.а.

В.1.8 Кальций азотнокислый по ТУ 6-09-1013-76, ч.д.а.

В.1.9 Кислота борная ГОСТ 9656-75, х.ч.

В.1.10 Магний сернокислый 7-водный по ГОСТ 4523-77, ч.д.а.

В.1.11 Марганец хлористый 4-водный по ГОСТ 616-75.

В.1.12 Молибдена оксид по ТУ 6-09-4471-77, ч.д.а.

В.1.13 Цинк сернокислый 7-водный по ГОСТ 4174-77, ч.д.а.

В.1.14 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72.

В.2 Приготовление раствора микроэлементов

В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ приливают 10 $см^3$ дистиллированной воды, растворяют навески каждого реактива согласно таблице В.1 и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Полученный раствор хранят в холодильнике до помутнения.

В.3 Приготовление исходного раствора для культивирования водорослей

В мерную колбу вместимостью 1 $дм^3$ приливают 100 $см^3$ дистиллированной воды, растворяют навески каждого реактива согласно таблице В.2, затем добавляют 1 $см^3$ раствора микроэлементов и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Полученный раствор хранят в холодильнике до помутнения.

В.4 Приготовление исходного раствора для биотестирования

В мерную колбу вместимостью 1 $дм^3$ приливают 100 $см^3$ дистиллированной воды, растворяют навески каждого реактива согласно таблице В.3, затем добавляют 1 $см^3$ раствора микроэлементов и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Полученный раствор хранят в холодильнике до помутнения.

В.5 Приготовление раствора для культивирования водорослей

В мерную колбу вместимостью 1 дм^3 приливают 100 см^3 дистиллированной воды и 1 см^3 раствора микроэлементов и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Таблица В.1 - Состав раствора микроэлементов для питательной среды

Наименование реактива	Навеска реактива, г/100 см^3
Борная кислота (H_3BO_3)	0,286
Марганец хлористый 4-водный ($MnCl_2 \times 4H_2O$)	0,181
Цинк сернокислый обводненный ($ZnSO_4 \times 7H_2O$)	0,022
Молибдена оксид (MoO_3)	0,0017
Аммония метаванадат (NH_4VO_3)	0,0023

Таблица В.2 - Растворы реактивов питательной среды для культивирования водорослей

Наименование реактива	Навеска реактива, г/дм^3
Калий азотнокислый (KNO_3)	0,025
Магний сернокислый 7-водный ($MgSO_4 \times 7H_2O$)	
Калий фосфорнокислый однозамещенный (KH_2PO_4)	
Калий углекислый (K_2CO_3)	0,0345
Кальций азотнокислый $Ca(NO_3)_2$	0,100

Таблица В.3 - Растворы реактивов питательной среды для биотестирования

Наименование реактива	Навеска реактива, г/дм^3
Калий азотнокислый (KNO_3)	50,0
Магний сернокислый обводненный ($MgSO_4 \times 7H_2O$)	
Калий фосфорнокислый однозамещенный (KH_2PO_4)	
Калий углекислый (K_2CO_3)	69,0
Кальций азотнокислый $Ca(NO_3)_2$	200,0

Приложение Г
(рекомендуемое)

Проверка пригодности тест-объектов для биотестирования

Г.1 Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы

Г.1.1 Колбы мерные 2-го класса точности исполнения 2, 2а по ГОСТ 1770-74 вместимостью: 100 $см^3$ – 12 шт., 250 $см^3$ – 6 шт; 500 $см^3$ – 6 шт.

Г.1.2 Пипетка с одной отметкой 2-го класса точности исполнения 2 по ГОСТ 29169-91 вместимостью 2 $см^3$, 5 $см^3$, 10 $см^3$, 20 $см^3$ – 4 шт.

Г.1.3 Колбы конические типа Кн исполнения 2 по ГОСТ 25336-82 вместимостью 250 $см^3$ – 12 шт., 500 $см^3$ – 6 шт.

Г.1.4 Весы неавтоматического действия среднего (III) класса точности по ГОСТ Р 53228-2008, максимальная нагрузка не более 500 г, дискретность отсчета 0,001 г.

Г.1.5 Калий двухромово-кислый ($К_2Cr_2O_7$) по ГОСТ 4220-75.

Г.1.6 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72.

Г.1.7 Вода водопроводная дехлорированная.

Г.2 Проверка пригодности тест-объектов для биотестирования

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

В случае, когда показателем токсичности служит выживаемость (гибель) тест-объектов, определяют $ЛК_{50}$ за 24 ч экспозиции, т.е. концентрацию эталонного токсиканта, при которой погибает 50 % особей тест-объекта.

Для водорослей, у которых показателем токсичности служит скорость роста (увеличение численности клеток), определяют эффективную концентрацию эталонного токсиканта, вызывающую снижение численности водорослей на 50 % ($ЭК_{50}$) по сравнению с контролем за 48 ч экспозиции.

Как показывает практика токсикологических исследований, показатели $ЛК_{50}$ и $ЭК_{50}$ взятой в эксперимент выборки культуры тест-объекта могут быть установлены при нескольких концентрациях эталонного токсиканта, находящихся в определенном, характерном для каждого тест-объекта, узком диапазоне.

Г.2.2 В качестве эталонного токсиканта чаще всего используют калий двухромовокислый ($К_2Cr_2O_7$).

Для установления чувствительности тест-объекта готовят исходный раствор $К_2Cr_2O_7$ с концентрацией 10 г/$дм^3$. Для этого взвешивают 5 г $К_2Cr_2O_7$, переносят в мерную колбу вместимостью 500 $см^3$ и растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды. Затем доводят содержимое колбы до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Приготовленный исходный раствор $К_2Cr_2O_7$ перед использованием выдерживают в течение двух часов. Срок хранения исходного раствора калия двухромовокислого в темной склянке с притертой пробкой – не более 6 месяцев.

Далее готовят рабочий раствор $K_2Cr_2O_7$ с концентрацией 0,05 г/дм^3 (50 мг/дм^3). Для этого в мерную колбу вместимостью 500 см^3 приливают 2,5 см^3 исходного раствора $K_2Cr_2O_7$ 10 г/дм^3 пипеткой вместимостью 5 см^3, доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают. Рабочий раствор хранению не подлежит.

Г.2.3 Показатель $ЭК_{50}$ за 48 ч для зеленых водорослей должен находиться в диапазоне концентраций $K_2Cr_2O_7$ от 1,3 до 2,5 мг/дм^3. Для установления $ЭК_{50}$ готовят серию градуировочных растворов калия двухромовокислого с концентрациями 0,25; 0,50; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 мг/дм^3 следующим образом. В мерные колбы вместимостью 250 см^3 приливают соответственно по 1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10,5; 12,5 см^3 рабочего раствора $K_2Cr_2O_7$ с концентрацией 50 мг/дм^3, используя пипетки вместимостью 2, 5, 10 и 20 см^3. В каждую колбу приливают до метки дистиллированную воду и тщательно перемешивают полученные растворы.

В конические колбы вместимостью 250 см^3 приливают мерной колбой вместимостью 100 см^3 по 100 см^3 каждого градуировочного раствора, 0,1 см^3 питательной среды, суспензию водорослей в объеме, чтобы численность клеток в каждой из трех колб находилась в пределах от 25×10^3 до 50×10 клеток/см^3 и проводят биотестирование в соответствии с 7.1. Каждую концентрацию $K_2Cr_2O_7$ берут в двух повторностях. В качестве контроля используют соответствующую питательную среду. Через 48 ч определяют численность водорослей и устанавливают $ЭК_{50}$ графическим методом с использованием пробитного анализа в соответствии Р 52.24.662.

Если значение показателя $ЭК_{50}$ выходит за рамки установленного диапазона концентраций эталонного токсиканта, повторяют эксперимент с использованием другой культуры водорослей.

Г.2.4 Для установления пригодности к биотестированию дафний и цериодафний используют те же концентрации эталонного токсиканта, что и для водорослей, однако рабочий и градуировочные растворы $K_2Cr_2O_7$ готовят на дехлорированной водопроводной воде. В качестве контроля используют дехлорированную водопроводную воду. Биотестирование на этих растворах проводят (каждый в трех повторностях) в течение 24 ч и на основании полученных результатов рассчитывают $ЛК_{50}$ за 24 ч с помощью графического метода и пробитного анализа в соответствии с Р 52.24.662. Показатель $ЛК_{50}$ за 24 ч для дафний должен находиться в диапазоне концентраций $K_2Cr_2O_7$ от 0,9 до 2,0 мг/дм^3, для цериодафний – от 1,2 до 1,9 мг/дм^3.

Если значение показателя $ЛК_{50}$ выходит за рамки установленного диапазона концентраций эталонного токсиканта, повторяют эксперимент с использованием организмов из других культур.

Г.2.5 Для установления пригодности к биотестированию парамеций и коловраток готовят градуировочные растворы эталонного токсиканта $K_2Cr_2O_7$ в концентрациях 0,025; 0,050; 0,075; 0,100; 0,200; 0,250 мг/дм^3 следующим образом. Из исходного раствора $K_2Cr_2O_7$ с концентрацией 10 г/дм^3 готовят рабочий раствор с концентрацией 5 мг/ дм^3: в мерную колбу вместимостью 500 см^3 приливают 0,5 см^3 исходного раствора и доводят до метки дехлорированной водопроводной водой. Далее берут 6 мерных колб вместимостью 100 см^3, приливают в каждую колбу соответственно по 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0 и 5,0 см^3 рабочего раствора с концентрацией 5 мг/дм^3 и доводят до метки дехлорированной водой, получая гра-

дуировочные растворы в концентрациях 0,025; 0,050; 0,075; 0,100; 0,200; 0,250 мг/дм^3. Эти растворы используют для установления $ЛК_{50}$ при экспозиции 24 ч для культуры парамеций или коловраток при биотестировании в соответствии с методикой. В качестве контроля используют дехлорированную водопроводную воду. Расчет показателя $ЛК_{50}$ производят графическим методом с использованием пробитного анализа по Р 52.24. 662. Показатель $ЛК_{50}$ за 24 ч для парамеций и коловраток должен находиться в диапазоне концентраций $K_2Cr_2O_7$ от 0,075 до 0,250 мг/дм^3.

Если значение показателя $ЛК_{50}$ выходит за рамки установленного диапазона концентраций эталонного токсиканта, повторяют эксперимент с использованием организмов из других культур.

Приложение Д
(рекомендуемое)

Формы записи данных и результатов биотестирования проб воды

Таблица Д.1 – Данные и результат биотестирования проб воды на водорослях

Номер пробы	Водный объект, пункт, створ, дата отбора пробы	Дата биотестирования. Экспозиция, ч	Численность клеток водорослей, клеток/см^3, в сериях								Оценка токсического действия пробы воды	
			контрольной				опытной					
			Повторность			среднее значение	Повторность			среднее значение	Снижение численности клеток водорослей, %	Степень токсичности
			1	2	3		1	2	3			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Примечание – В графе 13 пишут: «Вода условно нетоксичная, слаботоксичная или очень токсичная».												

Таблица Д.2 – Данные и результаты биотестирования проб воды на дафниях для определения ОТД и пОТД

Номер пробы	Водный объект, пункт, створ, дата отбора пробы	Дата биотестирования. Экспозиция, ч	Количество выживших дафний, экз.						Снижение выживаемости, %	Оценка токсического действия пробы воды
			в контрольной серии			в опытной серии				
			1	2	3	1	2	3		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Примечание – в графе 11 пишут: "Оказывает (не оказывает) ОТД или пОТД".										

Таблица Д.3 – Данные и результаты биотестирования проб воды на дафниях для определения ХТД

Номер пробы	Водный объект, пункт, створ, дата отбора пробы	Дата биотестирования. Экспозиция, сут	Количество родившейся молоди в расчете на одну выжившую самку, экз.						Снижение плодовитости. Уровень статистической достоверности	Оценка токсического действия пробы воды
			в контрольной серии			в опытной серии				
			1	2	3	1	2	3		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Примечание – в графе 11 пишут: «Оказывает (не оказывает) ХТД»..										

Таблица Д.4 – Данные биотестирования проб воды на инфузориях

Номер пробы	Водный объект, пункт, створ	Дата отбора пробы, дата биотестирования	Повторность	Исходное количество, экз.	Живые особи, экз.									Погибшие особи, экз.								
					Экспозиция, ч									Экспозиция, ч								
					24			48			72			24			48			72		
					$К_1$	$К_2$	О	$К_1$	$К_2$	О	$К_1$	$К_2$	О	$К_1$	$К_2$	О	$К_1$	$К_2$	О	$К_1$	$К_2$	О
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
			1																			
			2																			
			3																			
			4																			
			1																			
			2																			
			3																			
			4																			

Примечания

1 $К_1$ – Контрольная серия на дехлорированной водопроводной воде.

2 $К_2$ – Контрольная серия на воде из фонового створа.

3 О – Опытная серия.

Таблица Д.5 – Результаты биотестирования проб воды или водных вытяжек донных отложений на инфузориях

Номер пробы	Водный объект, пункт, створ, дата отбора пробы	Серия	Дата проведения биотестирования	Экспозиция, ч	Показатель гибели, % от исходного числа	Снижение выживаемости, % контроля	Показатель плодовитости	Отклонение показателя плодовитости от контроля, %	Оценка токсического действия пробы воды или водной вытяжки
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Примечание – В графе 10 пишут: «Оказывает (не оказывает) ОТД, пОТД, ХТД».									

Таблица Д.6 – Результаты биотестирования проб воды по реакции хемотаксиса инфузорий

Номер пробы	Водный объект, пункт, створ, дата отбора пробы	Дата проведения биотестирования	Положительный хемотаксис, %	Оценка токсического действия пробы воды
1	2	3	4	5
Примечание – В графе 5 пишут: «Оказывает(не оказывает) ОТД».				

Таблица Д.7 – Результаты биотестирования проб воды или водной вытяжки донных отложений по показателям гибели и плодовитости коловраток

Номер пробы	Водный объект, пункт, створ, дата отбора пробы	Дата проведения биотеста	Отклонение показателя гибели от контроля,%	Отклонение показателя плодовитости от контроля, %	Оценка токсического действия пробы воды или водной вытяжки
1	2	3	4	5	6
Примечание - В графе 6 пишут: «Оказывает (не оказывает) ОТД, пОТД, ХТД».					

Таблица Д.8 – Результаты биотестирования проб воды или водной вытяжки донных отложений по показателю пищевой активности коловраток

Номер пробы	Водный объект, пункт, створ, дата отбора	Дата проведения биотестирования	Показатель СОС, $мм^3/(экз.·мин)$	Отклонение показателя СОС от контроля, %	Оценка токсического действия пробы воды или водной вытяжки
1	2	3	4	5	6
Примечание – В графе 6 пишут: «Оказывает (не оказывает) ОТД».					

Таблица Д.9 – Результаты биотестирования проб воды с использованием покоящихся яиц коловратки

Номер пробы	Водный объект, пункт, дата отбора пробы	Дата биотестирования	Выклев молоди, экз.	Отклонение показателя выклева молоди от контроля, %	Оценка токсического действия пробы
1	2	3	4	5	6
Примечание – В графе 6 пишут: «Оказывает (не оказывает) ОТД или ХТД».					

Таблица Д.10 – Результаты биотестирования нативной («необработанной») пробы донных отложений на личинках хирономид

Номер пробы	Водный объект, пункт, створ, дата отбора пробы	Дата биотестирования. Экспозиция, ч	Количество погибших личинок, экз.						Отклонение результатов опытной серии от контрольной, %	Оценка токсического действия пробы воды
			в контрольной серии			в опытной серии				
			1	2	3	1	2	3		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Примечание – В графе 11 пишут: «Оказывает (не оказывает) ОТД или ХТД» (ХТД устанавливают при отсутствии ОТД, по нарушениям, проявившимся до 30 сут экспозиции).										

Приложение Е
(справочное)

Алгоритм статистической обработки результатов биотестирования

Алгоритм расчета достоверности отклонений показателя токсичности от контроля.

Определение достоверности отклонений от контроля осуществляют методами вариационной статистики, используя формулы:

1) среднее арифметическое значение показателя

$$M = \frac{\sum V_i}{n-1} \qquad (Е.1)$$

где V_i − отдельные значения показателя;

n − количество повторностей.

2) среднее квадратическое отклонение

$$\sigma = \frac{\sqrt{\left(\sum (V_i - M)^2\right)}}{n-1}, \qquad (Е.2)$$

3) ошибку среднего арифметического

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}, \qquad (Е.3)$$

4) критерий достоверности разности

$$t_d = \frac{M_к - M_{оп}}{\sqrt{\left(m_к^2 + m_{оп}^2\right)}}, \qquad (Е.4)$$

где $M_к$ и $M_{оп}$ – сравниваемые средние величины в контроле и опыте;

$m_к^2$ и $m_{оп}^2$ – квадраты ошибок в контроле и опыте.

Полученные результаты сравнивают с табличным значением критерия Стьюдента (t_{st}) при степени свободы ($n_к$+$n_{оп-2}$) по таблице Е.1.

Если рассчитанное значение t_d больше или равно значению стандартного критерия Стьюдента ($t_d \geq t_{st}$), то отклонение результатов биотестирования от контроля достоверно. И тогда можно сделать вывод о том, что испытываемая вода оказывает токсическое действие.

Таблица Е.1 – Критические значения критериев Стьюдента t_{st} при уровне значимости 0,05

Степень свободы	t_{st}	Степень свободы	t_{st}
1	12,71	6	2,45
2	4,30	7	2,37
3	3,18	8	2,31
4	2,78	9	2,26
5	2,57	10	2,23

Библиография

[1] Водный кодекс Российской Федерации от 3 июня 2006 г. № 74-ФЗ (в редакции от 31.10.2016, с изменениями от 26 июля 2017).

[2] Зенин А.А., Белоусова Н.В. Гидрохимический словарь.- Л.: Гидрометеоиздат, 1988. – 239 с.

[3] Реймерс Н.Ф. Популярный биологический словарь. М.: Наука, 1991.– 540 с.

[4] Никаноров А.М., Хоружая Т.А. Экология. Для студентов вузов и специалистов - экологов. М.: Издательство «ПРИОР», 2001. – 304 с.

[5] Константинов А.С. Биология хирономид и их разведение // Тр. Саратовского отделения ВНИОРХ. 1958. Т.5. – 364 с.

[6] Руководство по определению методом биотестирования токсичности вод, донных отложений, загрязняющих веществ и буровых растворов. – М.: РЭФИА, НИА-Природа, 2002. – 118 с.

[7] Бакаева Е.Н., Никаноров А.М. Гидробионты в оценке качества вод суши. М.: Наука, 2006. – 236 с.

[8] Матишов Г.Г., Ковалева Г.В. «Цветение» воды в водоемах юга России и сбои в водоснабжении (на примере г. Волгодонска) // Вестник ЮНЦ РАН. 2010. Т 6, № 1. – С.71–79.

[9] Румянцев В.А, Крюков Л.Н., Поздняков Ш.Р. Жуковский А.В. Цианобактериальное «цветение» воды – источник проблем природопользования и стимул инноваций в России //Инженерный вестник Дона. Электронный научный журнал, 2012, № 4. – С. 221–227.

[10] Хоружая Т.А., Никаноров А.М. Эвтрофирование и токсичность синезеленых водорослей как проявление глобальных экологических проблем / Вода и водные ресурсы: Системообразующие функции в природе и экономике. Сб. науч. трудов /отв. ред. В.Г. Пряжинская. Новочеркасск: ЮРГТУ (НПИ), 2012. – С. 340–344.

Ключевые слова: водотоки, водоемы, вода и донные отложения, методы биотестирования, оценка токсичности и токсического загрязнения

Лист регистрации изменений

Номер изменения	Номер страницы				Номер документа (ОРН)	Подпись	Дата	
	измененной	замененной	новой	аннулированной			внесения изменения	введения изменения