

## **МИНИСТЕРСТВО ПРИРОДНЫХ РЕСУРСОВ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

УТВЕРЖДАЮ

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

27 апреля 2001 г.

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

**РЭФИА, НИА-Природа  
Москва-2002**

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

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

#### **ПРЕДИСЛОВИЕ**

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

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

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



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

## СОДЕРЖАНИЕ

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

[10.6. Подготовка к выполнению биотестирования](#)

[10.7. Выполнение биотестирования](#)

[10.8. Обработка и оценка результатов](#)

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

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

[11.1. Назначение и область применения](#)

[11.2. Принцип методики](#)

[11.3. Характеристики погрешности измерений](#)

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

[11.5. Условия выполнения биотестирования](#)

[11.6. Подготовка к выполнению биотестирования](#)

[11.7. Выполнение биотестирования](#)

[11.8. Обработка и оценка результатов](#)

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

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

[12.1. Назначение и область применения](#)

[12.2. Принцип методики](#)

[12.3. Характеристики погрешности измерений](#)

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

[12.5. Условия выполнения биотестирования](#)

[12.6. Подготовка к выполнению биотестирования](#)

[12.7. Выполнение биотестирования](#)

[12.8. Обработка и оценка результатов](#)

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

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

[13.1. Назначение и область применения](#)

[13.2. Принцип методики](#)

[13.3. Характеристики погрешности измерений](#)

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

[13.5. Условия выполнения биотестирования](#)

[13.6. Подготовка к выполнению биотестирования](#)

[13.7. Выполнение биотестирования](#)

[13.8. Обработка и оценка результатов](#)

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

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

[14.1. Назначение и область применения](#)

[14.2. Принцип методики](#)

[14.3. Характеристики погрешности измерений](#)

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

[14.5. Условия выполнения биотестирования](#)

[14.6. Подготовка к выполнению биотестирования](#)

[14.7. Выполнение биотестирования](#)

[14.8. Обработка и оценка результатов](#)

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

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

[15.1. Назначение и область применения](#)

[15.2. Принцип методики](#)

[15.3. Характеристики погрешности измерений](#)

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

[15.5. Условия выполнения биотестирования](#)

[15.6. Подготовка к выполнению биотестирования](#)

[15.7. Выполнение биотестирования](#)

[15.8. Обработка и оценка результатов](#)

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

## [16. МЕТОДИКА БИОТЕСТИРОВАНИЯ ПО ГИБЕЛИ РЫБ РОЕСИЛЛИА РЕТИКУЛАТА](#)

### [ПЕТЕРС](#)

[16.1. Назначение и область применения](#)

[16.2. Принцип методики](#)

[16.3. Характеристики погрешности измерений](#)

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

[16.5. Условия выполнения биотестирования](#)

[16.6. Подготовка к выполнению биотестирования](#)

[16.7. Выполнение биотестирования](#)

[16.8. Обработка и оценка результатов](#)

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

### [ПРИЛОЖЕНИЯ](#)

[Приложение А Термины и определения](#)

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

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

[Приложение Г Форма протокола биотестирования](#)

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

## **1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ**

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

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

## **2. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ**

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

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

















































































































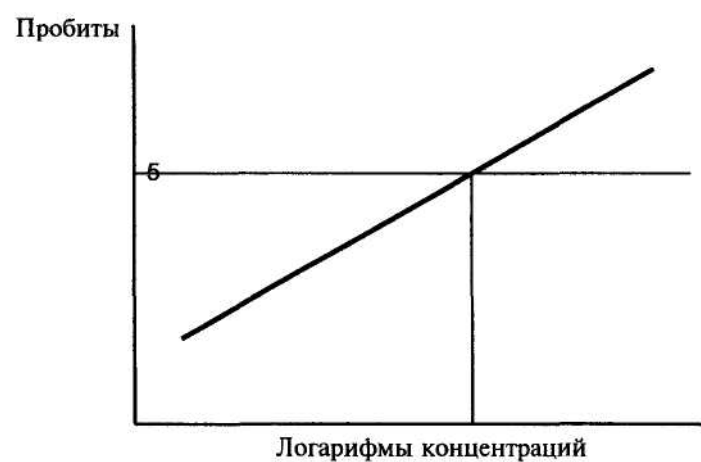




<i>реакции</i>		<i>реакции</i>	
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
1	2,67	32	4,53
2	2,95	33	4,56
3	3,12	34	4,59
4	3,25	35	4,61
5	3,35	36	4,64
6	3,45	37	4,67
7	3,52	38	4,69
8	3,59	39	4,72
9	3,66	40	4,75
10	3,72	41	4,77
11	3,77	42	4,80
12	3,83	43	4,82
13	3,87	44	4,84
14	3,92	45	4,87
15	3,96	46	4,90
16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

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

а)



б)

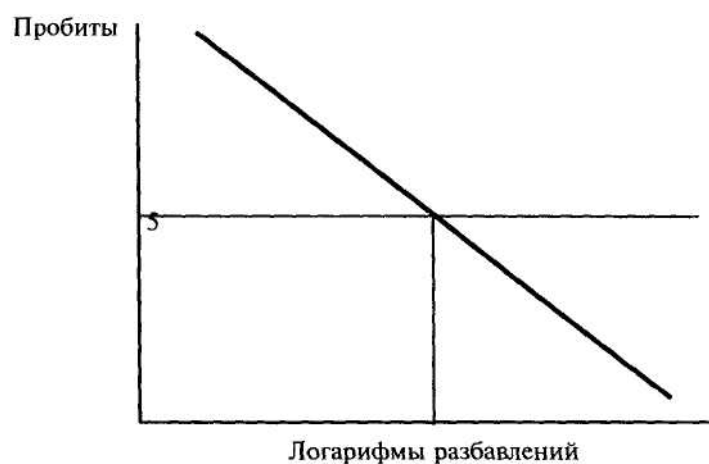


Рис. В.1. Установление графическим способом

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

Приложение Г

Форма протокола биотестирования

(название Министерства, ведомства, если необходимо)

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

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

(адрес лаборатории, телефон, факс)

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

Наименование заказчика \_\_\_\_\_

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

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

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

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

Вид пробы \_\_\_\_\_

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

Заведующий лабораторией \_\_\_\_\_

(подпись, Ф.И.О.)

**Приложение Д****РАЗРАБОТЧИКИ МЕТОДИК «РУКОВОДСТВА ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ МЕТОДОМ БИОТЕСТИРОВАНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ВОД, ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ, ЗАГРЯЗНЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ И БУРОВЫХ РАСТВОРОВ»**

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

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

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

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

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

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

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

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