РД 52.24.635—2002

РУКОВОДЯЩИЙ ДОКУМЕНТ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

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

gost.e-ecolog.ru

РД 52.24.635—2002

РУКОВОДЯЩИЙ ДОКУМЕНТ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

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

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН	Гидрохимическим институтом (ГХИ) Федеральной службы России по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды (Росгидромет)
2 РАЗРАБОТЧИКИ	А. М. Никаноров, чл.-кор. РАН, руководитель разработки; Т. А. Хоружая, профессор, д-р биол. наук; Л. С. Косменко, канд. хим. наук
3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ	Первым заместителем Руководителя Росгидромета Ю. С. Цатуровым 16 мая 2002 г.
4 ЗАРЕГИСТРИРОВАН	Центральным конструкторским бюро гидрометеорологического приборостроения (ЦКБ ГМП) за номером РД 52.24.635—2002 от 22 мая 2002 г.
5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ	

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Определения 2
4 Сокращения 6
5 Общие положения 7
6 Основные принципы биотестирования донных отложений . 7
7 Формирование сети пунктов и программ наблюдений 8
8 Отбор, транспортировка и хранение проб 10
9 Подготовка проб для биотестирования 10
10 Методики биотестирования (биотесты) 11
11 Оценка токсичности 12
12 Требования к квалификации специалиста 13
Приложение А Природа токсичности донных отложений 14
Приложение Б Сущность методов биотестирования токсичности донных отложений 16
Приложение В Закономерности реакций организмов на токсическое воздействие 19
Приложение Г Методика биотестирования донных отложений на организмах зообентоса (хирономидах) 21
Приложение Д Библиография 28

Введение

Антропогенные воздействия на водные экосистемы приводят к негативным изменениям, наиболее сильно выраженным в сообществах донных организмов. Важнейшим фактором, вызывающим деградацию донных сообществ и возникновение чрезвычайных ситуаций, является загрязнение токсичными химическими веществами, которые депонируются в осадках и становятся источником потенциальной опасности для экосистемы водного объекта. Под их влиянием экосистема становится неустойчивой, из состава биоценоза выпадают наиболее чувствительные к токсическому загрязнению виды организмов, в том числе ценные промысловые виды, разрушается их кормовая база, места нереста и миграции. Начинается процесс деградации водного объекта, ухудшается качество воды и он теряет свое хозяйственное значение. В этой связи контроль токсического загрязнения донных отложений является важной задачей мониторинга водных объектов.

Оценка загрязненения донных отложений водных объектов токсичными химическими веществами может осуществляться с помощью двух подходов:

1) традиционного химического анализа концентраций в пробе;

2) относительно нового подхода — биотестирования токсичности. Биотестирование позволяет определить интегральную токсичность, обусловленную совокупностью всех присутствующих в пробе токсичных химических веществ и их метаболитов.

Оценка токсичности воды и донных отложений с помощью биотестирования широко используется за рубежом. В России установлены нормативные требования по биотестовым показателям [1], однако они относятся только к оценке токсичности проб воды, но не донных отложений. Для проведения работ по биотестированию воды ГХИ подготовлены рекомендации по методам токсикологической оценки загрязнения пресноводных экосистем [2] для оперативно-производственных подразделений управлений по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды (УГМС) Росгидромета. Методическая база для выполнения

работ по биотестированию донных отложений пока отсутствует. Целью настоящих методических указаний является создание методической базы мониторинга токсического загрязнения донных отложений с помощью биотестирования на основе принципов организации и проведения режимных наблюдений и оперативных работ в системе мониторинга поверхностных вод суши (ПВС) Росгидромета [3]. В их основу положены научно-исследовательские разработки [4—9].

Использование настоящих методических указаний позволит проводить работы по оценке токсичности (выявлению наличия и определению степени токсичности) пробы донных отложений, оценке уровня токсического загрязнения донных отложений водного объекта, выделению участков накопления токсичных загрязняющих веществ в донных отложениях и оценке влияния источников загрязнения на состояние донных отложений; а также в комплексе с химическим и гидробиологическим анализом оценивать эколого-токсикологическое состояние водных объектов.

РУКОВОДЯЩИЙ ДОКУМЕНТ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

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

Дата введения 2002—05—22

1 Область применения

Методические указания устанавливают требования к организации и проведению наблюдений по оценке токсического загрязнения донных отложений на основе биотестирования в составе системы мониторинга поверхностных вод суши (ПВС).

Методические указания предназначены для использования оперативно-производственными подразделениями УГМС Росгидромета, осуществляющими организацию и проведение наблюдений за состоянием поверхностных вод суши.

Методические указания могут быть также использованы для оценки токсичности донных отложений, изымаемых при дноуглубительных работах, грунта, подлежащего захоронению, и техногенно загрязненных почв.

2 Нормативные ссылки

В настоящих методических указаниях использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 17.1.1.01—77 Использование и охрана вод. Основные термины и определения

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

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

ГОСТ 171—81 Дрожжи хлебопекарные прессованные. Технические условия

ГОСТ 1770—74 Е Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Технические условия

ГОСТ 2874—82 Вода питьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством

ГОСТ 18451—73 Океанология. Термины и определения

ГОСТ 19179—73 Гидрология суши. Термины и определения

ГОСТ 24104—88 Е Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия

ГОСТ 25336—82 Е Посуда и оборудование стеклянное. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 27065—86 (СТ СЭВ 5184—85) Качество вод. Термины и определения

3 Определения

В настоящих методических указаниях использованы следующие термины с соответствующими определениями.

Анализ проб воды — определение физических, физико-химических, химических, биологических, токсических свойств и состава воды [10].

Бентос — совокупность организмов, обитающих в донных отложениях водных объектов. Выделяют зообентос (животные), фитобентос (растения), бактериобентос (бактерии) [10].

Биотестирование (биологическое тестирование) — оценка качества объектов окружающей среды (воды и др.) по ответным реакциям живых организмов, являющихся тест-объектами (ГОСТ 27065).

Биотесты — методики биотестирования [2].

Водный объект — по ГОСТ 19179.

Высокое загрязнение (ВЗ) — явление, которое в системе мониторинга ПВС Росгидромета устанавливают по следующим при-

знакам: увеличение концентраций загрязняющих веществ 1-го, 2-го классов опасности, превышающих предельно допустимые концентрации (ПДК) в 3—5 раз, веществ 3-го, 4-го классов опасности в 10—50 раз (для нефтепродуктов, фенолов, соединений меди, железа и марганца — от 30 до 50 раз); снижение концентрации растворенного в воде кислорода до значений от 3 до 2 мг/л; покрытие определенной площади поверхности водного объекта нефтяной, масляной или пленкой другого происхождения.

Гидробиологические показатели качества воды — показатели, определяемые при гидробиологическом анализе [10].

Гидробионты (водные организмы) — организмы, которые живут в воде, донных отложениях водных объектов и играют важную роль в формировании химического состава природных вод и гидрохимического режима водных объектов [10].

Донные отложения — донные наносы и твердые частицы, образовавшиеся и осевшие на дно в результате внутриводоемных процессов, в которых участвуют вещества как естественного происхождения, так и антропогенного [10].

Загрязнение воды водоемов и водотоков — процесс изменения состава и свойств воды под влиянием поступающих в воду загрязняющих веществ, микроорганизмов, тепла, приводящих к ухудшению качества воды [3].

Загрязнение вторичное — по ГОСТ 27065.

Загрязнение токсическое — загрязнение воды водоемов и водотоков токсичными веществами.

Загрязненность — содержание в воде загрязняющих веществ, вызывающее нарушение норм качества воды [3].

Источник загрязнения вод — по ГОСТ 17.1.1.01.

Критерий токсичности — признак, на основании которого устанавливают токсичность воды [11].

Накопление (аккумуляция) веществ в водных объектах — процесс накопления минеральных, органических веществ (воды, солей, загрязняющих веществ, биомассы гидробионтов, продуктов выделения и распада гидробионтов, продуктов эрозии и абразии и др.) в результате геологических, физических, химических и биологических процессов и хозяйственной деятельности человека [10].

Онтогенез — индивидуальное развитие организма.

Острое токсическое действие (острая токсичность) — воздействие, вызывающее ответную реакцию тест-объекта, которая проявляется за относительно короткий период времени. Концентрации химических веществ, характеризующие параметры острой токсичности, довольно высоки. Острое токсическое действие обычно оценивают по тест-реакции „выживаемость" организмов, когда регистрируют число погибших тест-объектов.

Отклик на токсическое воздействие (эффект токсического воздействия) — реакция живых организмов на воздействие токсичных химических веществ [12].

Поверхностные воды — по ГОСТ 19179.

Показатели токсичности — показатели, на основании которых делают выводы о токсичности вещества или загрязненной воды для водного организма.

Пункт наблюдений за загрязнением поверхностных вод суши Государственной сети наблюдений (ГСН) Росгидромета — место на водоеме или водотоке, где проводят комплекс работ для получения данных о качестве воды или донных отложений [3].

Состояние водного объекта — характеристика водного объекта по совокупности его количественных и качественных показателей применительно к видам водопользования (ГОСТ 17.1.1.01).

Створ пункта наблюдений за загрязнением поверхностных вод суши ГСН Росгидромета — условное поперечное сечение водоема или водотока, в котором производят комплекс работ для получения данных о показателях состава и свойств воды [3].

Тест-объект — организм, который используют при биотестировании (водоросли, дафнии и т. д.) [2].

Тест-реакция — реакция тест-объекта, используемая для определения токсичности водной среды [2].

Токсикологический эксперимент — эксперимент в водной токсикологии, в ходе которого оценивают влияние на тест-объект испытуемой воды или химического соединения. Эксперимент ставят в условиях регулярной смены воды или без нее (в непроточных условиях).

Токсикологические (биотестовые) показатели — показатели биотестирования на различных тест-объектах (дафниях, водорослях, рыбах и т.д.) [12].

Токсиканты — химические вещества, обладающие свойством токсичности [12].

Токсикология водная — наука о токсичности водной среды, в том числе природной или сточной воды для гидробионтов [12].

Токсикология экологическая (экотоксикология) — наука об окружающей среде, изучающая воздействие загрязняющих веществ на окружающую среду и живые организмы, включая человека [14].

Токсичность воды (донных отложений) — свойство воды (донных отложений) вызывать патологические изменения или гибель организмов, обусловленное присутствием в ней токсичных веществ [11].

Точка отбора проб — точно зафиксированное местоположение отбора пробы воды или донных отложений [2].

Требования к качеству воды по токсикологическим показателям — нормативные требования к качеству воды, соответствие которым проверяют с помощью биотестирования токсичности воды [1].

Фоновый створ — створ, расположенный на расстоянии не менее 1 км выше источника загрязнения (условно чистый участок водного объекта) [10].

Хроническое токсическое действие (хроническая токсичность) — воздействие, вызывающее ответную реакцию тест-объекта, проявляющуюся в течение относительно длительного периода времени. Хроническое токсическое действие водной среды обычно оценивают не только по выживаемости тест-объектов, но и по другим тест-реакциям: „плодовитость", „изменение роста" и т. д. [12].

Чрезвычайная экологическая ситуация — экологическое неблагополучие, характеризующееся устойчивыми отрицательными изменениями окружающей среды и представляющее угрозу для здоровья населения [13].

Экологическое благополучие экосистемы — состояние экосистемы, которое характеризуется нормальным воспроизведением ее основных звеньев [14].

Экспозиция — период, в течение которого организм находится под воздействием исследуемого фактора, в частности химического вещества. В зависимости от экспозиции различают острое или хроническое токсическое действие [14].

Экстремально высокое загрязнение (ЭВЗ) — явление, которое, как правило, обусловлено, аварийным и залповым сбросом загрязняющих веществ. В системе мониторинга ПВС Росгидромета ЭВЗ устанавливают по следующим признакам: массовой гибели (или заболеваниям) рыбы или других водных организмов, а также сокращению и потере мест нагула, нереста, нарушения путей миграции рыб и других проявлений экологического неблагополучия.

4 Сокращения

В настоящих методических указаниях приняты следующие сокращения.

ГХИ	—	Гидрохимический институт.
Росгидромет	—	Федеральная служба России по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды.
УГМС	—	Межрегиональное территориальное управление по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды.
ПВС	—	поверхностные воды суши.
ВЗ	—	высокое загрязнение.
ГСН		Государственная служба наблюдений.
БПК	—	биохимическое потребление кислорода.
ЭВЗ	—	экстремально высокое загрязнение.
НЗВДО	—	наблюдения за содержанием загрязняющих веществ в донных отложениях.
ОТД	—	острое токсическое действие.
ХТД	—	хроническое токсическое действие.
ПДК	—	предельно допустимая концентрация.

5 Общие положения

5.1 Биотестирование токсичности донных отложений проводится с целью интегральной оценки их токсического загрязнения, обусловленного присутствием совокупности токсичных химических (загрязняющих) веществ. Теоретические положения, касающиеся природы токсичности донных отложений, изложены в приложении А.

5.2 Биотестирование токсичности донных отложений используют для решения следующих задач:

— оценки токсичности (выявления наличия и степени токсичности) пробы донных отложений;

— оценки уровня токсического загрязнения донных отложений водного объекта, выделения участков накопления токсичных загрязняющих веществ в донных отложениях и оценки влияния источников загрязнения на состояние донных отложений;

— оценки уровня токсического загрязнения экосистемы водного объекта по результатам биотестирования донных отложений и воды.

5.3 Биотестирование донных отложений может быть использовано также для оценки:

— эколого-токсикологического состояния и экологического благополучия водного объекта в комплексе с методами химического и гидробиологического анализа;

— токсичности донных отложений, изымаемых при дноуглубительных работах;

— токсичности грунта, подлежащего захоронению;

— токсичности техногенно загрязненных почв.

6 Основные принципы биотестирования донных отложений

6.1 Принцип биотестирования донных отложений заключается в одновременном проведении токсикологического эксперимента на пробе с исследуемого участка водного объекта (опыт-

ной) и пробе с фонового участка (контрольной) и последующем установлении различий между результатами (приложение Б).

6.2 В зависимости от поставленных задач биотестирование донных отложений проводят:

— на материале пробы, не подвергавшейся какой-либо обработке („необработанной" пробе) — для анализа токсичности, обусловленной всей совокупностью присутствующих в пробе загрязняющих веществ и их метаболитов (общей токсичности);

— на водной вытяжке донных отложений — для анализа токсичности водорастворимых загрязняющих веществ.

7 Формирование сети пунктов и программ наблюдений

7.1 Наблюдения по оценке токсического загрязнения донных отложений организуют в пунктах режимных наблюдений, в которых проводятся наблюдения за содержанием загрязняющих веществ в донных отложениях (НЗВДО) в составе системы мониторинга ПВС [15].

7.2 При проведении оперативных наблюдений отбор проб проводят на следующих участках:

— где предполагается высокий уровень загрязнения;

— где зарегистрированы признаки ЭВЗ;

— в зоне чрезвычайной экологической ситуации.

7.3 При выполнении работ по оценке эколого-токсикологического состояния и экологического благополучия водного объекта отбор проб проводят одновременно с отбором на гидрохимический и гидробиологический анализ в тех же точках.

7.4 Выбор пунктов наблюдений и створов осуществляет УГМС и согласует с ГХИ в порядке, установленном [3]. При выборе пунктов и створов отбора проб для биотестирования учитывают:

— тип водного объекта;

— расположение участков осадконакопления;

— расположение источников загрязнения;

— ретроспективные (за предшествующий период) данные о характере загрязнения;

— тип и характеристики донных отложений.

7.4.1 Пробы донных отложений отбирают в зонах максимального осадконакопления: на плесовых участках, в зонах подпора боковыми притоками, в приплотинной части водохранилищ, в местах проведения дноуглубительных работ и резкого расширения русла реки и т. д.

На небольшом плесовом участке (протяженностью менее 50 м) пробы берут в его средней части. Если плесовый участок большой (более 50 м), отбирают интегральную пробу, составляемую из порций, взятых в точно зафиксированных створах, которые располагают вдоль плеса.

7.4.2 При оценке влияния источника загрязнения на водотоках отбирают пробы:

— выше участка осадконакопления или на участке осадконакопления, но не далее 0,5 км от места сброса сточных вод;

— выше источника загрязнения в фоновом створе (обычно устанавливают на 1 км выше источника загрязнения).

7.4.3 При оценке влияния источника загрязнения на водоемах отбирают пробы:

— в зоне влияния сброса сточных вод;

— в зоне верхнего бьефа гидроузла или в истоке реки (канала) из водоема;

— в замыкающих створах питающих их водотоков.

7.4.4 Для отбора проб выбирают те пункты и створы, где уровень загрязнения воды, особенно придонных слоев, по данным предшествующих наблюдений (по гидрохимическим и гидробиологическим показателям) наиболее высок для данного водного объекта.

7.4.5 Точки отбора проб устанавливают в соответствии с НЗВДО [15] таким образом, чтобы все пробы были обеспечены контрольными пробами с идентичным типом и характеристиками донных отложений. Последние определяют согласно [4], приложение А.

7.5 Формирование программ наблюдений, периодичность и сроки отбора проб донных отложений в ходе режимных наблюдений проводят в зависимости от задач биотестирования (по 5.2) и в соответствии с НЗВДО согласно [15].

7.6 Выбор пунктов, створов для отбора проб и подготовку программ осуществляют УГМС и согласуют их с ГХИ в порядке, установленном [3, 15].

8 Отбор, транспортировка и хранение проб

8.1 Отбор проб донных отложений проводят согласно методическим указаниям [15], используя способы и устройства, предусмотренные [15].

8.2 Помимо проб донных отложений, на этом же участке отбирают воду (по возможности из придонного слоя) согласно ГОСТ 17.1.5.04, ГОСТ 17.1.5.05 для подготовки к биотестированию пробы донных отложений.

8.3 Отобранные пробы донных отложений помещают в чистые пластиковые мешки или пластмассовые (стеклянные) широкогорлые банки, в которых доставляют их в лабораторию.

8.4 Консервирование проб не допускается.

8.5 Сразу после отбора пробы помещают в холодильник или в прохладное место на борту экспедиционного судна. Во влажном состоянии пробы хранят не более 1 сут при температуре не выше 5 °С.

8.6 Биотестирование проводят не позднее, чем через 1 сут после отбора проб. Если это невозможно, пробы замораживают. В замороженном состоянии при температуре от минус 15 до минус 20 °С пробы можно хранить в течение 60 сут.

9 Подготовка проб для биотестирования

9.1 Подготовку опытной и контрольной проб проводят одновременно с помощью одних и тех же процедур.

К каждой опытной пробе ставят контроль с соответствующим типом и характеристиками донных отложений (тип донных отложений в опытной и контрольной пробах должен быть одинаковым).

9.2 Отобранную пробу во влажном состоянии пропускают через капроновое сито с диаметром пор от 0,5 до 1,5 мм для удаления обломков раковин, камней, водорослей и отмерших организмов. Осадок собирают в полиэтиленовый мешок или пластмассовую посуду. Для выполнения этой процедуры используют природную воду, отобранную на том же участке одновременно с донными отложениями; количество воды для смывания осадка при этом должно быть минимальным. Полученный осадок отстаивают в течение 6 ч, после чего декантируют или сливают с помощью сифона большую часть воды. Осадок перемешивают с оставшейся водой и используют для биотестирования.

Осадок можно хранить во влажном состоянии не более 1 сут при температуре от 2 до 4 °С. Если провести биотестирование в течение этого времени невозможно, осадок замораживают и хранят в замороженном состоянии при температуре от минус 15 до минус 20 °С в течение 60 сут.

9.3 При биотестировании „необработанной" пробы используют осадок, полученный по 9.2.

9.4 При биотестировании водной вытяжки полученный осадок (по 9.2) помещают в чашки Петри и оставляют на воздухе при температуре 20 ± 5 °С для получения воздушно-сухой пробы. Берут навеску массой 100 г и добавляют природную воду (отобранную с фонового участка или отстоянную водопроводную воду) в соотношении 1 : 4 (400 $см^3$), взбалтывают в течение 1 ч, дают отстояться в течение 2 ч. Допускается центрифугирование в течение 15 мин при 3000 об/мин. Декантируют надосадочную жидкость и используют ее для биотестирования.

10 Методики биотестирования (биотесты)

10.1 Биотестирование пробы донных отложений проводят с помощью одной методики (биотеста) или набора методик (биотестов).

10.2 Для биотестирования „необработанной" пробы донных отложений используют биотест на организмах зообентоса согласно приложению Г.

10.3 Для биотестирования водной вытяжки используют биотесты на дафниях, цериодафниях, водорослях, парамециях, коловратках и рыбах согласно рекомендациям [2]. Приоритетным при оценке результатов биотестирования водной вытяжки по набору биотестов является биотест на дафниях или цериодафниях.

11 Оценка токсичности

11.1 Оценка токсичности пробы является экспертной. Ее делают, используя результаты регистрации показателей острого и хронического токсического действия (соответственно ОТД и ХТД). Оценка проводится специалистом с учетом закономерностей реагирования, особенностей жизнедеятельности использованных тест-объектов (приложения В, Г).

11.2 При использовании набора биотестов общую оценку токсичности донных отложений выводят исходя из следующего принципа: если хотя бы в одном из биотестов проба донных отложений оказывала токсическое действие, ее считают токсичной (результаты различных биотестов могут не совпадать вследствие различий в чувствительности тест-объектов к токсическому воздействию, приложение В).

11.3 Оценку уровня токсического загрязнения донных отложений водного объекта в целом проводят на основе результатов биотестирования проб, отобранных на разных его участках. По наличию токсичности в различных пробах донных отложений судят о расположении участков накопления токсичных загрязняющих веществ в водном объекте, зонах влияния источников загрязнения.

Для оценки уровня токсического загрязнения донных отложений водного объекта рекомендуется использовать таблицу 1, разработанную на основе данных научных исследований [16].

11.4 Оценку уровня токсического загрязнения экосистемы водного объекта проводят на основе результатов биотестирования проб донных отложений, проб воды из придонных слоев и проб воды водной толщи. При этом в токсикологических экспериментах используют одни и те же биотесты.

Таблица 1 — Оценка уровня токсического загрязнения донных отложений водного объекта

Тип и характер донных отложений	Участки водного объекта, где в пробах обнаружена токсичность	Уровень токсического загрязнения
Ил преимущественно мелкодетритный	На отдельных участках	Умеренно загрязненные
Ил мелко- и крупнодетритный	На значительной части участков	Загрязненные
Ил всех типов, илистый песок	На всех участках	Грязные
Донные отложения всех типов, поверхность камней, гравия, гальки	То же	Очень грязные

12 Требования к квалификации специалиста

Специалист, выполняющий токсикологический анализ, должен быть гидробиологом, который знаком с основами водной токсикологии. Желательно, чтобы специалист имел высшее образование.

Знание особенностей жизнедеятельности, поведения, местообитаний тест-объектов необходимы для выбора репрезентативных участков для отбора проб, отлова бентосных организмов, выполнения работ по биотестированию. Это позволит выбрать наиболее адекватные методы биотестирования, подготовить тест-объекты, обеспечить оптимальные условия жизнедеятельности в ходе токсикологического эксперимента, корректно провести анализ, дать надежную экспертную оценку результатов с учетом особенностей жизнедеятельности тест-объектов и сопоставить результаты биотестирования с результатами гидробиологического и химического анализа.

Приложение А

(справочное)

Природа токсичности донных отложений

Токсичность химических веществ является одной из главных причин негативных последствий антропогенного загрязнения природных сред. Присутствие токсичных веществ в водной среде приводит к гибели всего живого, выпадению из состава природных сообществ организмов — обитателей чистых зон и замене их эврибионтными видами.

В области охраны вод хорошо известно понятие „токсичности воды". Это свойство воды (сточной или загрязненной природной) вызывать развитие патологического процесса или гибель живых организмов. Однако не только загрязнение водной толщи, но и загрязнение донных отложений и накопление токсичных загрязняющих веществ в донных отложениях представляет опасность для всей водной экосистемы.

Накопление загрязняющих веществ в донных отложениях связано с оседанием на дно химических веществ, поступающих в водный объект и находящихся определенное время в растворенном состоянии. Помимо этого оно происходит в ходе химического осаждения труднорастворимых соединений микроэлементов, сорбции их на взвешенных частицах, поглощения водной растительностью и последующего вторичного загрязнения в результате отмирания растительности и накопления органических остатков в придонных слоях.

В результате обмена в системе вода—дно в придонные слои воды поступают загрязняющие вещества, и зона вторичного загрязнения может занимать значительную часть толщи, особенно зимой.

Процесс накопления, поведение и токсическое действие загрязняющих веществ в донных отложениях зависят от многих факторов: природы и физико-химических свойств веществ; типа грунта; кислородного режима; содержания органических веществ; pH воды и грунта; окислительно-восстановительного по-

тенциала; жесткости воды; характера водообмена; температурного режима; участия живых (бентосных) организмов, в особенности микроорганизмов в метаболизме водной экосистемы и т. д. Эти зависимости весьма сложны и многокомпонентны.

Большую роль в проявлении токсических эффектов играют сезонные колебания влияющих факторов и их параметры. Сезонные изменения концентрации кислорода в придонном слое воды вызывают сопряженные изменения окислительно-восстановительных условий в донных отложениях, изменения интенсивности и направленности сорбционных процессов. Температурный режим, состав воды придонных слоев, содержание кислорода и окислительно-восстановительные условия существенно зависят от интенсивности перемещения водных масс в годичном цикле.

Уровень концентраций и интенсивность накопления химических веществ в донных отложениях существенно зависят от типа донных отложений и их гранулометрического состава. С уменьшением размера частиц в осадках увеличивается концентрация многих загрязняющих веществ: алюминия, железа, марганца и других элементов. Во фракциях менее 0,01 мм в глинистых илах сконцентрировано более 80 % микроэлементов, в песчаных — лишь 27—57 %.

Характерной особенностью антропогенного загрязнения донных отложений является неоднородность в пространстве — так называемая пятнистость, что является важным обстоятельством, определяющим выбор репрезентативных участков отбора проб.

Донные отложения могут стать токсичными не только вследствие антропогенного загрязнения, но и в результате появления в воде продуктов жизнедеятельности определенных групп гидробионтов, которые могут быть токсичными для других водных организмов, а также вследствие размывания и геологических процессов, дноуглубительных и строительных работ, добычи полезных ископаемых и строительных материалов — песка, гравия и т. д.

Токсичность донных отложений для гидробионтов является более опасной, чем токсичность воды, поскольку она проявляется в течение более длительного времени.

Приложение Б
(справочное)

Сущность методов биотестирования токсичности донных отложений

Биотестирование (биологическое тестирование) донных отложений — это совокупность приемов получения информации об их токсичности, используемых в водной токсикологии. Биотестирование дает характеристику интегральной токсичности проб природной воды и донных отложений конкретного водного объекта.

Согласно определению (ГОСТ 27065), биотестирование токсичности основано на регистрации реакций водных организмов (тест-объектов). Это широко распространенный экспериментальный методический прием, который представляет собой токсикологический эксперимент. Суть эксперимента заключается в том, что тест-объекты помещают в исследуемую среду (водные растворы химических веществ, природную, сточную воду или вытяжку из донных отложений) и выдерживают (экспонируют) определенное время, в течение которого регистрируют реакции тест-объектов на воздействие этой среды. В качестве тест-объектов используют лабораторные культуры гидробионтов или природные популяции.

Приемы биотестирования широко применяются в различных областях природоохранной деятельности и используются по различным назначениям. Биотестирование является основным методом при разработке нормативов ПДК химических веществ (биотестирование токсичности индивидуальных химических веществ) и, в конечном итоге, при оценке их опасности для окружающей среды и здоровья населения. Таким образом, оценка уровня загрязнения по результатам химического анализа, т. е. интерпретация результатов с точки зрения опасности для окружающей среды, также в значительной степени опирается на данные биотестирования.

Методы биотестирования, будучи биологическими по сути, близки по смыслу получаемых данных к методам химического анализа вод: как и химические методы, они отражают характеристику воздействия на водные биоценозы.

Разработка методов биотестирования тесно связана с успехами водной токсикологии, экотоксикологии и гидробиологии. Основным методом оценки токсичности химических веществ для рыбохозяйственных водоемов долгое время были только биотесты, основанные на регистрации выживаемости рыб. В настоящее время перечень методик биотестирования и сферы их применения существенно расширились. Они используются для характеристики эколого-токсикологического состояния и экологического благополучия водной экосистемы. При разработке эколого-рыбохозяйственных нормативов используют наборы организмов (тест-объектов), представляющих различные трофические звенья водной экосистемы, а также организмы, имеющие промысловое значение, ценные и исчезающие виды. Это биотесты на ракообразных (дафниях, цериодафниях), водорослях, макрофитах, простейших, коловратках, рыбах и других гидробионтах.

Для токсикологической оценки загрязнения пресноводных экосистем на основе биотестирования водной среды в рамках системы мониторинга ПВС Росгидромета рекомендовано использовать шесть видов тест-объектов: дафний, цериодафний, водорослей, простейших, коловраток, рыб [2]. Для оценки уровня токсического загрязнения донных отложений целесообразно использовать биотесты на представителях донных биоценозов – зообентосе. Лучше всего использовать природные популяции данного водоема: личинок водных насекомых (комаров, стрекоз, жуков, эфемерид), а также ручейников, бентических ракообразных (водяного ослика, бокоплавов, гаммарусов), отловленных на незагрязненных участках водного объекта. Наиболее массовыми видами зообентоса в большинстве озер, прудов, равнинных рек являются личинки водных насекомых — комаров (хирономиды). Личинки хирономид включены в перечень тест-объектов, рекомендуемых для разработки нормативов ПДК.

О наличии токсичности судят по проявлениям негативных эффектов у тест-объектов, которые считаются показателями ток-

сичности. Среди показателей токсичности выделяют общебиологические, физиологические, биохимические, химические, биофизические и т. д. Показателем токсичности является тест-реакция, изменения которой регистрируют в ходе токсикологического эксперимента.

Следует заметить, что под токсикологическими (биотестовыми) показателями в экологической и водной токсикологиях понимают показатели биотестирования на различных тест-объектах (дафниях, водорослях, рыбах и т. д.). В то же время в санитарно-гигиеническом нормировании под токсикологическими показателями понимают концентрации токсичных химических веществ (например, в нормировании питьевой воды они характеризуют ее безвредность).

В результате биотестирования проб на основе регистрации показателей токсичности делают оценку токсичности по критериям, установленным для каждого биотеста. Результаты биотестирования опытной пробы с исследуемого участка сравнивают с контрольной — заведомо нетоксичной пробой и по разнице в контроле и в опыте судят о наличии токсичности. При этом эффекты воздействия делят на острые и хронические. Их обозначают как острое и хроническое токсическое действие или как острую и хроническую токсичность (ОТД и ХТД соответственно). Эти термины и используют для выражения результатов биотестирования.

Нормативные требования по биотестовым показателям для воды введены в практику контроля рыбохозяйственных водоемов сравнительно недавно [1]; для донных отложений они пока не установлены.

Наиболее полная оценка эколого-токсикологического состояния водных объектов основывается на использовании данных биотестирования в комплексе с данными гидробиологического и химического анализов.

Приложение В

(справочное)

Закономерности реакций организмов на токсическое воздействие

Реакция тест-объектов на токсическое воздействие зависит от интенсивности или продолжительности воздействия. По результатам биотестирования находят количественную зависимость между величиной воздействия и реакцией тест-объектов.

Реакция организма на воздействие токсичных химических веществ представляет собой комплекс взаимозависимых эволюционно сформировавшихся реакций, направленных на сохранение постоянства внутренней среды организма и в конечном итоге на выживание.

Выявлены определенные закономерности реакций организмов на токсические воздействия. В общем виде воздействие токсичного вещества на организм описывается двумя основными параметрами: концентрацией и временем воздействия (экспозицией). Именно эти параметры определяют степень влияния токсичного вещества на организм.

Результат токсического воздействия в водной токсикологии (и в экотоксикологии) обычно называют эффектом токсического воздействия. Для описания зависимости между эффектом воздействия токсичного вещества на организм и его концентрацией предложены различные уравнения. Наиболее простым выражением зависимости является формула Хабера, которая имеет вид

$$E = CT, \qquad \text{(В.1)}$$

где E — эффект (результат) воздействия;

C — концентрация воздействующего вещества;

T — время воздействия (экспозиция).

Эффект E представляет собой любой результат воздействия, например гибель тест-объектов, а величины C и T могут быть выражены в соответствующих единицах измерения.

Как видно из формулы Хабера, между эффектом, временем воздействия и концентрацией имеется прямая функциональная связь: эффект будет тем большим, чем больше величина воздействия (концентрация вещества) и/или его продолжительность.

Не все организмы одинаково реагируют на одно и то же воздействие. Реакция зависит от чувствительности к воздействию. Чувствительность организма к токсичному веществу — это совокупность реакций на его воздействие, характеризующих скорость и степень реагирования организма. Чувствительные организмы быстрее реагируют на малые концентрации по сравнению с менее чувствительными (резистентными, устойчивыми) организмами. Чувствительность характеризуется такими показателями, как время начала проявления отклика (реакции) или концентрация токсичного вещества, при которой проявляется реакция; она существенно отличается не только у разных видов организмов, но и у разных индивидуумов (особей) одного вида.

Формула Хабера позволяет сравнивать биологические эффекты различных химических веществ с помощью анализа их концентрации или экспозиции. Отличия по какому-либо из этих величин отражают отличия в чувствительности организмов к токсическому воздействию.

При малых концентрациях или экспозициях эффект воздействия проявляется в популяции у небольшого числа тест-объектов, которые оказываются наиболее чувствительными, т. е. наименее устойчивыми к воздействию. По мере увеличения концентрации или экспозиции число устойчивых организмов падает, и в конце концов у всех (или почти у всех) организмов удается зарегистрировать четко выраженные эффекты токсического воздействия. В ходе токсикологического эксперимента находят зависимость отклика тест-объектов от величины или времени воздействия.

Приложение Г

(рекомендуемое)

Методика биотестирования донных отложений на организмах зообентоса (хирономидах)

Г.1 Тест-объекты

В качестве тест-объектов могут быть использованы различные природные популяции организмов, выбор которых зависит от состава местной донной фауны. Это могут быть личинки хирономид и других водных насекомых (стрекоз, жуков, эфемерид), а также ручейники, бентические ракообразные (водяной ослик, бокоплавы, гаммарусы), отловленные на незагрязненных (фоновых) участках водного объекта. Методика биотестирования на природных популяциях изложена в рекомендациях [2].

Ниже описана методика биотестирования на примере личинок комаров — хирономид. Личинки хирономид являются наиболее массовыми представителями зообентоса; они занимают важное место в экосистеме еще и потому, что играют большую роль в пищевом рационе рыб [17, 18]. Они являются удобными тест-объектами, так как получение (отлов) и содержание их не представляет трудностей.

Биотест на хирономидах является обязательным при разработке рыбохозяйственных предельно допустимых концентраций (ПДК) загрязняющих веществ.

Г.2 Принцип методики

Г.2.1 Биотест основан на использовании в качестве тест-объектов личинок хирономид видов *Chironomus plumosus*, *Ch. dorsalis*, *Ch. riparius*, *Ch. semireductus* (класс *Insecta*, отряд *Diptera*, семейство *Chironomidae*) и установлении различия между показателями токсичности у личинок, помещенных в опытную пробу донных отложений (отобранную на исследуемом

участке) и контрольную пробу (отобранную на фоновом участке водного объекта).

Г.2.2 Биотестирование опытной и контрольной проб должно быть проведено на особях одного и того же вида хирономид.

Г.2.3 В биотесте определяют следующие показатели: ОТД в кратковременном эксперименте (продолжительностью 96 ч) и ХТД в длительном эксперименте (более 96 ч и до 30 сут).

Г.2.4 Показателями токсичности для определения ОТД и ХТД являются:

— гибель тест-объектов, а также повреждения, угрожающие жизни (ОТД и ХТД);

— изменение метаморфоза — числа и сроков вылета взрослых комаров (ХТД).

Дополнительно могут быть использованы следующие показатели: развитие морфологических повреждений (ОТД и ХТД), изменение линейных размеров тела (ХТД), замедление превращения личинок в куколки (ХТД), изменение поведенческих реакций (ХТД).

Г.2.5 Критерием токсичности пробы являются отличия в показателях токсичности на 25 % и более.

Г.3 Необходимое оборудование и материалы

Г.3.1 Устройства для отбора проб донных отложений, предусмотренные методическими указаниями [15].

Г.3.2 Посуда для транспортировки и хранения проб донных отложений вместимостью 0,5 $дм^3$.

Г.3.3 Сито капроновое для промывки ила.

Г.3.4 Сачок аквариумный для переноса личинок.

Г.3.5 Чашки Петри по ГОСТ 25336.

Г.3.6 Кристаллизаторы стеклянные.

Г.3.7 Холодильник бытовой, поддерживающий температуру от 2 до 6 °С, с морозильной камерой, поддерживающей температуру от минус 18 до минус 20 °С.

Г.3.8 Весы лабораторные по ГОСТ 24104 2-го класса точности с наибольшей предельной нагрузкой 200 г.

Г.3.9 Цилиндры мерные по ГОСТ 1770 2-го класса точности вместимостью 0,5 $дм^3$.

Г.3.10 Колбы конические плоскодонные вместимостью 250, 500 $см^3$ по ГОСТ 25336.

Г.3.11 Термометр по ГОСТ 112 с ценой деления шкалы 1 °С.

Г.3.12 Вода питьевая (водопроводная) по ГОСТ 2874.

Г.3.13 Дрожжи пекарские по ГОСТ 171.

Г.3.14 Микроскоп биологический по ГОСТ 8074.

Г.4 Условия проведения биотестирования

Токсикологический эксперимент проводят при комнатной температуре, в непроточных условиях, в 2-кратной повторности.

Следят за тем, чтобы уровень воды над осадком составлял 1—3 мм; ее доливают из соответствующей пробы воды. Погибших личинок удаляют, осторожно сливая воду из чашки Петри.

В течение 96 ч (кратковременный эксперимент) личинок не кормят. В длительных экспериментах (более 96 ч) личинок ежедневно подкармливают дрожжами.

Г.5 Получение тест-объектов и особенности их жизнедеятельности

Хирономиды обитают в водоемах с илистым дном, на участках с тихим течением или там, где оно отсутствует — в заливах, прудах, ручьях на небольшой глубине (литорали). Они хорошо известны рыболовам-любителям как мотыль, который используют в качестве живого корма для аквариумных рыб или как приманку при рыбалке.

Личинки представляют собой одну из стадий онтогенеза комаров. Самка комара откладывает яйца, заключенные в студенистую прозрачную оболочку. Из яйца вылупляется бесцветная или сероватая личинка, которая после первой линьки приобретает красный цвет; он обусловлен значительным содержанием гемоглобина в крови насекомого.

Вещество, выделяемое из слюнных желез личинки, склеивает вокруг нее частицы ила, превращая их в илистые трубочки

(домики). Живя в этих домиках, личинки высовывают наружу только головной конец туловища, которым они роются в иле, добывая пищу — бактерий, животные и детрит (растительные остатки). Они пропускают донные осадки через кишечник, ассимилируя содержащиеся в них органические вещества. Личинки обычно находятся в поверхностном слое донных отложений на глубине 10—20 см, но при неблагоприятных условиях выползают на поверхность.

Дышит личинка с помощью нитевидных жаберных придатков, расположенных на заднем конце туловища, а также всей поверхностью тела. В спокойном состоянии личинка совершает волнообразные движения тела, что способствует движению воды вокруг нее и улучшает кислородный режим.

Зрелые личинки интенсивно растут и окукливаются. Перед вылетом имаго (взрослого комара) куколка поднимается к поверхности воды, ее покровы лопаются и взрослый комар покидает водную среду обитания. За счет вылета комаров в континентальных водоемах наблюдается резкое снижение биомассы, что обычно происходит 3—4 раза в год. Таким образом, метаморфоз включает стадию личинки, куколки и имаго (взрослый комар).

Отлов личинок производят с берега или с лодки. Ведром, к которому привязана веревка, зачерпывают донные отложения и порциями помещают в капроновое сито. Осадок промывают водой, для чего сито осторожно опускают в воду и вращают его. Личинки хирономид при этом всплывают на поверхность, и их легко собрать аквариумным сачком. Лучше всего отлавливать личинок в сроки, предшествующие массовому вылету комаров. Зимой ил достают из проруби.

Хранят личинки в течение 8—12 дней после отлова при температуре от 2 до 6 °С в закрытых низких стеклянных сосудах (например, в кристаллизаторах или в чашках Петри). На дно сосуда помещают слой песка высотой 1—2 см и наливают отстоянную водопроводную воду так, чтобы ее уровень был выше слоя песка на 1—2 мм. Личинки размещают слоем не более 1 см, покрывают сверху влажной тканью (например сукном). Личинки зарываются в осадок и в благоприятных условиях сразу же начинают строить домики.

Воду меняют ежедневно, сливая ее из сосуда и заменяя на свежую из отобранной природной воды (или на отстоянную в течение 7 сут водопроводную).

Г.6 Подготовка пробы

Из влажного осадка опытных и контрольных проб донных отложений (по 9.2) берут навески массой от 50 до 100 г (2 опытных и 2 контрольных), помещают каждую в чашку Петри так, чтобы высота слоя осадка в чашке Петри составляла 1—2 см. Для перенесения осадков используют природную воду, отобранную на том же участке, что и донные отложения. Дают осадку отстояться в течение 3 ч, после чего осторожно сливают воду декантацией. Над осадком оставляют слой воды высотой 1—3 мм (для обеспечения оптимальных условий жизнедеятельности тест-объектов).

Г.7 Выполнение биотестирования, регистрация реакций, оценка токсичности

В каждую чашку Петри помещают по 10 личинок хирономид размером 3—5 мм, закрывают чашки и сразу же начинают наблюдения за выживаемостью, развитием повреждений и поведением.

При действии токсичных химических веществ у хирономид выявляются симптомы отравления и нарушения поведенческих реакций. При проявлении ОТД у личинок *Ch. dorsalis* вначале происходит усиление двигательной активности, которое сменяется ее снижением, затем развивается паралич и наступает гибель. Перед гибелью замедляется или отсутствует реакция на внешнее воздействие (прикосновение стеклянной палочкой).

Гибель личинок устанавливают по следующим признакам. В благоприятных условиях среды личинки обычно зарываются в осадок, тогда как перед гибелью они всплывают на поверхность. Погибшими считают личинок, потерявших подвижность и не реагирующих на внешнее воздействие (прикосновение стеклян-

ной палочкой). Погибшие особи или неестественно вытянуты, или свернуты в клубок, иногда зигзагообразно изогнуты. Факт гибели можно уточнить под бинокулярным микроскопом: цвет покровов бледнеет или меняется с ярко-красного на различные оттенки зеленого, коричневого, темно-красного. Построенные в токсических условиях домики непрочные; личинки часто покидают их и погибают.

Данные наблюдений регистрируют через 30 мин, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96 ч и записывают по форме таблицы Г.1. Отклонения в поведении личинок в опыте по сравнению с контролем записывают в журнал в произвольной форме.

В длительных опытах (проявление ХТД) также наблюдаются гибель хирономид на разных стадиях метаморфоза, замедление роста, ускорение или замедление сроков окукливания и вылета имаго, появление уродливых имаго, появляются „кровоизлияния" в крыло, брюшные сегменты, конечности, антенны и другие нарушения.

В неблагоприятных условиях рост популяции замедляется, тогда как в благоприятных — популяция быстро увеличивает биомассу. Характер роста во времени отдельных особей прямолинеен. На темпы роста существенно влияет температура окружающей среды. При высоких температурах темп роста увеличивается. Например, личинка *Ch. dorsalis* при температуре 15, 20, 25 и 30 °С достигает массы тела 12 мг соответственно за 17, 15, 13 и 9 дней [18, 19].

Симптомы отравления неспецифичны и наблюдаются при воздействии различных химических веществ.

Если согласно критерию токсичности в пробах выявляется ОТД, эксперимент прекращают; если в пробах ОТД не выявляется, эксперимент продолжают для выявления возможного ХТД.

Наиболее надежными являются результаты кратковременных экспериментов (временные изменения в пробах донных отложений вследствие химических и биологических процессов минимальны, а симптомы отравления в случае ОТД более выражены и разнообразны).

Г.8 Форма представления данных биотестирования

Данные биотестирования представляют в ежегодный отчет по следующей форме.

1 Тест-объект (вид организма).

2 Место отлова.

3 Стадия развития личинок.

4 Размеры личинок.

5 Вариант биотестирования („необработанная" проба, водная вытяжка).

6 Число личинок, взятых в эксперимент.

7 Температура воздуха (диапазон колебаний в течение суток).

8 Продолжительность эксперимента.

9 Результаты биотестирования по форме таблицы Г.1.

Таблица Г.1 — Результаты биотестирования на личинках хирономид

Серия опыта	Число личинок	Погибло		Число вылетевших имаго	Сроки вылета, дни	
		личинок	куколок		50 % особей	100% особей
Опыт Контроль Отличие опыта от контроля, %						

10. Заключение о токсичности пробы донных отложений (проба донных отложений проявляет при биотестировании ОТД, ХТД или токсичность не выявлена).

Приложение Д

(справочное)

Библиография

1 Правила охраны поверхностных вод (типовые положения). — М.: Госкомприроды СССР, 1991. — 34 с.

2 Р 52.24.566—94 Рекомендации. Методы токсикологической оценки загрязнения пресноводных экосистем. — М.: Гидрометеоиздат, 1994. — 129 с.

3 РД 52.24.309—92 Методические указания. Охрана природы. Гидросфера. Организация и проведение режимных наблюдений за загрязнением поверхностных вод суши на сети Роскомгидромета. — СПб.: Гидрометеоиздат, 1992. — 67 с.

4 Комплексная оценка состояния донных отложений Рыбинского водохранилища / Б. А. Флеров, И. И. Томилина, Л. Кливленд и др. // Биология внутренних вод. — ИБВВ РАН, 2000. — № 2.

5 Томилина И. И. Эколого-токсикологическая характеристика донных отложений водоемов Северо-Запада России. Автореферат канд. дисс. Борок: ИБВВ, 2000. — 21 с.

6 Айвазова Л. Е., Гроздов А. О., Старцева А. И., Никоненко Е. М. Оценка токсичности грунтов методом биотестирования // Физиология и токсикология гидробионтов. — Ярославль, 1988. — С. 127.

7 Пристер Б. С., Дятлов С. Е., Петросян А. Г. Оценка загрязнения водоемов и водосборных площадей методами биотестирования // Тез. докл. 5-й конф. Украинского филиала ВГО „Гидробиологические исследования на Украине в XI пятилетке". — Киев, 1987. — С. 218—219.

8 Reish D. I., Oshida P. S. Manual of Methods in Aquatic Environment research. Part 10. Short-term static bioassays // FAO Fish.Techn./Pap. — 1987. — № 274. — P. 1—62.

9 Никаноров А. М., Хоружая Т. А., Бражникова Л. В., Жулидов А. В. Мониторинг качества вод: оценка токсичности. — СПб.: Гидрометеоиздат, 2000. — 159 с.

10 Зенин А. А., Белоусова Н. В. Гидрохимический словарь. — Л.: Гидрометеоиздат, 1988. — 238 с.

11 РД 118.02—90 Методическое руководство по биотестированию воды. — М.: Госкомприрода, 1991. — 47 с.

12 Строганов Н. С. Краткий словарь терминов по водной токсикологии. — Ярославль: Изд-во ЯГУ, 1982. — 43 с.

13 Федеральный Закон России „Об охране окружающей природной среды", 2002.

14 Хоружая Т. А. Оценка экологической опасности. — М.: Книга-сервис, 2002. — 208 с.

15 РД 52.24.609—99 Методические указания. Охрана природы. Гидросфера. Организация и проведение наблюдений за содержанием загрязняющих веществ в донных отложениях. — СПб.: Гидрометеоиздат, 2000. — 23 с.

16 Лесников Л. А. Методические указания по рыбохозяйственным требованиям к расчету ПДС с учетом ассимилирующей способности водоемов. — Л.: ГОСНИОРХ, 1989. — 23 с.

17 Ильин М. Н. Аквариумное рыбоводство. — М.: Изд-во МГУ, 1968. — 398 с.

18 Константинов А.С. Биология хирономид и их разведение // Тр. Саратовского отделения ВНИОРХ. — 1958. — Т. 5. — 364 с.

19 Константинов А. С. Общая гидробиология. — М.: Высшая школа, 1986. — 472 с.

Лист регистрации изменений РД 52.24.635—2002

Номер изменения	Номер листа (страницы)				Номер документа	Подпись	Дата внесения изменения	Дата введения изменения
	измененного	замещенного	нового	аннулированного				

Руководящий документ

РД 52.24.635—2002

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

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

Редактор *А К. Орлова.*
Технические редакторы *Г. А. Никитина, Я. Л. Мирончик.*
Корректор *И. А Крайнева.*

ЛР № 020228 от 10.11.96 г.

Подписано в печать 10.07.03. Формат 60 × $84^1/_{16}$. Бумага офсетная. Печать офсетная. Печ л. 2,25. Усл. печ. л. 2,09. Уч.-изд. л. 1,79. Тираж 300 экз. Индекс 219/02.

Гидрометеоиздат. 199397, Санкт-Петербург, ул. Беринга, д. 38

gost.e-ecolog.ru