МИНИСТЕРСТВО ПРИРОДНЫХ РЕСУРСОВ И ЭКОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральная служба по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды (Росгидромет)

Р Е К О М Е Н Д А Ц И И

Р 52.24.808 – 2014

ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД СУШИ МЕТОДОМ БИОТЕСТИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХЛОРОФИЛЛА *a*

Ростов-на-Дону
2014

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

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

3 СОГЛАСОВАНЫ с ФГБУ «НПО «Тайфун» 29.01.2014
УМЗА Росгидромета 04.03.2014

4 УТВЕРЖДЕНЫ Заместителем Руководителя Росгидромета 05.03.2014

ВВЕДЕНЫ В ДЕЙСТВИЕ приказом Росгидромета № 204 от 23.04.2014

5 ЗАРЕГИСТРИРОВАНЫ ФГБУ «НПО «Тайфун» за номером Р 52.24.808–2014 от 24.03.2014

6 ВВЕДЕНЫ ВПЕРВЫЕ

7 СРОК ПЕРВОЙ ПРОВЕРКИ 2019 год

© Росгидромет, ФГБУ «ГХИ», 2014

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 2
4 Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам 3
4.1 Средства измерений, вспомогательные устройства 3
4.2 Реактивы и материалы 3
5 Общие положения 4
6 Требования безопасности, охраны окружающей среды 5
7 Требования к квалификации операторов 5
8 Отбор, хранение и подготовка проб поверхностных вод суши для биотестирования 5
9 Биотест по концентрации хлорофилла *а* 5
9.1 Принцип биотеста 5
9.2 Подготовка культуры микроводорослей к биотестированию 6
9.3 Проведение биотестирования 7
9.4 Определение концентрации хлорофилла *а* 7
9.5 Определение коэффициента прироста микроводорослей 8
10 Оценка токсичности проб воды по двум тест-показателям (концентрация хлорофилла *а* и коэффициент прироста микроводорослей) 8
10.1 Расчет отклонений значений коэффициента прироста численности микроводорослей 8
10.2 Расчет отклонений значений концентрации хлорофилла *а* 9
10.3 Оценка токсичности 9
11 Оформление результатов биотестирования 10
Приложение А (справочное) Характеристики пресноводных зеленых и сине-зеленых микроводорослевых тест-объектов 11
Приложение Б (справочное) Характеристика солоноватоводных зеленых и морских диатомовых микроводорослевых тест-объектов 14
Приложение В (справочное) Питательные среды для пресноводных и солоноватоводных микроводорослей 16
Приложение Г (справочное) Значение фитопланктона в водной экосистеме и общая характеристика пигментов 18
Приложение Д (справочное) Характеристика хлорофилла *а* 20
Приложение Е (обязательное) Представление результатов оценки токсичности поверхностных вод 21
Библиография 22

Введение

Фитопланктон играет в водных экосистемах самую важную роль, поскольку является поставщиком первичной продукции. Наличие и количество пигментов, в частности хлорофилла *а,* его концентрация служит показателем состояния фитопланктона и позволяет судить и о трофности водного объекта, и о его токсичности, т.е. о качестве вод. Токсичность и трофность являются слагаемыми качества воды, определяемого биологическими методами — биоиндикацией и биотестированием.

Устойчивая взаимосвязь распределения хлорофилла *а* с гидрохимическими, гидрологическими и гидробиологическими характеристиками конкретной акватории подтверждает его широкие информационные возможности. К настоящему времени разработаны методики определения концентраций хлорофилла *а* с помощью разных растворителей. Абсолютные значения массовых концентраций хлорофилла *а,* получаемых этими методиками существенно отличаются. В этанольных вытяжках абсолютные цифры массовых концентраций хлорофилла *а* выше, поскольку происходит более полное экстрагирование пигмента. Кроме того безопасность для оператора и окружающей среды при использовании этанольных экстрактов значительно выше.

Содержание хлорофилла *а* является одной из основных функциональных характеристик природного фитопланктона пресных и солоноватых вод. В связи с этим необходимо использование экологически соответствующих тест-объектов. В данных рекомендациях изложена характеристика тест-объектов из числа микроводорослей различной систематической принадлежности: *Chlorophyta* - зеленые, *Cyanophyta* -синезеленые, *Bacillariophyta* – диатомовые, и экологических особенностей (пресноводные, солоновато-водные и морские). Приведены прописи соответствующих питательных сред и способы поддержания маточных культур микроводорослей.

Концентрация хлорофилла *а* - очень чувствительный, быстро меняющийся физиологический показатель. В то время как о стабильности популяции и прогнозе её развития можно судить только по показателю размножения. Поэтому наиболее адекватной оценкой токсичности вод служит комплекс этих показателей. В данных рекомендациях приведена шкала оценки токсичности поверхностных вод, разработанная на основе комплекса двух показателей в сочетании с экспозицией биотеста.

Использование данной методики позволяет повысить результативность исследований по наблюдению за качеством поверхностных вод суши и обеспечить экологическую безопасность исследований.

РЕКОМЕНДАЦИИ

ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД СУШИ МЕТОДОМ БИОТЕСТИРОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХЛОРОФИЛЛА а

Дата введения – 2014–12–01
Срок действия – до 2019–12–02

1 Область применения

Настоящие рекомендации устанавливают методику биотестирования с использованием хлорофилла *а* и требования к порядку проведения и оценке токсичности поверхностных вод суши в составе системы мониторинга поверхностных вод суши (далее – методика).

Методика предназначена для лабораторий, осуществляющих наблюдения за эколого-токсикологическим состоянием поверхностных вод суши в рамках государственной службы наблюдений за состоянием окружающей природной среды.

Рекомендации предназначены для использования подразделениями министерств, осуществляющих природоохранную деятельность, а также для проведения научно-исследовательских экотоксикологических и экологических работ.

2 Нормативные ссылки

В настоящих рекомендациях использованы ссылки на следующие нормативные документы:

ГОСТ Р 51592-2000 Вода. Общие требования к отбору проб

ГОСТ 17.1.04.02-90 Вода. Методика спектрофотометрического определения хлорофилла *а*

ISO 10260:1992 Качество воды. Измерение биохимических параметров. Спектрофотометрический метод определения концентрации хлорофилла а

Р 52.24.566–94 Методы токсикологической оценки загрязнения пресноводных экосистем

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

РД 52.24.784–2013 Массовая концентрация хлорофилла а. Методика измерений спектрофотометрическим методом с экстракцией этанолом

Примечание — Ссылки на остальные нормативные документы приведены в разделе 4.

3 Термины и определения

В настоящих рекомендациях использованы следующие термины и определения:

3.1**биотестирование** (**биологическое тестирование воды**): Оценка качества воды по ответным реакциям водных организмов, являющихся тест-объектами

[ГОСТ 27065-86, статья 39].

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

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

[ГОСТ 19179-73]

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

3.5 **острое токсическое действие (острая токсичность):** Воздействие, вызывающее быструю ответную реакцию тест-объекта.

Примечание - острую токсичность чаще всего определяют по тест-реакции «гибель» или «выживаемость» в условиях кратковременного биотестирования. При использовании коловраток и других организмов микрозоопланктона длительность воздействия составляет 6- 24 ч (Р 52.24.662).

3.6 **поверхностные воды;** ПВС: Воды, находящиеся на поверхности суши в виде различных водных объектов

[ГОСТ 19179-73,статья 7].

3.7 **проба воды:** Количество воды, предназначенное для исследования (Р 52.24.566).

3.8 **результат биотестирования:** Конечный вывод о токсичности водной среды, сделанный в ходе биотестирования (Р 52.24.662).

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

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

3.11 **токсичность воды:** Свойство воды вызывать развитие патологического процесса или гибель тест-объектов (Р 52.24.566).

3.12 **условно чистый участок водного объекта:** Обычно это фоновый створ (Р 52.24.566).

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

3.14 **хроническое токсическое действие (хроническая токсичность):** Воздействие, вызывающее ответную реакцию тест-объекта, проявляющуюся в течение относительно длительного периода времени.

Примечание - хроническую токсичность измеряют по тест-реакциям «выживаемость», «плодовитость», «изменение роста» и другим реакциям при длительном биотестировании (Р 52.24.566).

3.15 **экспозиция:** Период, в течение которого организм находится под воздействием исследуемого фактора, в частности химического вещества.

Примечание - в зависимости от экспозиции различают острую или хроническую токсичность.

3.16 **эталонный токсикант:** Токсическое вещество, используемое для калибровки биотеста или тест-объекта (Р 52.24.566).

4 Требования к средствам измерений, вспомогательным устройствам, материалам, реактивам

4.1 Средства измерений, вспомогательные устройства

4.1.1 Микроскоп любого типа по ГОСТ 8074-82.

4.1.2 Устройство фильтрующее с воронками типа Зейтца под фильтры диаметром 35 мм.

4.1.3 Камера Горяева по ТУ 64-1-816-77.

4.1.4 Пипетки градуированные по ГОСТ 29230-91.

4.1.5 Колба мерная исполнения 2, по ГОСТ 1770-74 вместимостью 250 $см^3$ - 6 шт.

4.1.6 Газ мельничный № 70- № 74.

4.1.7 Насос вакуумный ручной.

4.1.8 Стаканы вместимостью 600 $см^3$ по ГОСТ 25336-82.

4.2 Реактивы и материалы

4.2.1 Калий двухромово-кислый по ГОСТ 4220-75.

4.2.2 Питательная среда для микроводорослей.

4.2.3 Вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72.

4.2.4 Фильтры мембранные «Владипор МФАС-ОС-2», 0,35 мм по ТУ 6-55-221-1-29-89 или другого типа, равноценного по характеристикам.

4.2.5 Культура одноклеточных пресноводных зеленых микроводорослей родов *Scenedesmus* или *Chlorella* или сине-зеленых *Synechocystis* и морских микроводорослей родов *Dunaliella*, *Phaeodactilum.*

Примечание — Допускается использование реактивов, изготовленных по другой нормативно-технической документации, в том числе импортных с квалификацией не ниже указанной в 4.2.

5 Общие положения

5.1 Методику биотестирования по концентрации хлорофилла *а* применяют при использовании в биотестировании автотрофных тест-объектов, в частности:

- для оценки токсичности поверхностных вод суши используют тест-объекты из числа пресноводных зеленых *Scenedesmus obliquus (Turp.) Kutz, Chlorella vulgaris Beijer* и сине-зеленых Synechocystis sp. микроводорослей;
- для оценки токсичности водоемов различной солености и зон смешения речных и морских вод используют тест-объекты из числа солоновато-водных микроводорослей *Dunaliella salina Teod.* и *Phaeodactilum tricornutum;*
- для оценки как острой, так и хронической токсичности.

5.2 Тест-показатель «концентрация хлорофилла *а*» используют в комплексе с тест-показателем «коэффициент прироста микроводорослей» в зависимости от экспозиции.

5.3 Длительность биотестирования (продолжительность экспозиции) зависит от цели исследования:

- острую токсичность определяют за 24 ч.
- хроническую токсичность – за 96 ч.

5.4 Биотестирование ПВС проводят в режимных наблюдениях и для решения оперативных задач с целью проверки соответствия качества вод отдельных проб установленным нормам.

В режимных наблюдениях на основе систематических данных биотестирования оценивают токсическое состояние водных объектов или их участков.

В ходе решения оперативных задач оценивают токсичность отдельных проб воды с целью выяснения чрезвычайных экологических ситуаций.

5.5 В принятом на сегодняшний день перечне нормирования показателей качества вод указано: вода контрольного створа (фоновый створ) не должна оказывать хронической токсичности и тем более острой на тест-объекты, используемые для биотестирования.

5.6 В ходе биотестирования ПВС устанавливают отсутствие или наличие токсичности (острой, хронической) испытываемой пробы для тест-объектов, без идентификации загрязняющих веществ и их количественных характеристик.

5.7 Контролем служит вода из контрольного (фонового) условно чистого участка водного объекта или дехлорированная водопроводная вода региона исследования, используемая для содержания маточных культур тест-объектов.

5.8 Биотестирование проводят в трехкратной повторности.

6 Требования безопасности, охраны окружающей среды

При выполнении работ следует соблюдать общие требования к технике безопасности работ на водных объектах и в химических лабораториях.

Особых требований по экологической безопасности нет.

7 Требования к квалификации операторов

К выполнению экспериментальных работ методами биотестирования допускают лиц, имеющих биологическое, экологическое образование и знакомых с основами водной токсикологии и методами полевых и лабораторных гидробиологических исследований.

8 Отбор, хранение и подготовка проб поверхностных вод суши для биотестирования

8.1 Пробы ПВС отбирают с учетом требований ГОСТ Р 51592 и Р 52.24.566. Объем пробы должен быть не менее 500 $см^3$.

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

8.3 Перед заполнением сосудов воду фильтруют через мельничный газ № 70-№ 74 (для удаления природного планктона) и несколько раз ополаскивают сосуд. Заполняют водой полностью.

8.4 Анализ проб воды по определению токсичности проводят не позднее 6 ч после отбора проб. В случае невозможности проведения исследований в срок, указанный в 5.3, пробы охлаждают до 4 °С или замораживают согласно ГОСТ Р 51592 и хранят до 30 сут. Консервирование проб химическими веществами не допускается.

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

9 Биотест по концентрации хлорофилла *а*

9.1 Принцип биотеста

9.1.1 Метод основан на определении изменения концентрации хлорофилла *а* под влиянием испытываемой воды, отобранной из водоемов, водотоков и зон смешения морских и пресных вод, на лабораторные культуры микроводорослей экологически соответствующих тест-объектов: пресноводных зеленых *Scenedesmus obliquus, Chlorella vul-*

garis, сине-зеленых Synechocystis *aquatilis* или морских зеленых *Dunaliella salina* и диатомовых *Phaeodactilum tricornutum.*

Влияние испытываемой воды оценивают по отклонению значений концентрации хлорофилла *а* при экспозиции в испытываемой воде по сравнению с контролем.

Показателем содержания хлорофилла *а* служит концентрация хлорофилла *а,* мкг/л, в культуре микроводорослей. Показателем интенсивности размножения - коэффициент прироста численности клеток микроводорослей.

Острую и хроническую токсичность пробы ПВС (поскольку пересев на новую воду невозможен) устанавливают в ходе одного биотеста (непрерывное биотестирование) в зависимости от времени проявления токсического эффекта. Острую токсичность устанавливают за время экспозиции 24 ч (за это время появляется 6-8 поколений микроводорослей), хроническую – за 96 ч.

Критерием токсичности является отклонение концентрации хлорофилла *а* на 50% от контроля. Отклонение в сторону уменьшения, равное - 50% и более, свидетельствует об угнетающем действии испытываемой воды на микроводоросли. Отклонение значений в сторону увеличения, равное +50% и более, косвенно свидетельствует о наличии в испытываемой воде веществ, стимулирующих рост микроводорослей, например, фосфора или органических веществ.

При установлении острой токсичности по 10.3 биотестирование прекращают.

При отсутствии острой токсичности биотестирование продолжают, чтобы установить возможную хроническую токсичность (длительное биотестирование, 96 ч).

9.1.2 Характеристики используемых видов микроводорослей, условия их поддержания, состав питательных сред приведены в приложениях А, Б, В, значение фитопланктона в водной экосистеме и характеристика пигментов – в приложении Г, характеристика хлорофилла *а* и методы его определения – в приложении Д.

9.2 Подготовка культуры микроводорослей к биотестированию

Для эксперимента используют культуру микроводорослей, находящуюся в стадии экспоненциального роста. Перед биотестированием ее концентрируют, фильтруя через мембранный фильтр. С фильтра водоросли смывают профильтрованной водой в емкость вместимостью 500 $см^3$. Клетки водорослей можно сконцентрировать путем отстаивания культуры водорослей. Численность клеток в суспензии, которую используют в эксперименте, должна составлять от 5 до 10 млн. кл./ $см^3$.

Перед экспериментом проверяют чувствительность культуры микроводорослей воздействием эталонного токсиканта. В качестве эталонного токсиканта используют калий двухромовокислый. Критерием при-

годности культуры к биотестированию является величина LC_{50} в диапазоне концентраций от 0,4 до 0,9 мг/дм^3 калия двухромовокислого за 96 ч экспозиции, т.е. в пределах таких диапазонов концентраций эталонных токсикантов происходит гибель 50 % клеток микроводорослей.

В исходную (маточную) культуру микроводорослей вносят 0,1 см^3 каждого питательного солевого раствора в соответствии с таблицей Д.1 (приложение Д) для пресноводных и с таблицей Д.2 (приложение Д) – для солоноватоводных микроводорослей.

9.3 Проведение биотестирования

9.3.1 Биотестирование проводят в нестерильных условиях при оптимальной температуре (20±2) ^{0}С и освещении от 2000 до 3000 лк с естественной сменой дня и ночи в помещениях без вредных испарений.

9.3.2 Испытываемую воду предварительно фильтруют через мельничный газ № 70 - № 74 для удаления природного зоопланктона.

9.3.3 В 3 колбы вместимостью 500 см^3 добавляют по 250 см^3 испытываемой воды, в 3 контрольные колбы вместимостью 500 см^3 добавляют 250 см^3 выбранный контроль.

9.3.4 В каждую колбу пипеткой вносят от 0,5 до 1,0 см^3 сконцентрированной исходной (маточной) культуры микроводорослей.

9.3.5 Колбы закрывают ватно-марлевыми пробками, содержимое тщательно перемешивают и в каждой колбе определяют исходную численность клеток N_o, которая должна составлять от 250 до 300 тыс. кл./см^3.

9.3.6 Колбы располагают в помещении при естественном освещении (избегая прямых солнечных лучей).

9.3.7 Для определения острой токсичности через 24 ч в каждой колбе:

- подсчитывают численность клеток для установления прироста микроводорослей;
- отбирают 100 см^3 среды для определения концентрации хлорофилла *а.*

9.3.8 В случае отсутствия острой токсичности через 96 ч для установления хронической токсичности в каждой колбе проводят действия по 9.3.7.

9.3.9 В течение эксперимента ежедневно тщательно перемешивают содержимое колб.

9.4 Определение концентрации хлорофилла *а*

Определение и расчет концентраций хлорофилла *а,* а также исходной концентрации хлорофилла *а,* проводят либо в ацетоновых вытяжках по ГОСТ 17.1.04.02 или [2], либо в этанольной вытяжке по ISO 10260:1992 или РД 52.24.784.

Наилучшее экстрагирование хлорофилла *а* происходит при использовании этанола.

9.5 Определение коэффициента прироста микроводорослей

9.5.1 Подсчет численности клеток микроводорослей осуществляют в камере Горяева, Фукс-Розенталя, т.е. в любой камере, предназначенной для подсчета форменных элементов крови. Объем камеры Горяева представляет собой сетку из 25 маленьких квадратов, составляющих объем 0,0001 $см^3$. Микроводоросли помещают под стекло в камеру, просчитывают 25 маленьких квадратов, полученную сумму умножают на 10^4 и получают число клеток в 1 $см^3$ суспензии.

При подсчете клеток в камере необходимо соблюдать следующие правила:

- взятую в пипетку каплю очень быстро наносят на поверхность сетки камеры, пока клетки микроводорослей не успели осесть в нижней части пипетки;
- нанесенную на поверхность сетки каплю быстро накрывают покровным стеклом и притирают во избежание оседания клеток из капли, большей по объему, чем капля в камере после притирания стекла;
- просчитывают клетки в трех камерах и берут среднее значение.

9.5.2 Коэффициент прироста численности клеток микроводорослей в контрольной и опытной сериях К, отн. ед., рассчитывают по формуле

$$K = N_t/N_o, \quad (1)$$

где N_t – численность клеток микроводорослей в контроле или в испытываемой воде через учитываемый промежуток времени, тыс. кл/$см^3$;

N_o – исходная численность клеток микроводорослей, тыс. кл/ $см^3$.

9.5.3 Для каждой из трех повторностей рассчитывают свой коэффициент прироста численности клеток микроводорослей. Значение коэффициента прироста численности клеток микроводорослей для каждой серии (опытной и контрольной) представляет собой среднее арифметическое из значений трех полученных коэффициентов.

10 Оценка токсичности проб воды по двум тест-показателям (концентрация хлорофилла *а* и коэффициент прироста микроводорослей)

Первоначально рассчитывают отклонения значений коэффициента прироста микроводорослей опытных вариантов от контроля. В случае отклонения коэффициента прироста численности микроводорослей на 50 % и более концентрацию хлорофилла *а* не определяют.

10.1 Расчет отклонений значений коэффициента прироста численности микроводорослей

10.1.1 Отклонение коэффициента прироста численности клеток микроводорослей $К_{пр}$, %, рассчитывают по формуле

$$К_{пр}=[(К_{оп}-К_{конт})/К_{конт}]\cdot 100\ \%, \quad (2)$$

где $К_{оп}$ – коэффициент прироста численности клеток микроводорослей в испытываемой воде;

$К_{конт}$ – коэффициент прироста численности клеток микроводорослей в контроле.

10.1.2 Значения отклонений прироста численности микроводорослей в сериях с испытываемой водой от контроля могут иметь знаки плюс или минус.

Отклонение значений в сторону увеличения свидетельствует о наличии стимулирующего эффекта испытываемой воды на автотрофные тест-объекты, что косвенно свидетельствует о наличии органических веществ в водном объекте.

Отклонение значений в сторону уменьшения свидетельствует об угнетающем действии на автотрофные тест-объекты.

10.2 Расчет отклонений значений концентрации хлорофилла а

10.2.1 Отклонение полученных значений концентраций хлорофилла *а* от контроля $К_{хл}$, %, рассчитывают по формуле

$$К_{хл}=[(Х_{оп}-Х_{конт})/Х_{конт}]\cdot 100, \quad (3)$$

где $Х_{оп}$ – концентрация хлорофилла *а* микроводорослей в испытываемой воде;

$Х_{конт}$ – концентрация хлорофилла *а* микроводорослей в контроле.

10.2.2 Значения отклонений концентраций хлорофилла *а* в опытных сериях от контроля могут иметь знаки плюс или минус.

Отклонение значений в сторону увеличения свидетельствует о наличии стимулирующего эффекта испытываемой воды на автотрофные тест-объекты, что косвенно свидетельствует о наличии органических веществ в водном объекте.

Отклонение значений в сторону уменьшения свидетельствует об угнетающем действии на автотрофные тест-объекты.

10.3 Оценка токсичности

Оценку токсичности испытываемой пробы воды проводят по комплексу двух показателей (концентрация хлорофилла *а* и коэффициент прироста численности клеток микроводорослей) в зависимости от экспозиции согласно шкале (таблица 1). Оценивают токсичность проб воды по характеру токсического действия, которое оказывает испытыва-

емая проба воды. Словесно выражают: проба «оказывает или не оказывает острую (или хроническую) токсичность».

Таблица 1 - Шкала оценки токсичности вод по комплексу двух показателей в сочетании со временем

Экспозиция, ч	Коэффициент прироста численности микроводорослей, отклонение от контроля, %	Концентрация хлорофилла *а* отклонение от контроля, %	Токсическое действие
24	От 0 до 25 включ.	От 0 до 50 включ.	Нет ОТД
		Св. 50	ОТД
	Св. 25	От 0 до 50 включ.	
		Св. 50	
96	От 0 до 25 включ.	От 0 до 50 включ.	Нет ХТД
		Св. 50	ХТД
	Св. 25	От 0 до 50 включ.	
		Св. 50	
Примечание – ОТД- острое токсическое действие; ХТД- хроническое токсическое действие.			

11 Оформление результатов биотестирования

Результаты биотестирования представляют в соответствии с приложением Е.

Приложение А
(справочное)

Характеристики пресноводных зеленых и сине-зеленых микроводорослевых тест-объектов

А. 1 Характеристика тест-объекта *Scenedesmus obliquus (Turp.) Kutz*

А.1.1 Систематическое положение

Отдел	*Chlorophyta*
Класс	*Euchlorophyceae*
Порядок	*Chlorococcales*
Семейство	*Scenedesmaceae*
Подсемейство	*Scenedesmoideae*
Род	*Scenedesmus Mayen*
Вид	*S. obliquus (Turp.) Kutz*

А.1.2 Местообитание

Scenedesmus obliquus – широко распространённый в пресных поверхностных водах вид зеленых водорослей. Встречается главным образом в планктоне.

А.1.3 Морфология, биология

Данный вид относится к ценобиальным организмам. Ценобии – организмы имеющие вид плоских пластинок и состоящие из 2, 4, реже 8 и 16 клеток. Клетки удлиненно-овальные, с закругленными концами. Оболочка гладкая. Размеры клеток 7-45 х 2,5-16,0 мкм.

Размножается автоспорами. Автоспоры в материнской оболочке располагаются пучком, после освобождения разворачиваются в виде пластинки. В условиях культуры иногда вместо ценобиев образуются отдельные клетки.

А.1.4 Содержание в лабораторных условиях

Колбы для культивирования водорослей желательно стерилизовать сухим паром в течение 1 ч при 180 ^{0}С. Культуру водорослей вносят для посева в стеклянную колбу с питательной средой в количестве, дающем светло-зеленое окрашивание. Рецепт (состав) питательных сред приведен в приложении Е. Колбы закрывают стерильными ватно-марлевыми пробками или колпачками из пергаментной бумаги. Водоросли культивируют в плоскодонных колбах или аквариумах при круглосуточном освещении лампами дневного света мощностью 240 Вт/м^2, размещенными на расстоянии от 30 до 40 см от поверхности культуры. Водоросли можно выращивать при естественном освещении, защищая

от прямых солнечных лучей. Культуру водорослей периодически перемешивают, встряхивая 3-5 раз в сутки. Оптимальная температура для выращивания водорослей 18-23 °С. Подкормку водорослей производят через каждые 10-14 дней. Пересеивать культуру водорослей можно через 2-4 недели.

А.2 Характеристика тест-объекта *Chlorella vulgaris Beijer*

А.2.1 Систематическое положение

Отдел	*Chlorophyta*
Класс	*Euchlorophyceae*
Порядок	*Chlorococcales*
Семейство	*Chlorellaceae*
Подсемейство	*Chlorelloideae*
Род	*Chlorella Beijer*
Вид	*Chlorella vulgaris Beijer*

А.2.2 Местообитание

Chlorella vulgaris – широко распространенный вид зеленых водорослей, обитающих в различных биотопах пресноводных экосистем.

А.2.3 Морфология, биология

Chlorella vulgaris относится к одноклеточным водорослям. Клетки шаровидные, с тонкой оболочкой, без слизи. Хроматофор чашевидный, с пиреноидом. Размножается автоспорами, которые образуются по 4-8, реже по 16 штук, и освобождаются через разрыв в материнской оболочке. Диаметр клеток от 4,2 до10,5 мкм.

А.2.4 Содержание в лабораторных условиях

Содержание в лабораторных условиях аналогично А.1.4.

А.3 Характеристика тест-объекта *Synechocystis aquatilis Sauv*

А.3.1 Систематическое положение

Отдел	*Cyanophyta*
Класс	*Chroococceae*
Порядок	*Chroococcales*
Семейство	*Coccobactreaceae*
Род	*Synechocystis*
Вид	*Synechocystis aquatilis Sauv*

А.3.2 Местообитание

Пресноводные или эндофитные (живущие в слизи других водорослей) сине-зелёные. Водоросль встречается в водоемах России. Обитает в стоячих водоемах, на коре стволов, на влажных скалах, на почве, в иле. Лучшее время сбора — лето.

А.3.3 Морфология, биология

Одноклеточная сине-зеленая микроводоросль, не образующая слоевища. Клетки шаровидные, мелкие, с тонкой оболочкой, одиночные или после деления соединенные попарно, от бледных до ярких сине-зеленых, иногда желтоватые или зеленоватые. Диаметр клеток составляет от 4,5 до 6,0 мкм. Размножение без исключения делением клеток. Питается фототрофно. Размножается делением клетки пополам.

А.3.4 Содержание в лабораторных условиях

Содержание в лабораторных условиях аналогично А.1.4.

Приложение Б
(справочное)

Характеристика солоноватоводных зеленых и морских диатомовых микроводорослевых тест-объектов

Б.1 Характеристика тест-объекта *Dunaliella salina Teod*

Б.1.1 Систематическое положение

Отдел	*Chlorophyta*
Класс	*Euchlorophyceae*
Порядок	*Volvocales*
Семейство	*Polyblepharidaceae*
Род	*Dunaliella Teod.*
Вид	*Dunaliella salina Teod.*

Б.1.2 Местообитание

Род дуналиелла распространен на всех шести континентах Земного шара, включая Антарктиду. *Dunaliella salina* является солоноватоводной микроводорослью, обитающей при солёности 30 ‰ и более. Широко представлена в соленых озерах, морях. Дуналиелла является важным звеном ряда водных биоценозов. Галобионтные водоросли, в том числе дуналиелла – необходимый элемент питания ракообразных.

Б.1.3 Морфология, биология

Dunaliella salina относится к одноклеточным водорослям. Клетки без обособленной оболочки, размножающиеся в подвижном состоянии продольным делением на две клетки эллиптические или яйцевидные без продольных ребер, не сплюснуты. Хроматофор процельный с пиреноидом. Пульсирующих вакуолей нет. Жгутов два. Организмы красноватые от присутствия гематохрома. Вызывает окраску воды и кристаллизующейся соли.

Б.1.4 Культивирование

Для культивирования дуналиеллы используется среда в разбавлении отстоянной дехлорированной водой 1:3. Температура культивирования составляет (24±2) ^{0}С, освещение от 1000 до 2000 лк, продувка углекислым газом. Культуру фильтруют и обновляют на 1/3 каждые 10 сут. Для сохранения музейной культуры используют агаризованную питательную среду (0,6 % агар-агара), после высева ее помещают в люминостат при температуре 5 ^{0}С, пересев производят через каждые два месяца.

Для подсчета клеток дуналиеллы их необходимо обездвижить, например, нагревом счетной камеры на спиртовке.

Б.2 Характеристика тест-объекта Phaeodactylum tricornutum Boohl

Б.2.1 Систематическое положение

Отдел	*Bacillariophyta*
Порядок	*Naviculales*
Семейство	*Phaeodactylaceae*
Род	*Phaeodactylum*
Вид	*P. tricornutum Boohl.*

Phaeodactylum tricornutum относится к диатомовым водорослям. Это единственный вид в роде *Phaeodactylum.*

Б.2.2 Местообитание

Phaeodactylum tricornutum Boohl. – супралиторальная пеннатная диатомовая водоросль. Эти водоросли являются одними из наиболее чувствительных к загрязнению. История их культивирования насчитывает 80 лет, но до 60-х годов она была известна под названием *Nitzschia closterium* f. *Minutissima* (ницшия). В отечественной марикультуре феодактилум (ницшию) применяют для выкармливания молоди устриц, артемии, коловраток.

Б.2.3 Морфология, биология

Phaeodactylum tricornutum - вид, наиболее хорошо поддающимся культивированию в лабораторных условиях. Феодактилум одноклеточная микроводоросль имеет несколько морфологических форм: веретеновидную, трехлучевую, крестообразную и овальную. Настоящий кремневый скелет и четко выраженная потребность в кремнии наблюдается только у овальной формы. Переход от одной формы в другую связан с условиями культивирования, но точные условия до конца не ясны. Размеры трехлучевой составляет от 12 до 15 мкм, веретеновидной – от 20 до 30 мкм. Темп деления 2-3 раза в сутки.

Б.2.4 Получение и культивирование

Выделяют *Phaeodactylum tricornutum* из природной морской воды. Пробы воды отбирают вдали от берега, затем ее вносят в колбы вместимостью 300 мл, в которые предварительно налита питательная среда, приготовленная согласно таблице В.3 (приложение В). Через 15 дней в большинстве колб водоросли начинают расти. Содержимое колб просматривают и отбирают отличающиеся наиболее интенсивным ростом организмы. В дальнейшем посредством частых пересевов выделяют монокультуры отдельных видов водорослей.

Культивирование феодактилум в лабораторных условиях осуществляют в колбах вместимостью 300 мл при температуре (20±2) ^{0}С и естественном освещении, избегая прямых солнечных лучей, либо при искусственном освещении 2000 лк (лампы дневного света на высоте 60 см от колб) в люминостате. Пересевать культуру водорослей необходимо один раз в 10 дней в простерилизованную колбу со свежей средой. Пересев необходимо осуществлять над пламенем спиртовки.

Приложение В
(справочное)

Питательные среды для пресноводных и солоноватоводных микроводорослей

В.1 Питательные среды для пресноводных зеленых микроводорослей

Культуры *Scenedesmus obliquus* и *Chlorella vulgaris* имеются в Государственных университетах Москвы, Санкт-Петербурга, ФГБУ «ГХИ» и др.

Зеленые пресноводные микроводоросли выращивают на одной из искусственных питательных сред, состав которых приведен в таблице В.1, и добавляемых в питательную среду микроэлементов (магния, цинка, молибдена, ванадия, меди), состав соединений которых приведен в таблице В.2.

Таблица В.1 – Состав искусственных питательных сред

Наименование реактива	Наименование среды			
	Тамия	Мейерса	Успенского	Прата
	Концентрация растворов реактивов, г/дм^3			
Калий азотнокислый	5,000	1,2130	0,0250	0,100
Магния сульфат 7-водный	2,500	1,2040	0,0250	0,010
Калия дигидрофосфат	1,250	1,2240	0,0250	0,010
Железа сульфат 7-водный	0,003	-	-	-
Сульфат железа (III)	-	0,0747	-	-
Калия карбонат	-	-	0,0345	-
Кальция нитрат	-	-	0,1000	-
Железо хлорное 6-водное	-	-	-	0,001

Таблица В.2 – Состав раствора микроэлементов, добавляемых в питательную среду

Наименование соединения	Добавляемый раствор	
	Концентрация, г/дм^3	Объем раствора, см^3, добавляемого в 1дм^3 воды
Кислота борная	2,860	1,0
Хлорид магния 4-х-водный	81,000	
Сульфат цинка	0,125	
Молибдена триоксид	0,017	
Аммоний ванадиевокислый	0,023	
Сульфат цинка	100,000	0,3
Кислота борная	100,000	
Магния сульфат	150,000	
Меди сульфат 5-водный	3,000	

Питательные среды готовят на дистиллированной воде или кипяченой водопроводной воде. Навеску каждого вещества растворяют в небольшом количестве воды, а затем растворы сливают вместе и доводят их объем до 1 дм^3.

Среды Мейерса и Тамия перед внесением водорослей разбавляют в 3-5 раз.

Культуру водорослей вносят в среду до тех пор, пока не приобретет видимую светло-зеленую окраску. Колбу закрывают ватно-марлевой пробкой.

Пересевать их можно через 2-3 недели или через месяц.

В. 2 Питательные среды для солоноватоводных и морских микроводорослей

Морские одноклеточные микроводоросли выращивают на среде Гольдберга в модификации Кабановой, состав которой приведен в таблице В.3.

Таблица В.3 – Состав питательной среды Гольберга в модификации Кабановой

Наименование реактива	Навеска реактива в 100 см^3 дистиллированной воды, г	Объём раствора, см^3, добавляемого в 1 дм^3 морской воды
Калий азотнокислый	10,10000	2,0
Калия дигидрофосфат	1,42100	0,5
Марганца хлорид 4-водный	0,01979	1,0
Кобальта хлорид 4- водный	0,02379	–
Железо хлорное 6-водное	0,02703	1,0

Для приготовления питательной среды Гольдберга морскую воду отбирают на условно чистом участке, фильтруют через двойной бумажный или мембранный фильтр № 4, дважды стерилизуют, нагревая на водяной бане до 75 ^{0}С, и охлаждают до комнатной температуры. В подготовленную таким образом морскую воду последовательно добавляют питательные вещества из четырех заранее приготовленных растворов (см. таблицу В.3). В морскую воду объемом 1 дм^3 вносят 2 см^3 раствора № 1, 0,5 см^3 раствора № 2 и 1 см^3 раствора № 3, затем среду стерилизуют третий раз, охлаждают и только тогда добавляют 1 см^3 раствора № 4, чтобы не образовывался осадок гидроокиси железа. Полученный раствор аэрируют.

Вместо природной морской воды можно использовать искусственную морскую воду или водный раствор профессиональный морской соли (Wiegandt, производство Германия).

Приложение Г
(справочное)

Значение фитопланктона в водной экосистеме и общая характеристика пигментов

Г.1 Фитопланктон имеет большое значение в жизни водоемов, поскольку является основным продуцентом органического вещества в поверхностном слое воды (в пределах фотической зоны – зоны, где активно происходит фотосинтез). Фитопланктон - один из наиболее важных компонентов водных экосистем, жизнедеятельность которого определяет функционирование других организмов, и способствует самоочищению воды. Именно водорослям принадлежит главная роль в образовании органического вещества в водоемах, а также они определяют биологическую продуктивность и качество воды. Водоросли наиболее быстро реагируют на изменение условий среды и играют ведущую роль в процессах самоочищения водоемов. Это первое звено трофической (питательной) цепи водоемов.

При экологическом мониторинге пресноводных водоемов большое внимание уделяется обилию фитопланктона – основного продуцента первичного органического вещества. При развитии водорослей до степени “цветения” воды оценка обилия фитопланктона становится особенно актуальной. Однако исследования структуры фитопланктона сопряжены с трудностями количественного и качественного учета водорослей, требующего больших затрат времени и хороших знаний таксономии. Применение косвенных методов оценки развития фитопланктона, в частности спектрофотометрического определения пигментов в сестоне, получило широкое распространение с середины прошлого столетия. Исследователей привлекает доступность и быстрота определения пигментов, поэтому во многих гидробиологических работах принято выражать обилие водорослей количеством хлорофилла *а*.

Одноклеточные водоросли являются одними из наиболее распространенных организмов водной среды. К ним относятся представители различных систематических групп: диатомовые, перидиниевые, желто-зеленые, зеленые, протококковые. Наиболее представительными в морских водоемах являются диатомовые и перидиниевые, в пресноводных – хлорококковые микроводоросли. В силу своих физиологических особенностей одноклеточные водоросли являются наиболее чувствительными к изменениям внешней среды. Короткий цикл развития позволяет проследить на нескольких поколениях действие загрязняющих веществ. Одноклеточные водоросли используются для биотестирования широкого класса веществ (тяжелые металлы, хлор- и фосфорорганические соединения, поверхностно-активные вещества, де-

тергенты), сточных вод различных отраслей народного хозяйства, загрязненных природных вод и грунтов, предназначенных к дампингу.

В водной токсикологии могут быть использованы виды, нашедшие применение в практике аква- марикультуры. Так, из зеленых микроводорослей чаще всего используют *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus,* из диатомовых микроводорослей - *Thalassiosira pseudonana*, *Phaeodactylum tricornutum, Sceletonema costatum*, различные виды *Chaetoceros.*

Г.2 Пигменты фитопланктона можно разделить на две основные группы:

1) хлорофиллы*;*

2) каротиноиды.

Наибольший интерес представляет первая группа пигментов. Основным по количественному содержанию в клетках фитопланктона и лучшим показателем его фотосинтетической активности является хлорофилл *а*. Содержание хлорофилла *а* в планктоне показывает хорошее соответствие с трофическим статусом водоемов. На основании ряда исследований были установлены концентрации хлорофилла *а*, мкг/л, характерные для основных трофических типов водоемов:

- 0,1-1,0 для олиготрофных;
- 1,0-10,0 для мезотрофных;
- более 10,0 для эвтрофных водоемов.

В настоящее время содержание хлорофилла *а* широко используется для оценки степени эвтрофикации и интенсивности самоочищения вод.

Приложение Д
(справочное)

Характеристика хлорофилла *а*

Хлорофилл *а* (от греч. chlorós – зелёный и phýllon – лист), зелёный пигмент растений, с помощью которого они улавливают энергию солнечного света и осуществляют фотосинтез. Локализован в особых клеточных структурах – хлоропластах или хроматофорах и связан с белками и липидами мембран. Основу структуры молекулы хлорофилла а, составляет магниевый комплекс порфиринового цикла; в IV пирольном кольце к остатку пропионовой кислоты присоединён высокомолекулярный спирт фитол, который придаёт хлорофиллу способность встраиваться в липидный слой мембран хлоропластов.

По своему строению хлорофилл *а* близок к другим природным комплексам порфиринов (с железом) – дыхательным пигментам – цитохромам, красящему веществу крови — гему, а также простетическим группам некоторых ферментов – пероксидазы, каталазы.

По химическому составу хлорофилл представляет сложный эфир дикарбоновой кислоты хлорофинилла. Хлорофинилл - это азотосодержащее металлоорганическое соединение, относящееся к магний-порфиринам. В центре молекулы хлорофилла расположен атом магния, соединённый с четырьмя азотами пиррольных группировок. В этих группировках хлорофилла имеется система чередующихся двойных и простых связей. Это и есть хромофорная группа хлорофилла, обуславливающая его окраску.

Приложение Е
(обязательное)

Представление результатов оценки токсичности поверхностных вод

Результаты биотестирования представляют согласно таблицам Е.1- Е.3.

Таблица Е.1 - Результаты биотестирования с использованием показателя коэффициента прироста микроводорослей

Номер пробы	Дата отбора	Водный объект	Серия	Время от начала биотестир., сутки	Коэффициент прироста				Оценка токсичности
					повторность			среднее арифм.	
					1	2	3		

Таблица Е.2 - Результаты биотестирования с использованием показателя концентрации хлорофилла *а* в культуре водорослей

Номер мер-пробы	Дата отбора	Водный объект	D_{665}	D_{750}	D^{K}_{665}	D^{K}_{750}	$C_{хл.\,а}$, мкг/л	Оценка токсичности

Таблица Е.3 - Результаты биотестирования с использованием двух показателей в культуре водорослей

Номер пробы	Дата отбора	Водный объект	Оценка токсичности

Библиография

[1] Зенин А.А., Белоусова Н.В., Гидрохимический словарь.-Л.: Гидрометеоиздат, 1988. - 238с.

[2] Руководство по методам гидробиологического анализа поверхностных вод и донных отложений/ Под ред. Абакумова В.А. Л.: Гидрометеоиздат, 1983.- 239с.

Лист регистрации изменений

Номер изме-нения	Номер страницы				Номер документа (ОРН)	Подпись	Дата	
	измененной	замененной	новой	аннули-рованной			внесения изменения	введения изменения

gost.e-ecolog.ru