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

РЕКОМЕНДАЦИИ

Р 52.24.809–2014

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ТОКСИЧЕСКОГО ВЛИЯНИЯ ФИТОЦЕНОЗОВ ПЛАНКТОНА НА ФОРМИРОВАНИЕ КАЧЕСТВА ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД СУШИ

Ростов-на-Дону
2014

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

2 РАЗРАБОТЧИКИ Т.А. Хоружая, д-р биол. наук; Н.А. Мартышева, Е.Б. Юрасова

3 СОГЛАСОВАНЫ с Федеральным государственным бюджетным учреждением «Научно-производственное объединение «Тайфун» (ФГБУ «НПО «Тайфун») 27.02.2014 и Управлением мониторинга загрязнения окружающей среды (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» от 24.03.2014 за номером Р 52.24.809–2014

6 ВВЕДЕНЫ ВПЕРВЫЕ

7 СРОК ПЕРВОЙ ПРОВЕРКИ 2019 год

© Росгидромет, ФГБУ «ГХИ», 2014

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины, определения и сокращения 2
4 Общие положения 5
5 Принцип оценки токсического влияния фитоценозов на формирование качества ПВС 6
6 Требования, порядок и условия выполнения работ по оценке токсического влияния фитоценозов планктона на формирование качества ПВС 6
7 Подготовка к выполнению измерений 8
7.1 Подготовка посуды для отбора, хранения проб и проведения биотестирования 8
7.2 Отбор, транспортировка и хранение проб 8
8 Требования к квалификации операторов 9
9 Биоиндикация 10
10 Биотестирование токсичности воды 11
10.1 Общие положения 12
10.2 Биотестирование проб воды на дафниях 12
10.3 Биотестирование проб воды на водорослях 13
10.4 Биотестирование на рыбах 16
11 Биотестирование проб биомассы водорослей 16
11.1 Принцип метода 16
11.2 Отбор, подготовка проб и проведение биотестирования 16
11.3 Приготовление разбавлений фильтрата биомассы водорослей 19
11.4 Пример выполнения работ с биомассой водорослей 19
12 Оценка токсического влияния фитоценоза на формирование качества ПВС 20
Приложение А (справочное) Синезеленые водоросли и их токсины 23
Приложение Б (обязательное) Форма записи характеристик пробы природной воды и условий отбора 25
Приложение В (обязательное) Форма записи результатов биоиндикации по фитопланктону 26
Приложение Г (справочное) Содержание культуры водорослей в лабораторных условиях 27
Приложение Д (обязательное) Форма записи данных биотестирования 28
Приложение Е (обязательное) Форма заключения о влиянии фитоценоза на качество воды 30
Приложение Ж (рекомендуемое) Пример выполнения работ по оценке токсического влияния фитоценозов планктона на формирование качества ПВС 31
Библиография 37

Введение

Одной из проблем, создающих трудности рационального использования водных ресурсов является эвтрофирование - повышение биологической продуктивности водных объектов в результате накопления в воде биогенных веществ: соединений азота, фосфора, кремния, железа и некоторых микроэлементов. Следствием эвтрофирования является цветение - массовое развитие фитопланктона, чаще всего с преобладанием синезеленых водорослей. Оно приводит к ухудшению качества воды и представляет опасность для функционирования водной экосистемы. Масштабы эвтрофирования растут, и оно приобретает глобальный характер. Если глобальное потепление климата станет реальностью, то ситуация с эвтрофированием ухудшится. Многочисленные попытки борьбы с цветением и разработки мер по улучшению качества воды эвтрофных водоемов, особенно крупных водохранилищ, пока не увенчались успехом.

Негативные влияния цветения синезеленых водорослей и их токсинов на пресноводные экосистемы, гидробионтов разных трофических уровней, а также на млекопитающих и человека достаточно хорошо документированы, хотя разногласия в оценке влияния все же весьма существенны. Особенно важна оценка влияния природных популяций и фитоценозов на качество воды, разработка упрощенных методов такой оценки, не требующих дорогостоящей и трудно реализуемой на сети наблюдений за уровнем загрязнения окружающей среды Росгидромета идентификации токсинов. В то же время наличие в планктонном фитоценозе видов, известных как «токсичные», еще не доказывает факт образования ими токсинов.

В этой связи использование методологии биотестирования интегральной токсичности без идентификации альготоксинов представляется в настоящее время наиболее приемлемым решением задачи при условии установления (верификации) путем биоиндикации интенсивного цветения воды водоема и преобладания синезеленых водорослей. Установление токсичности водной среды в случае интенсивного цветения водоема (при доминировании синезеленых в сообществе фитопланктона) может быть с большой вероятностью отнесено к токсическому влиянию водорослей данного фитоценоза. Наиболее пригодными для оценки влияния фитоценозов на формирование качества воды являются методы биотестирования на водорослях (сценедесмусе и хлорелле), ракообразных (дафниях) и аквариумных рыбах (гуппи). Эти тест-объекты чувствительны к токсинам различной химической природы, апробированы на природной воде многих водоемов. Методы удобны по простоте выполнения, выращиванию культур в лабораторных условиях, не требуют значительных материальных затрат, но при этом надежны, обеспечены метрологическими характеристиками и позволяют получить достоверные результаты.

Рекомендации разработаны с целью усовершенствования и актуализации нормативно-методического обеспечения мониторинга поверхностных водных объектов в Росгидромете. Рекомендации дополняют используемые на сети наблюдений биологические методы оценки качества воды новым подходом, направленным на решение актуальных задач токсического загрязнения водных объектов.

РЕКОМЕНДАЦИИ

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ТОКСИЧЕСКОГО ВЛИЯНИЯ ФИТОЦЕНОЗОВ ПЛАНКТОНА НА ФОРМИРОВАНИЕ КАЧЕСТВА ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД СУШИ

Дата введения – 2014–12–01
Срок действия до 2019–12–31

1 Область применения

Настоящие рекомендации устанавливают методы оценки токсического влияния фитоценозов планктона на формирование качества поверхностных вод суши (ПВС) путем выявления токсичности проб воды и биомассы водорослей цветущего водоема при биотестировании в лабораторных условиях.

Настоящие рекомендации предусматривают использование токсикологических методов (далее – биотестирования) и гидробиологических методов (далее – биоиндикация).

Настоящие рекомендации предназначены для применения на государственной наблюдательной сети, осуществляющей организацию и проведение наблюдений за состоянием поверхностных вод суши. Рекомендации также могут использоваться специалистами в области мониторинга пресноводных экосистем других ведомств.

2 Нормативные ссылки

В настоящих рекомендациях использованы ссылки на следующие нормативные документы:

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 Р 51592-2000 Вода. Общие требования к отбору проб

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

Р 52.24.566-94 Методы токсикологической оценки загрязнения пресноводных экосистем

Р 52.24.734-2010 Организация и проведение наблюдений за состоянием и изменением качества поверхностных вод в чрезвычайных ситуациях

РД 52.24.309-2011 Организация и проведение режимных наблюдений за состоянием и загрязнением поверхностных вод суши

3 Термины, определения и сокращения

3.1 В настоящих рекомендациях применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1 **альготоксины:** токсины водорослей.

3.1.2

анализируемая проба: смесь дистиллированной (деионизированной) воды, питательной среды и испытуемой пробы, засеянная водорослями.
[ГОСТ Р 54496-2011, статья 3.5]

3.1.3

биологическая индикация воды (биоиндикация): Оценка качества воды по наличию водных организмов, являющихся индикаторами ее загрязненности.
[с учетом ГОСТ 27065-86, статья 38]

3.1.4

биологическое тестирование воды (биотестирование): Оценка качества воды по ответным реакциям водных организмов, являющихся тест-объектами.
[с учетом ГОСТ 27065-86, статья 39]

3.1.5

водный объект: Сосредоточение природных вод на поверхности суши либо в горных породах, имеющее характерные формы распространения и черты режима.
[ГОСТ 19179-73, статья 6]

3.1.6

водоем: Водный объект в углублении суши, характеризующийся замедленным движением воды или полным его отсутствием.
[с учетом ГОСТ 19179-73, статья 18]

3.1.7

водохранилище: Искусственный водоем, образованный водоподпорным сооружением на водотоке с целью хранения воды и регулирования стока.
[ГОСТ 19179-73, статья 177]

3.1.8 **гидробионты:** Все живые организмы, животные и растительные, развивающиеся и существующие в воде и донных отложениях водоемов и водотоков [1].

3.1.9 **гидробиологические показатели качества воды:** Показатели качества воды, определяемые по состоянию гидробионтов [1].

3.1.10

загрязнение вод: Поступление в водный объект загрязняющих веществ, микроорганизмов или тепла.
[ГОСТ 27065-86, статья 13]

3.1.11

загрязненность вод: Содержание загрязняющих воду веществ, микроорганизмов и тепла, вызывающее нарушение требований к качеству воды.
[ГОСТ 27065-86, статья 15]

3.1.12

загрязняющее воду вещество (загрязняющее вещество): Вещество в воде, вызывающее нарушение норм качества воды.
[ГОСТ 17.1.1.01-77, статья 40]

3.1.13

испытуемая проба: проба воды (например, сточной воды) для которой определяется ингибирующее действие на рост плотности (численности) клеток водорослей.
[с учетом ГОСТ Р 54496-2011, статья 3.4]

3.1.14

качество воды: Характеристика состава и свойств воды, определяющая пригодность ее для конкретных видов водопользования.
[ГОСТ 17.1.1.01-77, статья 4]

3.1.15

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

3.1.16

контрольная проба: Смесь питательной среды, засеянная водорослями без испытуемой пробы.
[ГОСТ Р 54496-2011, статья 3.6]

3.1.17 **острое токсическое действие (острая токсичность):** Отклик организма на токсическое воздействие, который проявляется за относительно короткий период времени (от нескольких минут до нескольких суток).

3.1.18

питательная среда: Смесь дистиллированной (деионизированной) воды и питательных веществ, которая используется для культивирования водорослей и приготовления контрольной пробы.
[ГОСТ Р 54496-2011, статья 3.3]

3.1.19

плотность (численность) клеток: Количество клеток в единице объема питательной среды или анализируемой пробы.
Примечание – плотность (численность) клеток выражается количеством клеток на кубический сантиметр (клеток/см^3).
[ГОСТ Р 54496-2011, статья 3.1]

3.1.20

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

[ГОСТ 19179-73, статья 7]

3.1.21 **пресные воды:** Природные воды с минерализацией до 1 ‰ [1].

3.1.22 **результат биотестирования:** Конечный вывод о токсичности водной среды, установленной при биотестировании.

3.1.23

скорость роста: Увеличение плотности (численности) клеток водорослей в единицу времени.

[с учетом ГОСТ Р 54496-2011, статья 3.2]

3.1.24 **сообщество организмов:** Совокупность взаимосвязанных и взаимозависимых видов организмов в пределах естественно ограниченного жизненного пространства.

3.1.25 **створ пункта наблюдений:** Условное поперечное сечение водоема или водотока, в котором производят комплекс работ для получения данных о показателях качества воды [1].

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

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

3.1.28 **«токсичные» виды водорослей:** Виды синезеленых водорослей, образующие в ходе жизнедеятельности токсины.

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

3.1.29 **токсичные загрязняющие вещества:** Вещества, обладающие свойством токсичности.

3.1.30 **фитоценоз**: Сообщество растений в экосистеме водного объекта.

3.1.31 **фоновый створ**: Створ, расположенный выше аварийного сброса на расстоянии, исключающем влияние этого сброса (Р 52.24.734).

3.1.32

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

[ГОСТ 17.1.1.01-77, статья 49]

3.1.33 **численность водорослей**: Количество клеток в единице объема питательной среды или анализируемой пробы.

3.1.34

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

[ГОСТ 17.1.1.01-77, статья 48]

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

3.1.36 **экспозиция**: Время воздействия на тест-объект при биотестировании. (Р 52.24.566)

3.1.37

эффективная кратность разбавления; ЭКР: Степень разбавления пробы питательной средой при подготовке анализируемой пробы, которая приводит к х %-ному снижению плотности клеток водорослей относительно контрольной пробы.

Примечание – ЭКР анализируемой пробы, при которой выживаемость дафний изменяется относительно контрольной пробы не более 10 % за 72 ч тестирования называется безвредно кратностью разбавления.

[с учетом ГОСТ Р 54496 – 2011, статья 3.8]

3.2 В настоящих рекомендациях применены следующие сокращения:

– **ВЗ** – высокое загрязнение;

– **ГСН** – государственная служба наблюдений за состоянием окружающей среды;

– **ОТД** – острое токсическое действие;

– **ПВС** – поверхностные воды суши;

– **ПДК** – предельно допустимая концентрация;

– **ЭВЗ** – экстремально высокое загрязнение;

– **pH** – водородный показатель реакции среды (отрицательный десятичный логарифм концентрации ионов водорода).

4 Общие положения

Наблюдения за токсичностью воды с использованием приемов и методов биотестирования в наблюдательной сети за уровнем загрязнения ПВС Росгидромета предусмотрены РД 52.24.309 (подпункт 5.3.1.4), однако они проводятся лишь в единичных случаях. Тем не менее проблема токсичности природных вод водоемов и водотоков, обуславливающая ухудшение качества воды, становится все более актуальной, особенно для водохранилищ.

Водохранилища и их приплотинные участки подвергаются значительным антропогенным нагрузкам, причем вследствие загрязнения биогенными элементами идет процесс эвтрофирования, интенсивно развиваются водоросли, наблюдается цветение воды. При этом в фитоценозах часто преобладают «токсичные» виды синезеленых водорослей - они образуют в ходе жизнедеятельности токсины. Наиболее опасным следствием эвтрофирования и цветения является токсическое загрязнение (токсификация) водоемов, прежде всего водохранилищ, токсинами синезеленых. Эти токсины имеют различную химическую природу, и химическое определение их затруднено из-за

недостаточной изученности, многообразия, отсутствия или малой доступности стандартных образцов для анализа (см. приложение А).

С помощью предлагаемых рекомендаций можно оценить токсическое влияние природных фитоценозов на формирование качества воды с помощью приемов и методик биотестирования и биоиндикации.

Биотестирование токсичности основано на регистрации реакций тест-объектов при помещении их в испытуемую пробу. В качестве тест-объектов обычно используют лабораторные культуры водорослей, ракообразных (дафний, цериодафний), коловраток, парамеций, хирономид, рыб.

Методы биотестирования, будучи биологическими, по смыслу близки к методам химического анализа: как и химические методы, они отражают свойства отобранной пробы и характеризуют воздействие этой пробы на водные организмы.

5 Принцип оценки токсического влияния фитоценозов на формирование качества ПВС

5.1 Токсическое влияние природных фитоценозов на формирование качества ПВС устанавливают по наличию токсичности проб воды и проб биомассы водорослей водоема при интенсивном цветении и доминировании синезеленых водорослей при биотестировании на гидробионтах, охватывающих основные трофические уровни водной экосистемы с учетом содержания загрязняющих веществ по данным наблюдений ГСН.

5.2 Объектами биотестирования токсичности служат пробы воды интенсивно цветущего водоема и пробы биомассы водорослей из «пятен» цветения.

Интенсивность цветения и роль синезеленых устанавливают путем биоиндикации фитоценозов.

Для биотестирования используют один биотест или набор биотестов: водоросли, ракообразные и рыбы.

6 Требования, порядок и условия выполнения работ по оценке токсического влияния фитоценозов планктона на формирование качества ПВС

6.1 В состав работ входит:

- отбор проб воды и биомассы водорослей для биотестирования, а также проб фитопланктона для биоиндикации;
- биотестирование проб воды и биомассы водорослей;
- биоиндикация по фитопланктону для установления степени цветения и роли синезеленых в фитоценозе;

- оценка токсичности природных фитоценозов по результатам биотестирования и верификация цветения по результатам биоиндикации.

6.2 Перед проведением работ составляют программу отбора проб, готовят посуду, оборудование, реактивы и вспомогательные материалы для отбора, анализа проб в соответствии с [2], место хранения проб, а также рабочие места для их анализа в лаборатории.

6.3 Все работы должны исключать попадание токсичных, органических и каких-либо других веществ из окружающей среды в испытуемые пробы воды или биомассы водорослей.

6.4 Пробы воды, фитопланктона и биомассы водорослей отбирают на приплотинных участках водохранилищ, небольших водоемах в период цветения, которое, прежде всего, выявляют визуально – по изменению цвета воды и «пятнам» цветения. Интенсивность цветения затем определяют в лаборатории путем биоиндикации по фитопланктону по одному из значений:

- общей биомассы водорослей;
- биомассы синезеленых водорослей.

Обычно интенсивное цветение воды водоемов в Северном полушарии наблюдается в летне-осенний период.

6.5 При отборе пробы составляют характеристику пробы в соответствии с формой приложения Б. На бутыль с пробой наклеивают водостойкую этикетку с номером пробы, местом, датой и временем ее отбора. Можно написать эти данные несмываемым водой маркером. В лаборатории регистрируют число емкостей и номера протокола отбора каждой пробы.

6.6 Работы по биотестированию и биоиндикации проводят в лаборатории. Биотестирование проводят в помещениях, в воздухе которого не должно быть токсичных паров, газов и пыли. Температура воздуха в помещении должна быть от 18 °С до 25 °С, в люминостате для биотестирования на водорослях – от 22 °С до 25 °С. Атмосферное давление должно быть в пределах от 84 до 106 кПа (от 630 до 800 мм рт. ст.). Освещение в люминостате, или эквивалентном приспособлении с лампами дневного света для водорослей должно составлять от 3000 до 10000 лк. Освещение помещения для выполнения работ по биоиндикации – естественное или искусственное, не ограничено особыми требованиями.

7 Подготовка к выполнению измерений

7.1 Подготовка посуды для отбора, хранения проб и проведения биотестирования

Для отбора проб воды или биомассы водорослей используют посуду из полиэтилена или политетрафторэтана. Для отбора проб нельзя использовать посуду с хромовым покрытием.

Желательно, чтобы посуда из полиэтилена и стекла для отбора проб и биотестирования была химически чистой. Для этого ее промывают раствором азотной кислоты с массовой долей 10 %. Стенки посуды осторожно смачивают этим раствором, после чего на 3 ч посуду оставляют, затем ее тщательно промывают водопроводной водой, нейтрализуют раствором пищевой соды и промывают четыре раза дистиллированной водой. При сильном загрязнении посуды, а также новую посуду промывают водой, заполняют раствором азотной кислоты с массовой долей 10 % и выдерживают не менее суток, затем тщательно промывают раствором соды, водопроводной и, не менее четырех раз, дистиллированной водой.

Для мытья посуды не следует пользоваться хромовой смесью (смесь бихромата калия и серной кислоты), синтетическими поверхностно-активными веществами и органическими растворителями.

Всю грязную посуду (за исключением мерной), использованную при отборе проб, в процессе пробоподготовки и проведения биотестирования рекомендуется стерилизовать кипячением в течение одного часа или помещением (за исключением мерной) в сушильный шкаф при температуре 160 °С в течение одного часа.

Чистую посуду для биотестирования хранят с закрытыми стеклянными притертыми пробками или завинчивающимися крышками в защищенных от пыли ящиках лабораторного стола или на закрытых полках, стеллажах и т.п.

7.2 Отбор, транспортировка и хранение проб

Пробы для биотестирования и биоиндикации отбирают одновременно.

Отбор проб проводят согласно ГОСТ Р 51592 и ГОСТ 17.1.5.05 с использованием устройств в соответствии с требованиями ГОСТ 17.1.5.04. Методы отбора, транспортировки, хранения, подготовки к выполнению биотестирования должны обеспечить неизменность состава проб в интервале времени между отбором проб и их анализом.

Пробы отбирают вручную специальными приспособлениями или с применением автоматических пробоотборников, которые должны быть изготовлены из нетоксичного материала.

Для отбора проб воды с глубины от 0,5 м и более используют бутыль с привязанной пробкой, которую помещают в футляр, или пробоотборник

с грузом. Футляр снабжен петлей, к которой привязывают веревку с размеченными отрезками, указывающими глубину погружения. На требуемой глубине, с помощью, привязанной к пробке веревки, выдергивают пробку из горла бутыли. После заполнения бутыли водой (на поверхности воды не появляются пузырьки воздуха) ее поднимают на поверхность.

При отборе проб измеряют температуру воды и записывают результаты в соответствии с приложением Б. Используют термометры с ценой деления 0,5 °С. Для определения температуры на месте взятия пробы 1 $дм^3$ воды наливают в склянку, нижнюю часть термометра погружают в воду и через 5 мин отсчитывают показания, держа термометр вместе со склянкой на уровне глаз. Точность определения составляет (±0,5) °С.

Пробы желательно поместить в емкость с забортной водой, которую меняют каждые 2 ч или погрузить в воду за борт в прочной сетке, чтобы поддерживать постоянную природную температуру.

Для биотестирования отбирают не менее 5000 $см^3$ природной воды (из них для биотестирования на дафниях – 600 $см^3$, для биотестирования на водорослях – 300 $см^3$, для биотестирования на рыбах – 3000 $см^3$). Пробы биомассы отбирают из «пятен» цветения планктонной сетью (всего две пробы) путем пропускания через нее по 10 $дм^3$ воды, и помещают в сосуды с притертыми пробками.

Отбираемый объем должен быть в два раза больше объема, требуемого для приготовления разбавлений и хранения оставшегося объема пробы до конца биотестирования.

Не допускается консервирование проб, предназначенных для биотестирования.

Пробы для биотестирования помещают в банки или флаконы, предварительно дважды ополаскивая их отбираемой водой, заполняя их до краев и закрыв так, чтобы не было пузырьков воздуха под пробками или полиэтиленовыми крышками. Пробы упаковывают в деревянные ящики для переноски проб и прокладывают бумагой или ветошью и помещают в холодильник при температуре 4 °С.

Биотестирование проводят не позднее 6 ч после их отбора, а в случае невозможности проведения анализа в течение этого срока пробы воды охлаждают до температуры от 2 °С до 4 °С и хранят в темноте не более 24 ч после отбора.

Все процедуры отбора, консервирования и хранения проб для биоиндикации по фитопланктону выполняют в соответствии с традиционными методами согласно [3].

8 Требования к квалификации операторов

К выполнению измерений и обработке их результатов допускают лиц с высшим профессиональным образованием или со средним

профессиональным образованием, имеющие стаж работы в лаборатории не менее трех лет, владеющих техникой биоиндикации и биотестирования.

9 Биоиндикация

9.1 Биоиндикацию фитопланктона проводят в лаборатории в целях:

- верификации интенсивности цветения воды водоема и получения данных о доминировании синезеленых водорослей в сообществе фитопланктона, определения относительного содержания (доли в общей численности) их «токсичных» видов, что необходимо для контроля приемлемости результатов оценки токсического влияния фитоценозов на формирование качества воды;
- определения изменений численности водорослей в ходе биотестирования.

Общая схема проведения работ с пробами приведена на рисунке 1.

9.2 Подготовка проб для биоиндикации по фитопланктону.

Отобранный объем пробы воды (500 $см^3$) фильтруют через мембранные фильтры с диаметром пор 1,2 мкм (например, «Владипор»), при этом фильтр перед применением промывают и кипятят в дистиллированной воде в течение 20 мин. Осадок клеток с фильтра количественно переносят в небольшие флаконы, используя для смывания осадка полученный фильтрат, консервируют формалином и проводят гидробиологический анализ фитопланктона в соответствии с [3].

Определяют и регистрируют показатели:

- общая численность водорослей;
- общая биомасса водорослей;
- численность синезеленых водорослей;
- биомасса синезеленых водорослей;
- доля видов синезеленых в общей численности водорослей;
- доля синезеленых в общей биомассе водорослей;
- видовой состава синезеленых и доля «токсичных» видов в общей численности и биомассе водорослей.

9.3.Оценка интенсивности цветения воды

Интенсивность цветения воды определяют по данным анализа проб фитопланктона по одному из значений:

- общей биомассы водорослей;
- биомассы синезеленых водорослей.

Оценку интенсивности цветения проводят согласно следующим значениям общей биомассы фитопланктона и биомассы синезеленых водорослей:

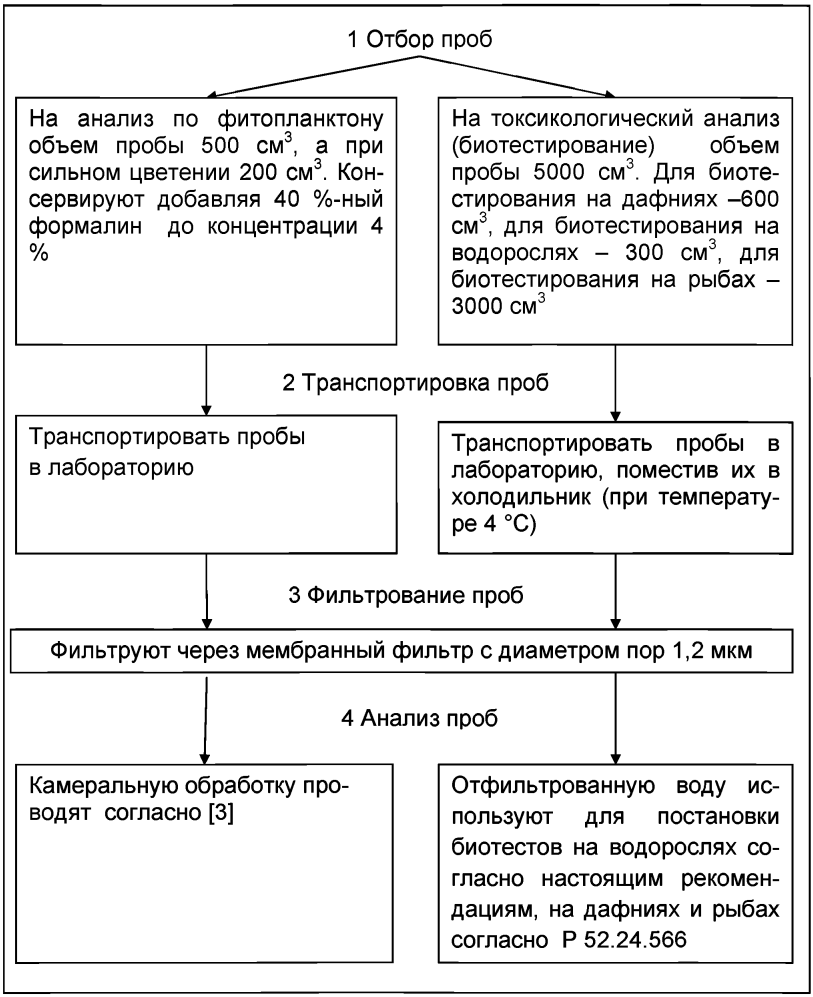


Рисунок 1 - Общая схема проведения работ с пробами

- биомасса от 10,0 до 99,9 мг/дм^3 соответствует интенсивному цветению;
- биомасса более 100 мг/ дм^3 соответствует гиперцветению.

9.4 Оценка доминирования синезеленых водорослей.

Оценку делают по данным о доле синезеленых в общей численности водорослей или в общей биомассе фитопланктона. Синезеленые водоросли считают доминирующими, если они составляют в общей численности или биомассе 40 % и более.

9.5 Запись результатов

Результаты анализа фитопланктона записывают в соответствии с формой приложения В.

10 Биотестирование токсичности воды

10.1 Общие положения

Для биотестирования проб воды используют биотесты:

- на ракообразных (дафниях);
- на зеленых водорослях;
- рыбах гуппи Poecilia reticulata Peters (Cyprinodontiformes,Pisces) согласно рекомендациям Р 52.24.566.

Перед постановкой биотестов тест-объекты калибруют по чувствительности к бихромату калия согласно ГОСТ Р 54496 или Р 52.24.566.

Общая схема проведения работ с пробами приведена на рисунке 1.

Вода, используемая для биотестирования, должна иметь характеристики интенсивности цветения по 9.3.

10.2 Биотестирование проб воды на дафниях

10.2.1 Для выполнения биотестирования проб воды на дафниях отобранный объем пробы (600 $см^3$) фильтруют через мембранные фильтры с диаметром пор 1,2 мкм (например, «Владипор»), при этом фильтр перед применением промывают и кипятят в дистиллированной воде от 20 до 30 мин. Фильтрат используют для биотестирования.

10.2.2 Биотестирование проводят на дафниях Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) согласно рекомендациям Р 52.24.566 (подраздел 6.1).

10.2.3 по результатам биотестирования рассчитывают изменения гибели в анализируемой пробе относительно контрольной в процентах согласно Р 52.24.566 (подраздел 6.1), используя формулу 6.2.

10.2.4 Оценку степени токсичности проб воды в биотесте на дафниях при экспозиции до 96 ч проводят, используя таблицу 1.

Таблица 1

Оценка токсичности проб воды на дафниях		Изменения гибели в анализируемой пробе относительно контрольной, %
Общая	Детальная	
Токсичность отсутствует	Нетоксичная	До 25 включ.
Не оказывает острого токсического действия	Малотоксичная	Св. 25 до 35 включ.
	Среднетоксичная	Св. 35 до 50 включ.
Оказывает острое токсическое действие	Высокотоксичная	Св. 50 до 100 включ.

10.3 Биотестирование проб воды на водорослях

10.3.1 В биотесте используют зеленые протококковые водоросли Scenedesmus quadricauda (Turp.) Breb. или Chlorella vulgaris Beijer. Сущность метода заключается в определении токсичности анализируемой пробы по изменению плотности (численности) клеток водорослей относительно контрольной пробы при экспозиции в течение 96 ч при постоянных освещении и температуре.

Используют культуру, находящуюся в экспоненциальной стадии роста (от 3 до 5 сут после пересева). Пересев делают регулярно один раз в 7 сут для поддержания экспоненциальной стадии роста водорослей.

Перед биотестированием проверяют температуру фильтрата, доводят ее до температуры от 18 °С до 25 °С. Реакцию среды (pH) измеряют, но не корректируют.

10.3.2.Ставят серию экспериментов с пробами испытуемой воды и одну контрольную серию. Для этого в стеклянные плоскодонные колбы вместимостью 250 $см^3$ наливают по 100 $см^3$ контрольной (дистиллированной с pH от 7,0 до 7,5) и по 100 $см^3$ каждой пробы испытуемой воды. Повторность определения для всех серий трехкратная: воду каждой пробы наливают в три колбы.

В каждую из трех колб пипеткой добавляют компоненты питательной среды, а именно, по 0,1 $см^3$ каждого концентрированного раствора реактивов в порядке их расположения в таблице Г.1 (приложение Г). Содержимое колб перемешивают и засевают водорослевой суспензией из лабораторной культуры, добавляя во все колбы одинаковые объемы суспензии водорослей с таким расчетом, чтобы численность в полученной анализируемой пробе была в пределах от 25 до 50 тыс. кл./$см^3$.

10.3.3 Объем суспензии клеток рассчитывают предварительно перед началом эксперимента. Например, при исходной численности клеток в культуре водорослей 2,5 млн. кл./$см^3$ во все колбы следует добавить по 1 $см^3$ водорослей культуры, тогда в каждой колбе анализируемой пробы численность клеток составит 25 тыс. кл./$см^3$.

Колбы перемешивают встряхиванием и определяют получившуюся исходную численность клеток водорослей в камере Горяева. В каждой колбе подсчет повторяют трижды.

После подсчета содержимое колб вновь перемешивают, закрывают стерильными ватно-марлевыми пробками или стерильными колпачками из алюминиевой фольги и устанавливают в люминостат.

Температуру в люминостате поддерживают в пределах от 22 °С до 25 °С, освещенность от 3000 до 10000 лк, при круглосуточном освещении и систематическом один или два раза в сутки перемешивании встряхиванием.

Допускается использование колб меньшей емкости – 100 см^3 и 50 см^3, при этом объем контрольной и испытуемой проб составит соответственно 50 см^3 и 25 см^3, объем каждого концентрированного раствора реактивов питательной среды составит соответственно по 0,05 см^3 и 0,025 см^3, объем водорослевой суспензии также уменьшают соответственно, чтобы численность клеток в каждой колбе составила от 25 до 50 тыс. кл./см^3.

10.3.4 Для определения численности клеток водорослей камеру Горяева предварительно накрывают покровным стеклом и притирают его до образования радужных колец интерференции. После этого водоросли в колбе перемешивают, пипеткой вносят по одной капле произвольного объема на верхний и нижний края покровного стекла. После того, как камера Горяева заполнится водорослевой культурой, ее помещают под объектив микроскопа и подсчитывают число клеток в 25 больших квадратах при увеличении объектива микроскопа 20× и окуляра от 10× до 15×.

Расчет количества клеток водорослей X, кл./см^3, производят по формуле

$$X = m \cdot 10^3, \qquad (1)$$

где m – число клеток по всему полю камеры;

10^3 – коэффициент пересчета мм^3 в см^3.

10.3.5 Ежедневно через 24, 48, 72 и 96 ч, в одно и то же время суток в контрольных и опытных колбах проводят подсчет численности клеток в камере Горяева. Через 96 ч экспозиции биотестирование прекращают.

10.3.6 Рассчитывают снижение численности клеток водорослей относительно контрольной пробы А, %, в течение всей экспозиции (от 24 до 96 ч) по формуле

$$A = \frac{X_к - X_{ан}}{X_к} \cdot 100, \qquad (2)$$

где $X_к$ – среднеарифметическое значение численности клеток водорослей в контрольной пробе, кл./см^3;

$X_{ан}$ – среднеарифметическое значение численности клеток водорослей в анализируемой пробе, кл./см^3.

10.3.7 Оценку степени токсичности проб воды в биотесте на водорослях при экспозиции до 96 ч по ГОСТ Р 54496 проводят, используя таблицу 2.

Ранжирование в таблице носит условный характер. Наиболее надежной является оценка острого токсического действия, о наличии которого судят по снижению численности водорослей в опыте на 50 % и более по сравнению с контролем за 72 ч экспозиции. Следует отметить, что согласно некоторым нормативным документам, в частности методики [2], угнетение роста водорослей учитывают при изменениях 50 % и более. Рекомендуемое ГОСТ Р 54496 детальное ранжирование (см. таблицу 2) более информативно.

Таблица 2

Оценка токсичности проб воды на водорослях		Снижение численности клеток водорослей в анализируемой пробе относительно контрольной, %
Общая	Детальная	
Токсичность отсутствует	Нетоксичная	До 10 включ.
Не оказывает острого токсического действия	Слаботоксичная	От 10 до 25 включ.
	Малотоксичная	От 25 до 35 включ.
	Среднетоксичная	От 35 до 50 включ.
Оказывает острое токсическое действие	Высокотоксичная	От 50 до 100 включ.

Дополнительно можно использовать показатели скорости роста водорослей, а также показатели, характеризующие ход кривой изменений численности клеток водорослей во времени, поскольку изменения могут развиться в разные сроки экспозиции и к концу ее могут не выявляться.

В результате биотестирования может происходить не угнетение, а стимуляция роста водорослей. Если за 96 ч получают данные, указывающие на стимуляцию роста численности клеток водорослей, то проводят расчет по формуле (2) для продолжительности биотестирования, когда эффект стимуляции роста еще не наблюдался по ГОСТ Р 54496.

Дополнительно анализируют характер кривой зависимости изменений роста водорослей от времени, рассчитывая изменения через каждые сутки в процентах к исходной численности по сравнению с контролем. Для оценки степени токсичности также используют таблицу 2.

Данные биотестирования на водорослях и других тест-объектах регистрируют и записывают в соответствии с формами таблиц Д.1-Д.3 (приложение Д).

10.3.8 Результаты биотестирования на водорослях считают приемлемыми, если выполнены следующие требования по ГОСТ Р 54496:

- культура при калибровке чувствительности соответствовала установленным требованиям;
- численность клеток водорослей в контроле увеличилась в три и более раза за 96 ч экспозиции;
- колебания темпов роста клеток водорослей в каждой из трех повторностей в течение биотестирования должны быть не более 5 % относительно их среднеарифметического значения;
- изменение pH в конце эксперимента не изменилось более чем на 1,5 ед.

10.4 Биотестирование на рыбах

Биотестирование проводят на рыбах гуппи Poecilia reticulata Peters (Cyprinodontiformes,Pisces) согласно рекомендациям Р 52.24.566 (подраздел 6.6).

11 Биотестирование проб биомассы водорослей

11.1 Принцип метода

С целью оценки токсичности природного фитоценоза проводят биотестирование проб биомассы водорослей с разрушенными клетками (для выделения внутриклеточных токсинов), готовят серию разбавлений фильтрата и считают, что полученная токсичность соответствует численности клеток водорослей в пробе.

Для биотестирования проб биомассы водорослей допустимо использование одной методики – на дафниях.

11.2 Отбор, подготовка проб и проведение биотестирования

11.2.1 Общая схема проведения работ с пробами биомассы водорослей приведена на рисунке 2.

11.2.2 Из пятен цветения отбирают планктонной сетью (мельничного газа № 70 или еще больших номеров по [3]) две одинаковые пробы биомассы не менее 1 $дм^3$ путем пропускания через сеть по 10 $дм^3$ или более воды. Пробы помещают в сосуды с притертыми пробками. Пробы не консервируют.

Одну пробу с биомассой помещают в морозильную камеру холодильника при температуре минус 18 °С для подготовки к биотестированию, а вторую помещают в холодильник при температуре 4 °С для подсчета клеток в биомассе водорослей с помощью биоиндикации по фитопланктону. Обе пробы доставляют в лабораторию.

11.2.3 В пробе из морозильной камеры разрушают клетки путем трехкратного замораживания при температуре минус 18 °С и оттаивания.

После третьего оттаивания биомассу разбавляют водой в два раза, используя нетоксичную воду из этого водоема (например, по результатам

биотестирования на дафниях). Для удаления разрушенных клеток разбавленную массу фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 1,2 мкм. Полученный фильтрат используют для биотестирования.

11.2.4 Биотестирование фильтрата проводят на дафниях согласно 10.2. Фильтрат анализируемой пробы разливают по трем стаканам, при этом объем жидкости во всех стаканах должен быть одинаковым. В каждый стакан сажают по 10 дафний.

При отсутствии токсичности работы прекращают, делая запись об отсутствие токсичности фитоценоза в соответствии с формой таблицы Д.4 (приложение Д).

При обнаружении токсичности готовят дополнительную серию разбавлений например в 2, 5, 10 и т.д. раз. Биотестирование проводят до получения нетоксичного разбавления. Чем больше кратность разбавления, необходимая для нахождения безвредного разбавления, тем выше токсичность испытуемой пробы.

11.2.5 Проводят подсчет клеток в пробе биомассы водорослей, хранившейся в холодильнике (пример см. 11.4). Для этого доводят биомассу водорослей до 2 $дм^3$, и проводят биоиндикацию по фитопланктону в соответствии с разделом 9. Результаты используют для установления связи токсичности фильтрата с численностью клеток водорослей (см. 11.4).

11.2.6 Оценку токсичности фитоценоза с выделением внутриклеточных токсинов в водную среду проводят следующим образом. Находят безвредную кратность разбавления пробы и для последнего «токсичного» разбавления рассчитывают соответствующую численность клеток водорослей по данным биоиндикации с учетом всех разбавлений. Используют два основных показателя, характеризующих токсичность массы водорослей:

- численность водорослей в максимально разбавленной пробе, оказавшейся нетоксичной;

- численность водорослей в максимально разбавленной пробе, оказавшейся токсичной.

11.2.7 Сопоставляют степень токсичности биомассы водорослей с токсичностью воды, отобранной на том же участке водоема (вертикали, створе), для заключения о возможном выделении токсинов при разрушении клеток водорослей природного фитоценоза.

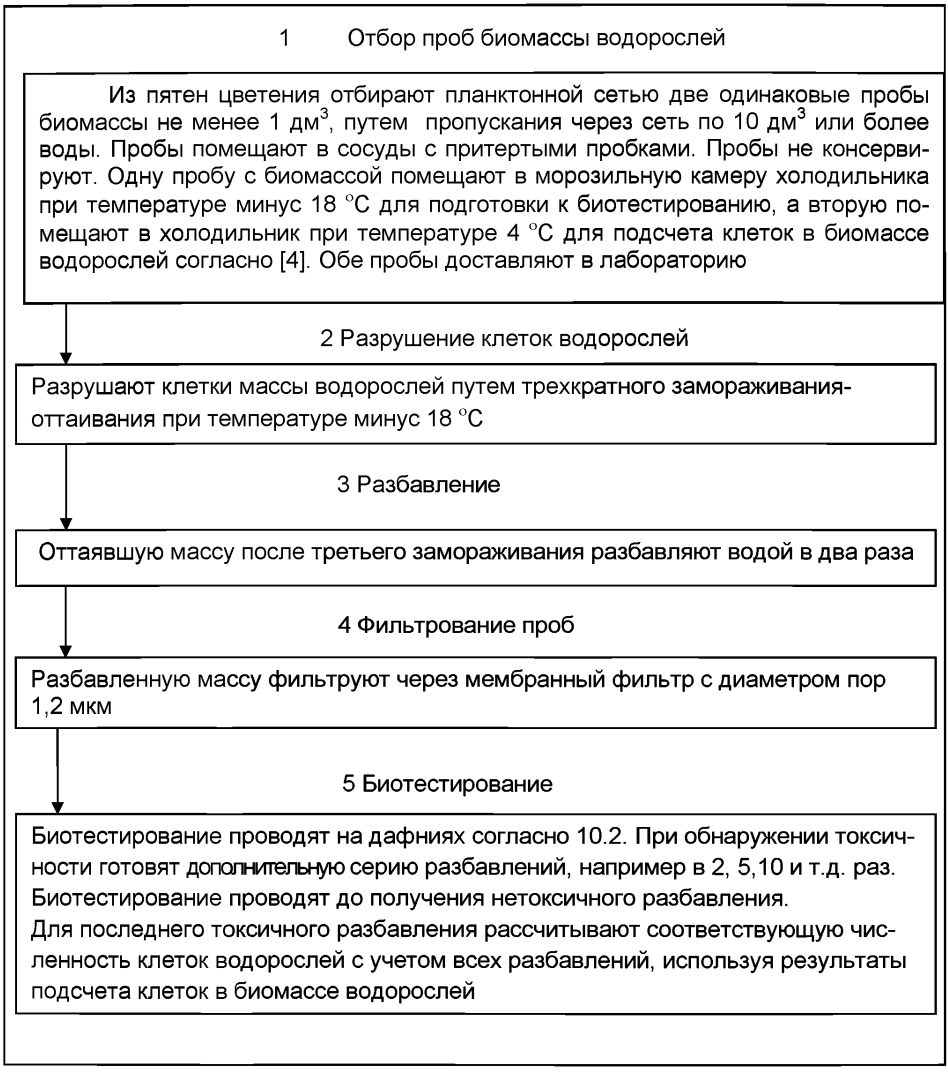


Рисунок 2 - Общая схема проведения работ с пробами биомассы водорослей

Показатели записывают по форме таблицы Д.4 (приложение Д).

Токсичность биомассы водорослей указывает на то, что именно водоросли обусловливают токсичность воды в обследуемом водоеме.

11.3 Приготовление разбавлений фильтрата биомассы водорослей

Приготовление разбавлений фильтрата (см. 11.2.3) выполняют при комнатной температуре. Часть фильтрата оставляют для хранения в холодильнике на случай повторных более детальных разбавлений (см. рисунок 2).

В качестве разбавляющей воды используют природную воду из условно чистого участка обследуемого водоема, например, воду пробы, в которой токсичность не была выявлена в ходе биотестирования. В процессе приготовления разбавлений пробы тщательно перемешивают.

Для приготовления разбавлений произвольно заданные объемы фильтрата отмеряют мерным цилиндром или мерной пипеткой, переносят в сосуд для разбавления, при этом объем посуды должен примерно на 1/3 превышать объем заданного разбавления, и добавляют разбавляющую воду.

Как во время приготовления разбавлений, так и при их хранении посуду закрывают предварительно подобранными пробками и снабжают несмываемыми водой надписями о кратности разбавления.

Выбор кратности разбавлений фильтрата произвольный. Рекомендуется вначале приготовить три или четыре разбавления: например, в 2, 5, 10 и 20 раз. При необходимости готовят и анализируют дополнительные более детальные разбавления.

11.4 Пример выполнения работ с биомассой водорослей

Проба биомассы водорослей отобрана в октябре на одном из южных водохранилищ.

Для отбора использована планктонная сеть, через которую пропущено по 15 дм^3 природной воды из пятна цветения, чтобы получить пробы биомассы по 1 дм^3.

Для подсчета клеток в биомассе водорослей использована камера Нажотта. Биомассу довели до 2 дм^3, но она оказалась очень концентрированной, поэтому пробу разбавили еще в два раза, т.е биомассу разбавили в четыре раза.

При подсчете численности клеток получено значение а, тыс. кл./см^3, что с учетом разбавления соответствовало исходной численности 4а, тыс. кл./см^3.

Проба для проведения биотестирования была трижды заморожена и оттаяна, разбавлена в два раза и затем отфильтрована. Получившийся фильтрат далее использован для биотестирования с разбавлениями.

При биотестировании выявлена токсичность при разбавлении фильтрата в 2, 5, 10, 15 раз (первое разбавление перед фильтрацией учтено). Фильтрат, разбавленный в 20 раз, оказался нетоксичным. Следовательно, безвредная кратность разбавления – в 20 раз.

Фильтрат, разбавленный в 15 раз, оказался в соответствии с таблицей 2 малотоксичным (при биотестировании гибель дафний составила 30 %). Эта степень токсичности обусловлена фильтратом, полученным в ходе обработки определенного числа клеток водорослей, соответствующего максимально разбавленному фильтрату, проявившему токсичность, т.е. при 15-кратном разбавлении. Расчет численности клеток ЧК(Р), кл./см^3, при разбавлении в 15 раз, проводят по формуле

$$ЧК(Р)=\frac{ЧК\ (И)}{КР}=\frac{4а}{15}, \quad (3)$$

где ЧК(И) - численность клеток в исходной пробе биомассы, кл./см^3;
КР - кратность разбавления, раз.

Таким образом, токсичность фильтрата, разбавленного в 15 раз, соответствует численности клеток водорослей 4а/15.

12 Оценка токсического влияния фитоценоза на формирование качества ПВС

12.1 Оценку токсического влияния фитоценозов на качество ПВС делают по данным биотестирования токсичности природной воды с учетом результатов гидробиологического анализа и данных наблюдений ГСН по загрязненности.

12.1.1 Оценка степени токсичности проб по результатам проведенного биотестирования является экспертной. Ее делают, используя результаты регистрации показателей токсичности и таблицы степени токсичности (см. таблицы 1 и 2).

Оценку проводит специалист с учетом закономерностей реагирования, особенностей жизнедеятельности использованных тест-объектов.

12.1.2 При использовании набора биотестов (водоросли, дафнии, рыбы) общую оценку токсичности выводят, исходя из следующего: если хотя бы в одном из биотестов проба оказывала токсическое действие, ее считают токсичной. Результаты различных биотестов могут не совпадать вследствие различий в чувствительности тест-объектов к токсическому воздействию [4].

Приоритетным в оценке результатов биотестирования по набору биотестов является биотест на дафниях по Р 52.24.566.

12.2 Данные выполненных экспериментов по установлению токсичности испытуемой пробы воды и биомассы водорослей записывают в соответствии с формами таблиц Д.1-Д.4 (приложение Д).

12.3 Данные гидробиологического анализа подтверждают интенсивное цветение воды и преобладание в фитоценозе синезеленых водорослей при условиях, что:

- биомасса фитопланктона и/или синезеленых водорослей соответствовали интенсивному цветению, если ее значение составляло от 10,0 до 99,9 мг/дм^3 или гиперцветению, если ее значения составляли более 100 мг/дм^3;

- синезеленые водоросли были доминирующей группой в фитоценозе в случае когда их значение составляло не менее 40 % общей численности водорослей[1)].

12.4 Для оценки токсичности воды используют данные наблюдений ГСН по загрязненности, исходя из допущения о наличии или отсутствии ВЗ и ЭВЗ по критериям, принятым в системе мониторинга ПВС Росгидромета [5]. Воду считают условно токсичной, если при химическом анализе выявлены следующие критерии ВЗ или ЭВЗ:

- увеличение концентраций загрязняющих веществ 1-го, 2-го классов опасности, превышающих ПДК в 3-5 и более раз;

- увеличение концентраций загрязняющих веществ 3-го, 4-го классов опасности в 10 и более раз;

- снижение концентрации растворенного в воде кислорода до значений 3 мг/дм^3 и ниже.

При отсутствии критериев ВЗ и ЭВЗ воду считают условно нетоксичной.

12.5 В результате выполненных работ (см. разделы 10 и 11, 12.4) возможны четыре ситуации (см. таблицу 3), анализ которых дает основания для заключений о токсичности воды - ухудшении ее качества, обусловленной влиянием фитоценоза.

12.6 Заключение о токсическом влиянии фитоценоза на качество воды должно быть подтверждено данными об интенсивном цветении воды и преобладании в фитоценозе синезеленых водорослей.

Результаты оценки влияния природных фитоценозов на качество воды по данным биотестирования воды и биомассы водорослей с учетом результатов выполненного гидробиологического анализа и данных ГСН по загрязненности заносят в рабочий журнал в соответствии с формой приложения Е.

Пример выполнения работ по оценке токсического влияния фитоценозов планктона на качество ПВС приведен в приложении Ж.

[1)] Использован критерий частоты встречаемости по [3].

Таблица 3 – Оценка влияния природных фитоценозов на качество воды по результатам биотестирования воды, биомассы водорослей с учетом данных наблюдений ГСН по загрязненности

Токсичность воды	Токсичность биомассы водорослей	Условная токсичность воды по данным химических наблюдений ГСН	Заключение о влиянии фитоценозов на токсичность воды
1 Не токсична	Токсична	Не токсична	Токсичность биомассы водорослей обусловлена внутриклеточными токсинами, выделение которых возможно при отмирании клеток. Токсичность не связана с химическим загрязнением
2 Токсична	Токсична	Не токсична	Токсичность воды и биомассы водорослей обусловлена отмиранием водорослей и выходом внутриклеточных токсинов в водную среду. Токсичность не связана с химическим загрязнением
3 Токсична	Токсична	Токсична	Токсичность воды и биомассы водорослей может быть обусловлена отмиранием водорослей и выходом внутриклеточных токсинов в водную среду, а также с химическим загрязнением
4 Токсична	Не токсична	Токсична	Токсичность воды не связана с внутриклеточными токсинами водорослей, а обусловлена химическим загрязнением

Приложение А
(справочное)

Синезеленые водоросли и их токсины

Эвтрофирование и цветение водоемов приводят к ухудшению качества воды и негативно влияют на основные трофические уровни экосистемы, приводят к снижению биоразнообразия, формированию фитоценозов с массовым развитием всего нескольких видов водорослей. Чаще всего в таких фитоценозах преобладают синезеленые водоросли и именно они выделяют в водную среду токсины (цианотоксины), являясь источниками опасного токсического загрязнения водной экосистемы. Проблемы цветения и цианотоксинов приобретают глобальный характер; они привлекают внимание экологов, гидробиологов, токсикологов и медиков, что находит отражение в значительном числе публикаций, в том числе обзорного характера.

Наиболее распространены такие «токсичные» виды водорослей как Microcystis aeruginosa, Aphanizomenon flos-aquae, Anabaena flos-aquae, Oscillatoria limnetica и другие.

Токсины представляют опасность для водной экосистемы и ее основных трофических уровней: водорослей, зоопланктона (дафний, циклопов, коловраток), рыб. Особенно токсичен Microcystis, более слабое действие оказывает Aphanizomenon. Токсическое действие проявляется в случае, если клетки были разрушены замораживанием, механическим путем, а также при их отмирании и разложении (токсин этих видов являются эндотоксинами).

При вспышках развития синезеленых некоторые представители зоопланктона уходят в другие слои воды, но некоторые виды устойчивы и даже могут использовать их в пищу, в том числе при адаптации (ракообразные Eurycercus lamellatus, Lathonura rectirostris).

Наиболее изучены и представляют очевидную проблему микроцистины (LR,YR, RR и LW). Они вызывают острое, иногда летальное, отравление людей, других млекопитающих, птиц. Известно, что микроцистины угнетают функцию печени, ингибируют фосфатазы и в связи с этим при хроническом поступлении в организм могут инициировать развитие опухолевых процессов. В ряде стран уже введены нормативы на содержание микроцистина в питьевой воде.

Исследованы, выделены и изучены следующие виды токсинов водорослей: микроцистины и нодулярины (токсичны для печени, канцерогенны), анатоксины-а, а(с) и гомоанатоксин-а (нейротоксичны, ингибируют ацетилхолинэстеразу, вызывают удушье и судороги), сакситоксины (нейротоксичны, вызывают конвульсии и паралич), цилиндроспермозины (цитотоксичны, ингибируют синтез белка, вызывают некротические повреждения внутренних органов).

Существенные изменения в токсичности водорослей связаны с различными стадиями их роста и другими факторами. Известно, что токсичность увеличивается с увеличением возраста и плотности культуры. Например, образование токсина у Aphanizomenon flos-aquae зависит от температуры и освещенности, у Microcystis aeruginosa не зависит от освещенности. Оптимальная температура для образования токсина 25 °С, при 15 °С его образуется вдвое меньше, а при 30 °С образование подавляется полностью. Что касается освещенности, то чем она выше, тем больше образуется токсина.

Токсины находятся внутри клеток и попадают в окружающую водную среду при их отмирании. Необходимо подчеркнуть, что отмирание клеток наблюдается на протяжении всего вегетационного периода, и в фитоценозах всегда присутствуют как живые, так и мертвые клетки.

Наличие в планктонном фитоценозе видов, известных как «токсичные», еще не доказывает образования ими токсинов. Присутствие токсинов в воде можно установить путем прямого химического анализа, что существенно затруднено из-за их многообразия, больших финансовых затрат на приобретение стандартных образцов и высокой стоимости аналитического оборудования. Кроме того, опасность цветения, помимо образования и выделения токсинов, заключается и в том, что в ходе жизнедеятельности водорослей в воду выделяются и другие органические соединения, а при их разложении в придонных слоях воды образуются анаэробные зоны, где скапливается метан и сероводород, в илах могут выделяться меркаптаны, биогенные амины типа трупных ядов, аммиак. Формирующийся дефицит растворенного кислорода, как правило, снижает устойчивость гидробионтов ко многим ядам, и при масштабном цветении происходят массовые заморы рыб.

Таким образом, все возможные вещества, которые обладают свойством токсичности, вряд ли удастся выявить и идентифицировать в рамках мониторинга поверхностных вод суши. В сложившейся ситуации первостепенное значение приобретает оценка и контроль токсического влияния планктонных фитоценозов на качество поверхностных вод с использованием методологии и методов биотестирования.

Этот подход положен в основу метода, изложенного в настоящих рекомендациях.

Приложение Б
(обязательное)

Форма записи характеристик пробы природной воды и условий отбора

1 Номер пробы _____

2 Место отбора пробы воды и биомассы водорослей:

_____

водный объект, пункт, створ, горизонт, вертикаль

3 Дата отбора, время суток_____

4 Температура воды, воздуха_____

5 Погодные условия_____

6 Визуальная характеристика воды:

- органолептические признаки _____;
- прозрачность _____;
- характер взвесей_____

минеральные частицы; частицы глины, песка; ил; растительный детрит;

_____,

дрифт водорослей; бактериальная слизь и т.д.

- загрязненность _____

детрит; обрывки водной растительности, пятна нефтепродуктов, пена,

_____.

хозяйственно-бытовой и другой мусор, отходы производства и т.д.

Приложение В
(обязательное)

Форма записи результатов биоиндикации по фитопланктону

1 Номер пробы _____

2 Место отбора пробы воды _____
водный объект, пункт, створ, горизонт, вертикаль

3 Дата отбора, время суток _____

4 Показатели развития фитоценоза:

- общая численность водорослей, кл./см^3 _____
- общая биомасса водорослей, мг/дм^3 _____
- численность синезеленых водорослей, кл./см^3 _____
- биомасса синезеленых водорослей, мг/дм^3 _____
- доля синезеленых в общей численности водорослей, % _____
- доля синезеленых в общей биомассе водорослей, % _____
- видовой состав синезеленых (перечислить 4-5 видов в порядке убывания частоты встречаемости) _____
- доля «токсичных» видов в численности и биомассе синезеленых водорослей, % _____

5 Показатели интенсивности цветения воды:

- по общей биомассе водорослей _____
используют критерии: 10,0-99,9 мг/дм^3 - интенсивное цветение; более 100 мг/дм^3 – гиперцветение
- по биомассе синезеленых водорослей _____
используют критерии: 10,0-99,9 мг/дм^3 - интенсивное цветение; более 100 мг/дм^3 – гиперцветение

6 Заключение об интенсивности цветения _____

7 Заключение о доминировании синезеленых _____

Приложение Г
(справочное)
Содержание культуры водорослей в лабораторных условиях

Таблица Г.1– Состав питательной среды Успенского

Наименование реактива	Содержание реактива, г/дм^3	
	в среде для культивирования	в растворах солей для биотестирования
Калий азотнокислый (KNO_3)	0,025	50,0
Магний сернокислый обводненный ($MgSO_4 \times 7H_2O$)		
Калий фосфорнокислый однозамещенный (KH_2PO_4)		
Калий углекислый (K_2CO_3)	0,0345	69,0
Кальций азотнокислый $Ca(NO_3)_2$	0,100	200,0
Раствор микроэлементов	1 см^3	1 см^3

Состав раствора микроэлементов для питательной среды Успенского приведен в таблице Г.2.

Таблица Г.2– Состав раствора микроэлементов для питательной среды Успенского

Наименование реактива	Содержание реактива, г/дм^3
Борная кислота (H_3BO_3)	2,86
Магний хлористый обводненный ($MnCl_2 \times 4H_2O$)	1,81
Цинк сернокислый обводненный ($ZnSO_4 \times 7H_2O$)	0,222
Молибдена оксид (MoO_3)	0,017
Аммония метаванадат (NH_4VO_3)	0,023

Приложение Д
(обязательное)

Форма записи данных биотестирования

Таблица Д.1 – Данные биотестирования природной воды на дафниях

Номер пробы	Водный объект, пункт, створ, дата отбора	Дата биотестирования. Экспозиция (Э), ч.	Число погибших дафний, экз. в пробах воды						Гибель дафний, %; степень токсичности проб воды	
			контрольной			анализируемой			контрольной	анализируемой
			Повторность			Повторность				
			1	2	3	1	2	3		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

Таблица Д.2 – Данные биотестирования природной воды на водорослях

Номер пробы	Водный объект, пункт, створ, дата отбора	Дата биотестирования. Экспозиция (Э), ч.	Численность водорослей, тыс. кл./см^3 в пробах воды								Степень токсичности анализируемой пробы воды	
			контрольной				анализируемой					
			Повторность			Среднее значение	Повторность			Среднее значение	Снижение численности клеток водорослей, %	Детальная оценка токсичности
			1	2	3		1	2	3			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Таблица Д.3 – Данные биотестирования природной воды на рыбах

Номер пробы	Водный объект, пункт, створ, дата отбора	Дата биотестирования. Экспозиция (Э), ч.	Численность рыб, экз. в пробах воды				Степень токсичности	
			контрольной		анализируемой		Количество погибших рыб в опыте по отношению к контролю, %	Детальная оценка токсичности
			Повторность		Повторность			
			1	2	1	2		
1	2	3	4	5	6	7	8	9

Таблица Д.4 – Данные биотестирования биомассы водорослей на дафниях

Номер пробы	Водный объект, пункт, створ, дата отбора	Дата биотестирования. Экспозиция (Э), ч.	Число погибших дафний, экз. в пробах воды						Гибель дафний, %; степень токсичности при кратности разбавления в… раз	Численность клеток водорослей при кратности разбавления в… раз
			контрольной			анализируемой с кратностью разбавления в…раз				
			Повторность			Повторность				
			1	2	3	1	2	3		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

Приложение Е
(обязательное)

Форма заключения о влиянии фитоценоза на качество воды

1 Проба номер_____
2 Биотестирование проведено на _____
3 Результаты биотестирования проб воды:
- степень токсичности в биотестах_____
- вывод о токсичности пробы воды по набору биотестов_____

4 Результаты биотестирования пробы биомассы водорослей на дафниях:
степень токсичности _____
5 Результаты биоиндикации по фитопланктону:
-численность и биомасса клеток в испытуемой пробе воды _____
- доля синезеленых в численности и биомассе _____
- интенсивность цветения _____
- численность и биомасса клеток в испытуемой пробе биомассы водорослей_____.
6 Характеристика загрязненности воды по критериям ВЗ и ЭВЗ (содержанию характерных загрязняющих веществ 1-2-го классов опасности, по данным наблюдений ГСН, в ПДК)_____
_____
7 Заключение о влиянии фитоценоза на качество воды по результатам биотестирования, гидробиологического анализа и загрязненности
_____

Приложение Ж
(рекомендуемое)

Пример выполнения работ по оценке токсического влияния фитоценозов планктона на формирование качества ПВС

Ж.1 Отбор проб

Пробы воды на биотестирование токсичности и гидробиологический анализ по фитопланктону отобраны в октябре на водохранилище П. (одном из крупных южных водохранилищ) на вертикали № 24.

Подготовка к отбору проб и выполнению работ были проведены согласно 7.1 и 7.2 настоящих рекомендаций.

Ж.1.1 Пробы для биотестирования отобраны в следующих объемах:

- для биотеста на водорослях – 300 $см^3$;
- для биотеста на дафниях – 600 $см^3$;
- для биотеста на рыбах – 20 $дм^3$.

Таким образом, общий объем воды для биотестирования составил с учетом запаса воды 22 $дм^3$.

Ж.1.2 Для биоиндикации по фитопланктону отобрано 500 $см^3$ воды. Пробу сразу же законсервировали путем добавления формалина до его конечной концентрации в пробе 4 %. Для этого в пробу добавили 50 $см^3$ 40 %-ного формалина.

Пробы в этот же день доставлены в лабораторию для проведения биотестирования и гидробиологического анализа.

Ж.2 Биотестирование воды на дафниях

Пробы профильтровали через мембранный фильтр «Владипор» с диаметром пор 1,2 мкм (опытная серия). В контрольной серии использовали воду из аквариума, где содержится лабораторная культура дафний Daphnia magna St.

Дафний отлавливали из аквариума с помощью стеклянной трубки, и переносили в пустые стеклянные стаканы для биотестирования по 10 особей в каждую из трех повторностей в опытную и контрольную серии.

Затем при помощи стеклянного капилляра с грушей удалили излишек воды и сразу же осторожно прилили в опытную серию профильтрованную природную воду, а в контрольную серию – предварительно отфильтрованную воду из аквариума, по 200 $см^3$ в каждый стакан с дафниями. Таким образом, всего было получено 6 стаканов с анализируемыми пробами: три стакана контрольной серии и три опытной.

Подсчет живых и погибших дафний проводили в первые сутки через каждый час до конца рабочего дня, в дальнейшем – один раз в сутки в течение четырех дней. Таким образом, экспозиция составила 96 ч.

Данные подсчета записали в таблицу Ж.1.

Таблица Ж.1 – Данные биотестирования природной воды на дафниях

Номер пробы	Водный объект, пункт, створ, дата отбора	Дата биотестирования. Экспозиция Э, ч	Число погибших дафний, экз., в сериях								Гибель дафний, %; степень токсичности* проб воды в сериях	
			контрольной				опытной				контрольной	опытной
			Повторность			Всего	Повторность			Всего		
			1	2	3		1	2	3			
24	Водохранилище П	1.10.2012, 11.00 ч (Э=0 ч)	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
		1.10.2012 19.00 ч (Э=8 ч)	0	0	0	0	1	1	0	2	0	6
		2.10.2012 11.00 ч (Э=24 ч)	0	1	0	1	1	2	0	3	3	10
		3.10.2012 11.00 ч (Э=48 ч)	0	1	0	1	2	3	2	7	3	23
		4.10.2012 11.00 ч (Э=72 ч)	0	1	1	2	4	6	5	15	6	50; среднетоксичная
		5.10.2012 11.00 ч (Э=96 ч)	0	1	1	2	5	7	6	18	6	60; высокотоксичная (ОТД)
* Оценка степени токсичности выполнена согласно таблице 1.												

Как видно из данных таблицы Ж.1, в контрольной серии из 30 дафний погибли две, что составило 6 % исходного числа, а в опытной серии из 30 дафний погибло 18, что составило 60 % исходного числа.

В опытной серии токсичность обнаружена уже через 72 ч экспозиции, что позволило с помощью таблицы 1 (см. 10.2) оценить воду как среднетоксичную, через 96 ч степень токсичности увеличилась до высокотоксичной. Согласно таблице 1, проба оказывала ОТД на дафний.

Ж.3 Биотестирование воды на водорослях

Использовали лабораторную культуру зеленых протококковых водорослей Chlorella vulgaris Beijer с исходной численностью 6,78 млн кл./см^3. Ставили опытную серию эксперимента (с пробой воды) и контрольную серию. Для этого в стеклянные плоскодонные колбы вместимостью 250 см^3 наливали по 100 см^3 контрольной (дистиллированной с pH 7,0 - 7,5) и по 100 см^3 испытуемой воды, добавляли растворы микроэлементов по 10.3.2. Повторность определения трехкратная: воду контрольной серии и воду опытной серии наливали в три колбы и засевали водорослями из культуры.

После внесения водорослей содержимое колб перемешали и проводили подсчет клеток водорослей в камере Горяева во всех пробах

и записывали исходные показатели численности. В каждой колбе подсчет проводили трижды (см.10.3.4).

Содержимое колб, вновь перемешав, закрывали стерильными ватно-марлевыми пробками и устанавливали в люминостат. Температура в люминостате на протяжении биотестирования была в пределах 24 °С, освещенность от 3000 до 10000 лк. Пробы перемешивали два раза в сутки.

Ежедневно, т.е. через 24, 48, 72, 96 ч в одно и то же время суток проводили подсчет клеток водорослей в камере Горяева во всех пробах, результаты записывали в таблицу Ж.2.

Рассчитывали степень токсичности А, %, проб опытной серии по снижению численности клеток водорослей относительно контрольной серии по формуле 2 (см. 10.3.6). Данные подсчета записывали в таблицу Ж.2.

Таблица Ж.2 – Данные биотестирования природной воды на водорослях

Номер пробы	Водный объект, пункт, створ, дата отбора	Дата биотестирования. Экспозиция Э, ч	Численность водорослей, тыс. кл./см^3, в пробах воды								Степень токсичности воды в анализируемой пробе	
			контрольной				анализируемой					
			Повторность			Среднее значение	Повторность			Среднее значение	снижение численности клеток водорослей, %	детальная оценка токсичности
			1	2	3		1	2	3			
24	Водохранилище П	1.10.2012 11.00 ч Э=0 ч	43	38	40	40,3	44	39	42	41,7	-	-
		2.10.2012 11.00 ч Э=24 ч	90	75	80	81,7	60	55	65	60	26	малотоксичная
		3.10.2012 11.00 ч Э=48 ч	120	100	110	106,7	89	75	90	84,7	23	слаботоксичная
		4.10.2012 11.00 ч Э=72 ч	180	150	170	166,7	105	90	115	103,3	38	среднетоксичная
		5.10.2012 11.00 ч Э=96 ч	205	176	180	187	115	110	129	118	37	среднетоксичная
* Оценка степени токсичности выполнена согласно таблице 2.												

Результаты биотестирования сочли достоверными, т.к. соблюдены все условия по 10.3.8 рекомендаций:

- культура при калибровке чувствительности соответствовала установленным требованиям;

- численность клеток водорослей в контроле увеличилась в 4,6 раз за 96 ч экспозиции;

- колебания темпов роста клеток водорослей в каждой из трех повторностей в течение биотестирования была не более 5 % относительно их среднеарифметического значения;

- pH в конце эксперимента не изменилось более чем на 1,5 ед.

Ж.4 Биотестирование воды на рыбах

В качестве тест-объекта использованы мальки гуппи в возрасте двух недель.

В два аквариума наливали по 10 л отобранной воды (опытная серия), и в два других аквариума – по 10 л отстоянной водопроводной воды (контрольная серия). В каждый аквариум помещали по 10 мальков.

Биотестирование проводили в течении 96 ч. Во время биотестирования рыб не кормили.

Ежедневно подсчитывали количество живых рыб и удаляли погибших. Погибшими считали рыб, которые не подают признаков движения или дыхания при прикосновении к ним стеклянной палочкой.

Рассчитывали степень токсичности по количеству погибших рыб в опыте по отношению к контролю в процентах.

Данные подсчета записывали в таблицу Ж.3.

Таблица Ж.3 – Данные биотестирования природной воды на рыбах

Номер пробы	Водный объект	Дата биотестирования. Экспозиция Э, ч	Численность рыб, экз., в сериях				Гибель рыб в опыте по отношению к контролю, %	Детальная оценка токсичности
			контрольной		анализируемой			
			Повторность		Повторность			
			1	2	1	2		
24	Водохранилище П	1.10.2012 11.00 ч Э=0 ч	10	10	10	10	0	нетоксичная
		2.10.2012 11.00 ч Э=24 ч						
		3.10.2012 11.00 ч Э=48 ч						
		4.10.2012 11.00 ч Э=72 ч						
		5.10.2012 11.00 ч Э=96 ч						

Как видно из таблицы Ж.3, в опытной серии токсичность не обнаружена.

Ж.5 Биотестирование биомассы водорослей на дафниях

Подготовка проб и выполнение биотестирования проведены согласно 11.2 и 11.3, по формуле (3).

При биотестирования выявлена токсичность при разбавлении фильтрата в 2, 5, 10, 15 раз; проба, разбавленная в 20 раз, оказалась нетоксичной. Следовательно, безвредная кратность разбавления – разбавление в 20 раз, а последнее токсичное разбавление – в 15 раз.

Проба, разбавленная в 15 раз, была в соответствии с таблицей 2 малотоксичной (гибель дафний составила 30 %). Эта токсичность обусловлена водорослями, численность которых будет в 15 раз меньше исходной.

Ж.6 Биоиндикация по фитопланктону

Ж.6.1 Подготовка и выполнение биоиндикации по фитопланктону проведены согласно разделу 9.

Ж.6.2 Результаты биоиндикации по фитопланктону внесены в форму приложения В.

Ж.6.2.1 Номер пробы - №1.

Ж.6.2.2 Место отбора пробы воды – водохранилище П, пункт Б, створ 23, горизонт 0,5 м, вертикаль 24.

Ж.6.2.3 Дата отбора, время суток 10.10.2012 в 13 ч

Ж.6.2.4 Показатели развития фитоценоза:

- общая численность водорослей – 85,820 тыс. кл./см^3;
- общая биомасса водорослей – 32,516 мг/дм^3;
- численность синезеленых водорослей - 83,245 тыс. кл./см^3;
- биомасса синезеленых водорослей – 30,565 мг/дм^3;
- доля синезеленых в общей численности водорослей – 96 %;
- доля синезеленых в общей биомассе водорослей – 94 %;
- видовой состав синезеленых – Microcystis aeruginosa; Aphanizomenon flos-aquae; Anabaena flos-aquae; Anabaenopsis Elenkinii, Phormidium mucicola;
- доля «токсичных» видов в численности и биомассе синезеленых водорослей – 92 % от общей численности, 90 % от общей биомассы.

Ж.6.2.5 Показатели интенсивности цветения воды:

- по общей биомассе водорослей – 32,516 мг/дм^3 – цветение оценено как интенсивное;
- по биомассе синезеленых водорослей – 30,565 мг/дм^3 – цветение оценено как интенсивное.

Ж.6.2.6 Общее заключение об интенсивности цветения во время отбора пробы: интенсивное цветение.

Ж.6.2.7 Заключение о доминировании синезеленых: в пробе доминировали синезеленые водоросли, а именно: Microcystis aeruginosa; Aphanizomenon flos-aquae.

Ж.6.3 Результаты анализа проб биомассы водорослей.

Численность клеток в испытуемой пробе биомассы водорослей составила 1235,1 тыс. кл./см^3. Поскольку проба биомассы фитопланктона отобрана одновременно с пробой на фитопланктон, все характеристики: видовой состав фитоценоза, доля синезеленых в общей численности водорослей, доля синезеленых в общей биомассе водорослей и др практически идентичны.

При последнем токсичном разбавлении (в 15 раз) численность водорослей составит: 1235,1 тыс. кл./см^3 /15 = 82,34 тыс. кл./см^3.

По данным, полученным в результате анализа проб биомассы, заполнили форму приложения В.

Ж. 7 Оценка влияния фитоценозов на качество вод.

Ж.7.1 По данным, полученным в результате лабораторных работ в соответствии с разделами 9 - 12, заполнили форму приложения Е.

Ж.7.1.1 Номер пробы – № 1.

Ж.7.1.2 Биотестирование проведено на дафниях, водорослях и рыбах.

Ж.7.1.3 Результаты биотестирования проб воды:

- токсическое действие обнаружено в биотестах на дафниях и на водорослях; проба высоко токсичная в биотесте на дафниях и среднетоксичная на водорослях, нетоксичная на рыбах;

- по наиболее чувствительному тест-объекту – дафнии, проба высоко токсичная.

Ж.7.1.4 Результаты биотестирования проб биомассы водорослей на дафниях – максимально разбавленная токсичная проба – проба с разбавлением в 15 раз. Эта токсичность обусловлена водорослями, численность которых составит 82,34 тыс. кл./см^3.

Ж.7.1.5 Результаты анализа проб по фитопланктону:

- численность клеток в испытуемой пробе воды – 85,820 тыс. кл./см^3; биомасса – 32,516 мг/дм^3;

- доля синезеленых в численности 96 % в биомассе 94 %;

- показатели соответствуют интенсивному цветению;

- численность клеток в испытуемой пробе биомассы водорослей – 1235,1 тыс. кл./см^3; биомасса – 2676,05 мг/дм^3.

Ж.7.1.6: Характеристика загрязненности воды по критериям ВЗ и ЭВЗ:

- содержание характерных загрязняющих веществ нитритный азот, соединения железа 2-4 ПДК (менее ВЗ и ЭВЗ);

- вещества 1-2-го классов опасности отсутствуют.

Ж.7.1.7 Заключение о влиянии фитоценоза на качество воды по результатам биотестирования, биоиндикации по фитопланктону и загрязненности – следует заключить, что при интенсивном цветении воды водохранилища качество воды на вертикали № 24 формируется под влиянием отмирания синезеленых водорослей и выходом внутриклеточных токсинов в водную среду. Токсичность не связана с химическим загрязнением.

Библиография

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

[2] Методика выполнения измерений. Биологические методы контроля. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей (ФР.1.39.2007.03223).

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

[4] Никаноров А.М., Хоружая Т.А., Бражникова Л.В., Жулидов А.В. Мониторинг качества вод: оценка токсичности. – СПб.: Гидрометеоиздат, 2000. – 159 с.

[5] Порядок подготовки и представления информации общего назначения о загрязнении окружающей природной среды (утвержден приказом Росгидромета от 31 октября 2000 г. № 156).

Ключевые слова: методы оценки, токсическое влияние, фитоценозы планктона, качество поверхностных вод суши

Лист регистрации изменений

Номер изме-нения	Номер страницы				Номер документа (ОРН)	Подпись	Дата	
	изме-ненной	заме-ненной	новой	аннули-рованной			внесения измене-ния	введения измене-ния

gost.e-ecolog.ru