МИНИСТЕРСТВО ПРИРОДНЫХ РЕСУРСОВ И ЭКОЛОГИИ

РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральная служба по гидрометеорологии

и мониторингу окружающей среды (Росгидромет)

РЕКОМЕНДАЦИИ

Р
52.24.695-
2007

ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПРИРОДНЫХ ВОД И ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ ПО КОЭФФИЦИЕНТУ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОПУЛЯЦИИ

Ростов-на-Дону
2008

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАНЫ Государственным учреждением «Гидрохимический институт» Росгидромета

2 РАЗРАБОТЧИКИ А.М. Никаноров, чл.-корр. РАН, руководитель разработки; Е.Н. Бакаева, д-р. биол. наук; Г.Г. Черникова; Н.А. Игнатова

3 УТВЕРЖДЕНЫ Заместителем Руководителя Росгидромета 15.11.2007 г.

4 ЗАРЕГИСТРИРОВАНЫ ЦМТР ГУ «НПО «Тайфун» за номером Р 52.24.695-2007 от 4.12. 2007 г.

5 ВВЕДЕНЫ ВПЕРВЫЕ

© Росгидромет, ГУ ГХИ, 2008

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 2
4 Общие положения 4
5 Основные принципы биотестирования природных вод 6
6 Основные принципы биотестирования донных отложений 7
7 Формирование сети пунктов и программ наблюдений 7
8 Отбор, хранение и подготовка проб вод суши для биотестирования 7
9 Отбор, хранение и подготовка проб донных отложений для биотестирования 8
10 Методика биотестирования по коэффициенту регенерации популяции 10
10.1 Принцип метода 10
10.2 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, оборудование, реактивы 10
10.3 Подготовка и проведение биотестирования 11
10.4 Регистрация количества отмерших особей 11
10.5 Регистрация молоди тест-объектов 11
10. 6 Расчет коэффициента регенерации популяции 12
10.7 Оценка токсического загрязнения проб воды и донных отложений 12
11 Требования безопасности, охраны окружающей среды 12
12 Требования к квалификации оператора 13
Приложение А (рекомедуемое) Тест-объекты и методы учета популяционных характеристик 14
Приложение Б(рекомендуемое) Гидробионты с различными экологическими особенностями, используемые в качестве тест-объектов 15
Приложение В (рекомендуемое) Определение живых и мертвых клеток сине-зеленых и зеленых микроводорослей с помощью красителей 17
Библиография 20

Введение

Метод биотестирования основан на использовании тест-объектов, с помощью которых можно адекватно оценить токсическое действие загрязненных вод. Гидробионты, используемые в качестве тест-объектов, чувствительны ко всем гидрохимическим показателям. Поэтому использование для оценки токсического загрязнения вод и донных отложений водных объектов экологически не соответствующих тест-объектов приводит к искажению результатов оценки качества вод. Кроме того, предлагаемые методики биотестов основаны, как правило, на использовании только одного тест-показателя.

Целью настоящих рекомендаций является совершенствование методической базы биотестирования токсического загрязнения природных вод, осуществляемого в рамках мониторинга поверхностных водных объектов.

Рекомендации дают возможность повысить достоверность исследований за счет:

- возможности выбора тест-объекта, экологически соответствующего исследуемому региону, т.е. характерному для исследуемого водного объекта;
- использования нового тест-показателя – коэффициента регенерации. В основу расчета коэффициента регенерации положены два основных показателя состояния популяции – гибель и количество молоди. Сочетание этих двух показателей, выраженное в виде коэффициента регенерации, дает основание для прогноза существования популяции в испытываемой среде.

Предлагаемый коэффициент регенерации не заменяет существующие тест-показатели (гибель, прирост клеток, дыхание, фотосинтез и др.), но значительно повысит достоверность результатов при использовании в наборе биотестов. Исследование одной пробы проводят, как минимум на трех тест-объектах, одним из обязательных является ветвистоусый рачок Daphnia magna (Р 52.24.566-04).

РЕКОМЕНДАЦИИ

ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПРИРОДНЫХ ВОД И ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ ПО КОЭФФИЦИЕНТУ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОПУЛЯЦИИ

Дата введения 2008-01-01

1 Область применения

Настоящие рекомендации устанавливают методику биотестирования и требования к порядку проведения и оценке токсического загрязнения вод суши и донных отложений водных экосистем в составе системы мониторинга поверхностных водных объектов (ПВО).

Рекомендации предназначены для оперативно-производственных подразделений территориальных управлений по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды (УГМС) Росгидромета, осуществляющих организацию и проведение наблюдений за состоянием ПВО в рамках Государственной службы наблюдений (ГСН) России.

Настоящие рекомендации могут быть использованы в качестве методического пособия специалистами и практическими работниками природоохранных организаций, осуществляющих наблюдения за загрязнением окружающей среды.

2 Нормативные ссылки

2.1 В настоящих рекомендациях использованы ссылки на следующие нормативные документы:

ГОСТ 17.1.1.01-77 Охрана природы. Гидросфера. Использование и охрана вод. Основные термины и определения

ГОСТ 17.1.3.07-82 Охрана природы. Гидросфера. Правила контроля качества воды водоемов и водотоков

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 19179-73 Гидрология суши. Термины и определения

ГОСТ 27065-86 Качество вод. Термины и определения

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

РД 118-02-90. Методическое руководство по биотестированию воды

РД 52.18.595-96 Федеральный перечень методик выполнения измерений, допущенных к применению при выполнении работ в области мониторинга загрязнения окружающей природной среды

РД 52.24.609-99 Организация и проведение наблюдений за содержанием загрязняющих веществ в донных отложениях

РД 52.24.635 -2002 Методические указания. Проведение наблюдений за токсическим загрязнением донных отложений в пресноводных экосистемах на основе биотестирования

РД 52.24.669-2005 Унифицированные методы биотестирования для обнаружения токсического загрязнения поверхностных вод суши с использованием зоопланктона

Р 52.24.566-94 Методы токсикологической оценки загрязнения пресноводных экосистем

Р 52.24.309-2004 Организация и проведение режимных наблюдений за загрязнением поверхностных вод суши на сети Росгидромета

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

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

3 Термины и определения

В настоящих рекомендациях использованы следующие термины и определения:

3.1 **анализ проб воды**: Определение физических, физико-химических, химических, биологических, токсических свойств и состава воды (Р 52.24.566).

3.2 **биотестирование (биологическое тестирование)**: Оценка качества объектов окружающей среды (воды и др.) по ответным реакциям живых организмов, являющихся тест-объектами (РД 52.24.635).

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

3.4 **водный объект**: Сосредоточение природных вод на поверхности суши в формах ее рельефа, либо в недрах, имеющее границы, объем и черты водного режима (РД 52.24.635).

3.5 **загрязнение воды водоемов и водотоков**: Процесс изменения состава и свойств воды водоемов и водотоков под влиянием поступающих в воду загрязняющих веществ, микроорганизмов, тепла, приводящих к ухудшению качества воды (Р 52.24.309).

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

3.7 **качество воды**: Характеристика состава и свойств воды, определяющая пригодность ее для конкретных видов водопользования (ГОСТ 17.1.1.01).

3.8 **критерий токсичности**: Значение показателя токсичности, на основании которого судят о наличии токсического действия (РД 118-02).

3.9 **острое токсическое действие** (острая токсичность): Воздействие, вызывающее быструю ответную реакцию тест-объекта. Острое токсическое действие чаще всего определяют по тест-реакции «гибель» или «выживаемость» в условиях кратковременного биотестирования. При использовании коловраток и других организмов микрозоопланктона длительность воздействия составляет от 6 до 24 ч [1]. Острое токсическое действие наиболее опасно для живых организмов.

3.10 **подострое токсическое действие**: Воздействие, вызывающее среднюю по времени ответную реакцию тест-объекта. Подострое токсическое действие чаще всего определяют по тест-реакции «гибель» или «выживаемость» в условиях кратковременного биотестирования. При использовании коловраток и других организмов микрозоопланктона длительность воздействия составляет 48 - 72 ч [1].

3.11 **показатель токсичности**: Признак тест-объекта, используемый для оценки токсичности воды (РД 118-02).

3.12 **популяция:** Совокупность особей одного вида с общим генофондом, в течение большого числа поколений населяющих определенное пространство с относительно однородными условиями обитания. Популяция имеет сложную, обычно самоподдерживающуюся

структуру; ее разделяют по полу, возрасту, пространственным и близкородственным объединениям особей [2].

3.13 **проба воды**: Количество воды, предназначенное для биотестирования.

3.14 **регенерация:** Восстановление организмом утраченных или поврежденных органов и тканей [2] .

3.15 **результат биотестирования:** Конечный вывод о токсичности водной среды, установленный в ходе биотестирования.

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

3.17 **токсичность воды:** Свойство воды вызывать патологические изменения или гибель организмов, обусловленные присутствием в ней токсичных веществ (РД 118-02).

3.18 **токсикологический эксперимент:** Эксперимент, в ходе которого оценивают влияние на тест-объект испытываемой воды или химического соединения. Состоит из двух серий: опыт (с воздействием воды или химического соединения) и контроль (без воздействия, но в тех же условиях) (Р 52.24.566).

3.19 **условно чистый участок водного объекта:** Обычно это фоновый створ.

3.20 **фоновый створ:** Створ, расположенный на расстоянии не менее 1 км выше источника загрязнения (Р 52.24.566).

3.21 **хроническое токсическое действие (хроническая токсичность):** Воздействие, вызывающее ответную реакцию тест-объекта, проявляющуюся в течение относительно длительного периода времени. Хроническое токсическое действие измеряют по тест-показателям «выживаемость», «плодовитость», «изменение роста» и другим реакциям при длительном биотестировании (Р 52.24.566).

3.22 **эндобентосные организмы:** организмы, населяющие толщу донных отложений [3].

3.23 **эпибентосные организмы:** организмы, населяющие поверхность дна водоема [3].

4 Общие положения

4.1 Методика биотестирования по коэффициенту регенерации популяции является универсальной, поскольку её используют:

- для тест-объектов различного трофического уровня и систематической принадлежности (приложение А);

- для оценки токсичности вод и донных отложений (водных вытяжек и необработанных донных отложений) водных объектов;

- для оценки токсичности вод водотоков и водоемов различной солености и зон смешения речных и морских вод;

- для оценки как острого, так и хронического действия.

4.2 Длительность биотестирования (продолжительность экспозиции) зависит от жизненного цикла выбранного тест-объекта. Микроводоросли за сутки дают до 8 поколений, инфузории – до 4-6, коловратки – до 3.

4.3 Экспрессное тестирование проводят либо, используя экспрессный тест-показатель (скорость фильтрации пищи организмами-фильтраторами, скорость фотосинтеза растительных тест-объектов), либо с использованием короткоцикличных тест-объектов (микроводоросли, простейшие, коловратки).

4.4 Для оценки токсического загрязнения используют не менее трех биотестов, либо трех тест-показателей. Набор биотестов и тест-показателей составляют в зависимости от водного объекта и цели исследования.

4.5 Биотестирование по коэффициенту регенерации популяции является региональным. В приложении Б представлен набор тест-объектов с учетом их экологических особенностей.

4.6 Биотестирование вод и донных отложений водных объектов основано на определении показателей токсичности опытной пробы воды и донных отложений, отобранной в зоне влияния источника загрязнения, и их отличий от контрольной пробы, отобранной на условно чистом участке водного объекта (Р 52.24.635).

4.7 Биотестирование вод и донных отложений водных объектов проводят в режимных наблюдениях и для решения оперативных задач с целью проверки соответствия качества вод и донных отложений отдельных проб установленным нормам. В режимных наблюдениях на основе систематических данных биотестирования оценивают токсикологическое состояние водных объектов или их участков. В ходе решения оперативных задач оценивают токсичность отдельных проб воды с целью выяснения чрезвычайных экологических ситуаций (Р 52.24. 635).

4.8 Анализу подвергают как необработанные донные отложения, так и водные вытяжки. В случае использования в качестве тест-объектов планктонных организмов исследуют водные вытяжки из

донных отложений, в случае использования эпи- и эндобентосных организмов - необработанные донные отложения.

4.9 В принятом на сегодняшний день перечне нормирования показателей качества вод указано: вода фонового створа (условно чистый створ, расположенный выше источника загрязнения) не должна оказывать токсического хронического и тем более острого действия на тест-объекты, используемые для биотестирования.

4.10 В ходе биотестирования воды и донных отложений устанавливают отсутствие или наличие токсического (острого, подострого, хронического) действия испытываемой пробы для биологических объектов, без идентификации загрязняющих веществ и их количественных характеристик (РД 52.24.635).

5 Основные принципы биотестирования природных вод

Методы биотестирования природных вод имеют ряд общих принципов с методами биотестирования сточных вод, однако имеют и существенные особенности (Р 52.24.662):

- необходимость четких стандартных условий и процедуры биотестирования в связи с нивелированием действия антропогенного фактора (относительно низкими концентрациями загрязняющих веществ) и влиянием естественных физико-химических параметров водной среды;
- использование двух контрольных серий (на дехлорированной водопроводной воде исследуемого региона и на воде фонового створа);
- обязательное наличие данных о параметрах гидрохимического режима водного объекта и использование испытываемой воды без их изменения;
- биотестирование проводят на нефильтрованной воде, при наличии взвешенных частиц - на нефильтрованной и фильтрованной;
- преимущественное использование методов непрерывного биотестирования (без постановки отдельных экспериментов по установлению острого и хронического токсического действия, т.е. отсутствие острого токсического действия в кратковременном опыте позволяет продолжить тот же опыт без замены среды и популяций тест-объектов для определения хронического токсического действия).

6 Основные принципы биотестирования донных отложений

Методы биотестирования донных отложений имеют ряд общих принципов с методами биотестирования природных вод, но имеют и специфику (Р 52.24.662):

а) в зависимости от поставленных задач и имеющихся в наличии тест-объектов биотестирование проводят:

- на необработанной пробе донных отложений. Для анализа такой пробы желательно использовать в качестве тест-объектов представителей бентоса, т.е. организмов, для которых естественной средой обитания являются донные отложения, например, хирономиды, моллюски;
- на водной вытяжке (экстракте) донных отложений. Для анализа такой пробы можно использовать любые тест-объекты;

б) использование в контрольной серии донных отложений с фонового участка, имеющих идентичный тип грунта (ил, песок), гранулометрический состав и, желательно, уровень органического загрязнения;

в) донные отложения в зависимости от типа (песок, ил, ракушечник) имеют особенности в получении водных вытяжек.

7 Формирование сети пунктов и программ наблюдений

В составе системы мониторинга поверхностных водных объектов режимные наблюдения по токсикологическим показателям методами биотестирования проводят по программам работ территориальных УГМС в соответствии с требованиями РД 52.24.309 – для поверхностных вод суши, РД 52.24.609, РД 52.24.635 – для донных отложений.

8 Отбор, хранение и подготовка проб вод суши для биотестирования

8.1 Пробы вод суши отбирают с учетом требований ГОСТ 17.1.5.05 и Р 52.24.566.

8.2 Объем пробы должен быть не менее 50 мл.

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

8.4 Сосуды необходимо маркировать.

8.5 Перед заполнением сосудов воду фильтруют через газ №70-76 (для удаления природного планктона) и несколько раз ополаскивают сосуд. Заполняют водой полностью.

8.6 Анализ проб воды по определению токсичности проводят не позднее 6 ч после отбора проб.

8.7 В случае невозможности проведения исследований за указанный в 8.6 срок пробы охлаждают до +4 ^{0}С или замораживают согласно ГОСТ Р 51592 и хранят до 30 сут.

8.8 Консервирование проб химическими веществами не допускается.

8.9 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).

8.10 Пробу делят на две части для проведения биотеста на фильтрованной (пропущенной через бумажный фильтр для удаления взвешенных веществ) и нефильтрованной воде.

9 Отбор, хранение и подготовка проб донных отложений для биотестирования

9.1 Отбор проб донных отложений проводят согласно ГОСТ Р 51592, РД 52.24.635, Р 52.24.662, используя способы и устройства, предусмотренные в РД 52.24.609.

9.1.1 Помимо проб донных отложений, для токсикологического анализа обязательно отбирают воду на этом же участке, желательно из придонного слоя согласно ГОСТ 17.1.5.04, ГОСТ 17.1.5.05 для подготовки пробы донных отложений, получения вытяжек, разбавления и т.д.

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

9.1.3 Пробы не консервируют.

9.2 Хранят пробы во влажном состоянии не более 1 сут при температуре не выше +5 °С. Сразу после отбора пробы помещают в холодильник или в прохладное место уже на борту экспедиционного судна.

9.2.1 Биотестирование проводят не позднее, чем через 1 сут.

9.2.2 Допустимо замораживание проб. В замороженном состоянии пробы можно хранить в течение 60 сут при температуре минус 15-20 °С.

9.3 Подготовку опытной и контрольной пробы, отобранной на фоновом створе, проводят одновременно с помощью одних и тех же процедур.

9.4 Каждая опытная проба должна иметь контроль с идентичным типом и характеристиками донных отложений. Если тип донных отложений в опытных пробах различен, то каждая опытная проба должна сопровождаться контрольной.

9.5 Подготовка проб для разных вариантов биотестирования (необработанная проба и водная вытяжка) основана на следующем:

9.5.1 Биотестирование проводят на пробах с естественной влажностью (без высушивания).

9.5.2 Для биотестирования необработанной пробы ее во влажном состоянии просеивают через сито с порами от 0,5 до 1,5 мм для удаления обломков раковин, камней, водорослей и отмерших организмов, используя природную воду, отобранную одновременно с донными отложениями. Количество используемой для этой процедуры воды должно быть минимальным. Дают воде и полученному осадку отстояться в течение 6 ч. Сливают с помощью сифона большую часть воды в сосуд и сохраняют ее. Осадок перемешивают с оставшейся водой и используют для анализа.

Осадок можно хранить во влажных условиях (в плотно закрытом полиэтиленовом пакете) при температуре от 2 °С до 4 °С не более суток. В случае отсутствия возможности провести биотестирование в течение указанного времени, допускается замораживание осадка при температуре от минус 15 °С до минус 20 °С и хранение его в течение 60 сут по РД 52.24.635.

Наиболее объективная оценка токсического загрязнения донных отложений может быть получена при проведении биотестирования непосредственно после отбора проб.

9.5.3 Для биотестирования водной вытяжки полученный осадок (по 9.5.2) помещают в чашки Петри и оставляют на воздухе при температуре (20±5) °С для получения воздушно-сухой пробы. К навеске массой 100 г добавляют природную воду (отобранную с фонового участка) или отстоянную водопроводную воду (если биотестирование проводят после длительного хранения донных отложений в замороженном состоянии) в соотношении 1:4 согласно РД 52.24.635 или 1:5.

Водный экстракт можно получить встряхиванием на шейкере в течение 1 ч с частотой 150 раз в минуту, либо вручную в течение 1 ч.

Одну часть (1/2) водной вытяжки используют для биотестирования без фильтрования для анализа токсичности, обусловленной взвешенными веществами. Другую часть (1/2) фильтруют через бумажный фильтр до получения прозрачного фильтрата для оценки токсичности, обусловленной присутствием растворенных в воде загрязняющих веществ.

9.6 Биотестирование водной вытяжки донных отложений проводят с использованием любых планктонных тест-объектов (микроводоросли, инфузории, коловратки, рачки и др.).

9.7 Биотестирование необработанной пробы донных отложений проводят с использованием эндо- и эпибентосных организмов (моллюски, олигохеты и др.).

9.10 Отбор проб и анализ должен проводить специалист-гидробиолог. В случае близкого расположения институтов с соответствующими специалистами можно представить пробы для анализа. Однако следует учитывать условия и сроки хранения проб воды и донных отложений (п.8, 9).

10 Методика биотестирования по коэффициенту регенерации популяции

10.1 Принцип метода

Метод основан на оценке влияния испытываемой воды, фильтрованной водной вытяжки донных отложений и необработанных донных отложений, отобранных из водоемов и водотоков, на гибель и размножение лабораторных культур тест-объектов. Влияние испытываемых проб оценивают по изменению коэффициента регенерации популяции микроводорослей, микро- мезозоопланктона, моллюсков и др. тест-объектов при экспозиции их в испытываемой среде по сравнению с контролем.

10.2 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, оборудование, реактивы

Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы, оборудование, реактивы должны соответствовать методике с выбранным тест-объектом:

- для микроводорослей согласно Р 52.24.566, РД 118-02, Р 52.24.690;

- для инфузорий согласно Р 52.24.566, Р 52.24.669;
- для коловраток согласно Р 52.24.566, Р 52.24.662, РД 52.24.669;
- для дафний согласно Р 52.24. 566, Р 118-02, РД 52.24.635;
- для хирономид согласно РД 52.24.635;
- для артемий согласно РД 52.24.690, Р 52.24.635;
- для рыб согласно Р 52.24.566.

10.3 Подготовка и проведение биотестирования

Подготовка и проведение биотестирования должны соответствовать методике с выбранным тест-объектом (см. 10.2).

10.4 Регистрация количества отмерших особей

10.4.1 Учет количества отмерших особей крупных тест-объектов (ракообразных, рыб) проводят обычно визуально, мелких тест-объектов (микроводорослей, инфузорий, коловраток) - с использованием микроскопа. Методики регистрации и учета отмерших особей должны соответствовать выбранному тест-объекту. Они приведены в рекомендациях и руководящих документах (см. 10.2 и приложение В).

10.4.2 Регистрацию и учет отмерших клеток микроводорослей проводят с применением люминесцентного микроскопа или красителей. Учет отмерших микроводорослей с использованием обычного светового микроскопа проводят посредством витального окрашивания красителями метиленовым синим и нейтральным красным. Методика витального (прижизненного) окрашивания приведена в приложении В.

10.5 Регистрация молоди тест-объектов

10.5.1 Способ регистрации и учета молоди выбранных тест-объектов зависит от их биологических особенностей. Методики учета численности тест-объектов изложены в соответствующих рекомендациях и нормативных документах (см.10.2).

10.5.2 Учет количества молоди микроводорослей проводят, рассчитывая прирост общей численности.

10.5.3 Учет количества молоди моллюсков проводят по числу кладок, по числу икринок, по числу выклюнувшихся личинок.

10. 6 Расчет коэффициента регенерации популяции

Коэффициент регенерации рассчитывают по формуле

$$Kp = (Nj - Nм)_{опыт}/(Nj - Nм)_{контроль} \qquad (10.1)$$

где Nj – количество молодых особей, шт.;
Nм - количество мертвых особей, шт..

10.7 Оценка токсического загрязнения проб воды и донных отложений

10.7.1 Оценку токсического действия проводят согласно критериям таблицы 1.

В случае, если значения коэффициента регенерации опытной и контрольных проб одинаковы, значение коэффициента регенерации популяции равняется 1.

Таблица 1 - Оценка токсичности проб воды, необработанных донных отложений и их водных вытяжек по коэффициенту регенерации популяции

Значение коэффициента*	Токсическое действие (ТД)
1±0,20	Нет ТД
1±0,25	Хроническое ТД
1±0,5	Подострое ТД
1±0,75 (гибель более 75 % особей)	Острое ТД
*Стимулирование и ингибирование образования молоди расценивается как оказывающее токсическое действие	

10.7.2 Токсическое загрязнение оценивается словесно. Согласно критериям выделяют хроническое, подострое, острое токсическое действие и отсутствие токсического действия. В случае гибели более 75 % взятой в опыт популяции коэффициент регенерации не рассчитывают.

11 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 не предъявляется.

12 Требования к квалификации оператора

К выполнению экспериментальных работ методами биотестирования допускаются лица, имеющие биологическое, экологическое образование и знакомые с основами водной токсикологии и методами полевых и лабораторных гидробиологических исследований.

Приложение А
(рекомедуемое)

Тест-объекты и методы учета популяционных характеристик

Таблица А.1 - Тест-объекты и методы учета популяционных характеристик

Тест-объект	Метод учета	
	Молодь (ювенильные особи)	Гибель (отмершие особи)
Микроводоросли: CHLOROPHYTA (Зеленые) родов Chlorella, Scendesmus; CIANOPHYTA(Сине-зеленые) родов Synechocistis, Microcistis Bacillariophyta (Диатомовые): Thalassiosira pseudonana, Phaeodactylum tricornutum, Sceletonema costatum, род Chaetoceros	Микроскопирование: подсчет численности	Микроскопирование: подсчет количества отмерших клеток с использованием люминесцентного или светового микроскопа (витальное окрашивание)
PROTOZOA (Простейшие) родов Paramecium,Tetrachimena, Colpidium, Stylonichia	Микроскопирование: -индивидуальные линии - подсчет численности	Микроскопирование: подсчет количества погибших особей
ROTATORIA(Коловратки) Brachionus calyciflorus, B. rubens, *B.plicatilis*, *Philodina roseola*, P. acuticornis	Микроскопирование: -индивидуальные линии - подсчет молоди	Микроскопирование: подсчет количества погибших особей
CRUSTACEA (Ракообразные) Dapnia magna, Moina macrocopa, Ceriodaphnia recticulata, Artemia salina	Визуально: - поведение - подсчет молоди	Визуально: подсчет количества погибших особей
OLIGOCHAETA (Малощетинковые черви) Aeolosoma hemprichi	Визуально: - поведение - наличие кладок	Визуально: подсчет количества погибших особей
Mollusca (Моллюски) Lymnaea stagnalis, Anadonta sp., p.Mytilis, p. Dreissena	Визуально: - количество кладок - количество молоди	Визуально: подсчет количества погибших особей
Рыбы Poecilia reticulate, Brachydanio rerio	Визуально: количество молоди	Визуально: подсчет количества погибших особей
Insecta (Насекомые) Chironomus plumosus	Визуально: наличие коконов	Визуально: подсчет количества погибших особей

Приложение Б
(рекомендуемое)

Гидробионты с различными экологическими особенностями, используемые в качестве тест-объектов

Таблица Б.1 - Список гидробионтов, используемых в качестве тест-объектов, в связи с их экологическими особенностями

Тест-объект	Пресноводные	Солоноватоводные	Теплолюбивые	Холодолюбивые	Олигосапробы	Мезосапробы	Ацидофилы	Алкофилы
МИКРОВОДОРОСЛИ								
CHLOROPHYTA (зеленые):								
Chlorella vulgaris	+		+			+		
Chlorella marina		+	+			+		
Scenedesmus qudricauda	+		+			+		
Scenedesmus obliquus	+		+			+		
Dunaliella sp.		+	+	+	+			
Nephrochloris sp.		+	+	+	+			
CIANOPHYTA(Сине-зеленые):								
Anabaena flos-aquae	+		+			+		
Oscillatoria sp.	+	+	+			+		
Synechocistis sp.	+	+				+		
Microcistis aeruginosa	+		+			+		
Bacillariophyta (Диатомовые):								
Thalassiosira pseudonana		+		+	+			
Phaeodactylum tricornutum		+	+		+			
Sceletonema costatum		+		+	+			
Chaetoceros sp.		+		+	+			
PROTOZOA (Простейшие):								
Paramecium caudatum	+	+				+		+
Paramecium putrinum	+	+				+		
Tetrachimena pyriformis	+	+				+	+	+
Colpidium sp.	+					+		
Stylonichia mytilus	+					+		

Окончание таблицы Б.1

Euplotis harpa		+			+			
Euplotis vannus (бентический)		Мор-ской		+				
Cristira sp. (бентический)		+		+				
Uronema marinum (бентический)		+		+				
Pavella sp. (пелагический)		+		+	+			
Balanoin sp. (пелагический)		+		+	+			
ROTATORIA (Коловратки):								
Brachionus calyciflorus	+		+				+	+
Brachionus rubens	+		+	+				+
Brachionus plicatilis		+	+				+	+
Philodina roseola	+		+				+	
Pilodina acuticornis odiosa	+		+				+	
CRUSTACEA (Ракообразные):								
Dapnia magna	+		+			+		
Moina macrocopa	+		++			+		
Bosmina longirostris	+		+	+	+			
Ceriodaphnia recticulata	+		+			+		
Artemia salina		+				+		
MOLLUSCA (Моллюски):								
Lymnaea stagnalis	+		+					
Anadonta sp.	+		+					
Dreissena sp.	+	+	+	+				
Crassostrea virginica устрицы		+	+	+		+		+
Ostrea irridescens устрицы		+	+			+		+
Mytilus gallopronvincialis мидии		+	+			+		+
Mytilus edulis мидии		+	+			+		+
Mya arenaria		+	+			+		+
Mytilaster sp.		+	+			+		+
Patella vulgata		+	+			+		+
Rapana tomassina		+	+	+		+		+
OLIGOCHAETA (малощетинковые черви)								
Aeolosoma hemprichi	+		+				+	
INSECTA (Насекомые):								
Chironomus plumosus	+		+	+				+

Примечание – Знаком «+» обозначено наличие указанных экологических особенностей

Приложение В
(рекомендуемое)

Определение живых и мертвых клеток сине-зеленых и зеленых микроводорослей с помощью красителей

При определении токсичности различных сред (воды, водных вытяжек донных отложений, растворов химических веществ) выявляют жизнеспособность клеток микроводорослей. Дифференциация клеток на живые и мертвые является показателем эффективности токсического действия различных альгицидов.

В.1 Определение живых и мертвых клеток сине-зеленых и зеленых микроводорослей с помощью красителей

Известны различия живых и мертвых клеток водорослей, возникающие при нарушении отдельных процессов метаболизма, под воздействием различных красителей. В основе действия красителей лежат различия в проницаемости и адсорбции их живой или мертвой клеткой. Обычно в таких методиках для определения жизненности водорослей используют один краситель, дающий либо только витальную (прижизненную) окраску, либо выявляющие мертвые клетки.

Представленная модификация метода (Хоботьев и др., 1971) дифференциального окрашивания предусматривает применение двух красителей: одного витального, четко выявляющего наличие живых и неповрежденных клеток, другого, окрашивающего мертвые и поврежденные клетки.

Преимуществом комбинированного метода окрашивания водорослевых клеток является наличие наиболее растянутого диапазона чувствительности красителей, что дает возможность выявить не только конечные, но и более четко определить промежуточные состояния жизненности клеток.

В.2 Приготовление растворов красителей

При использовании метода комбинированного окрашивания клеток зеленых и сине-зеленых водорослей используют следующие красители:

- метиленовый синий. Раствор готовят из расчета на 1 л 200 мг красителя, который растворяют в фосфатном буфере, содержащем 18, 2 г/л KH_2PO_4 и

28,1 г/л Na_2HPO_4. pH приготовленного раствора доводят до 6, 8-7,0;

- нейтральный красный. Готовят 0,1 % раствор на дистиллированной воде.

- трифенилтетразолхлорид. Раствор 0,2% готовят на дистиллированной воде.

- азур-эозин. Раствор 0,1 % готовят на дистиллированной воде.

В. 3 Техника проведения окрашивания.

В. 3.1 Для определения живых и мертвых клеток зеленых водорослей, например, родов Scenedesmus и Chlorella используют красители метиленовый синий и нейтральный красный. К 1 мл суспензии водорослей добавляют 1 мл метиленового синего и нейтрального красного в разведении 1:5000. Растворы красителей и суспензии водорослей тщательно перемешивают, выдерживают 20 минут, затем микроскопируют. При одновременной окраске метиленовый синий окрашивает мертвые клетки в синий цвет. Нейтральный красный окрашивает живые клетки в розовый цвет.

При окрашивании растворами метиленового синего и нейтрального красного в разведении 1:10000 автоспор, образующихся после распада ценобиев зеленых водорослей, окраска их получается голубовато-зеленого цвета вследствие нарушения проницаемости оболочки под действием токсических веществ. Метиленовый синий легче проникает в погибшую клетку, чем нейтральный красный в живую, поэтому клетки с голубовато-зеленым цветом обычно просчитывают как мертвые.

В.3.2 Для определения живых и мертвых клеток сине-зеленых водорослей, например, родов анацистис, анабена, используют красители трифенилтетразолхлорид (ТТХ) и азур-эозин. К 1 мл суспензии водорослей добавляют столько капель 0,2 % раствора ТТХ, чтобы его конечная концентрация в среде составляла 0,075 % и 1-2 капли 0,1 % раствора азур-эозина.

Пробы тщательно перемешивают и помещают на 16-20 ч на рассеянный свет, затем микроскопируют. ТТХ окрашивает живые клетки в ярко-красный цвет, а азур-эозин мертвые клетки в фиолетовый цвет. При окрашивании живых клеток происходит восстановление ТТХ в формазон, клетки, убитые токсичными веществами, утрачивают способность к такому восстановлению ТТХ.

Определение числа живых и мертвых клеток водорослей проводят путем непосредственного подсчета окрашенных клеток в специальной камере Горяева или Фукс-Розенталя, имеющих определенный объем. Одновременно проводят подсчет выборочно по диагонали в 10 больших квадратах камеры. Для получения наиболее достоверных данных о численности водорослей подсчет необходимо проводить не менее 3 раз, каждый раз производя смену растворов. Затем берется среднее арифметическое из всех подсчетов клеток и рассчитывают на количество живых и мертвых клеток, отдельно содержащихся в 1 мл или 1 л раствора.

В. 4 Прижизненная оценка живых и мертвых клеток микроводорослей с помощью люминесцентного микроскопа

Микроскопы биологические исследовательские универсальные, например МБИ-15, содержат светофильтры для возбуждения люминесценции ультрафиолетовыми лучами. Техническое описание и инструкция по эксплуатации микроскопа содержат порядок подсчета клеток микроводорослей. При возбуждении люминесценции синефиолетовым цветом (длина волны 400-440 нм) в изображении можно наблюдать зеленоватую, желтую и красный цвета микроводорослей. Зеленый цвет имеют мертвые клетки микроводорослей, желтый – в стадии отмирания, красный – живые.

Для определения соотношения живых и мертвых клеток каплю исследуемой воды или водной вытяжки наносят на предметное стекло и просчитывают 100 клеток микроводорослей, меняя поля зрения и учитывая живые (красные клетки) и мертвые (желто-зеленые) и отмирающие (желто-красные). К мертвым относят клетки, имеющие и желто-зеленую и желто-красную окраску. Количество мертвых клеток рассчитывают по формуле

$$N_м = N_о - N_ж \qquad (В.1)$$

где $N_м$ – количество мертвых (желто-зеленые, желто-красные) клеток, шт.;

$N_о$ – количество просчитанных под микроскопом клеток (100 штук);

$N_ж$ – количество живых (красных) клеток, шт..

Библиография

[1] Бакаева Е.Н., Никаноров А.М. Гидробионты в оценке качества вод. М.: Наука, 2006. – 238 с.

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

[3] Константинов А.С. Общая гидробиология Высш.шк..1986. – 470 с.

[4] Хоботьев В.Г., Илларионова в.И., Юнасова Т.Н. Методика определения живых и мертвых клеток сине-зеленых и зеленых водорослей с помощью красителей /Методики биологических исследований по водной токсикологии. М.: Наука, 1971.- 276 с.

ЛИСТ РЕГИСТРАЦИИ ИЗМЕНЕНИЙ

Номер изменения	Номер листа (страницы)				Номер документа (ОРН)	Подпись	Дата	
	измененного	замененного	нового	аннулированного			внесения изменений	введения изменений

gost.e-ecolog.ru