

РЕКОМЕНДАЦИИ

ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД СУШИ В УСЛОВИЯХ ЧРЕЗВЫЧАЙНЫХ СИТУАЦИЙ МЕТОДОМ ЭКСПРЕССНОГО БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Введение

Метод биотестирования широко используется в последнее время для оценки токсичности и поверхностных вод, и донных отложений. Информация, получаемая в ходе биотестирования дает информацию о воздействии на гидробиоту всего комплекса находящихся в водном объекте веществ. В случаях экстремально высоких загрязнений и в условиях чрезвычайных ситуаций (ЧС) необходимо получение оперативной информации для принятия управленческих решений. В связи с чем необходимо использовать экспрессные методики биотестирования.

Настоящие рекомендации отвечают требованиям оперативности получения биологической информации: 1) реакция хемотаксиса позволяет практически за 1 ч получить ответную реакцию тест-объектов на воздействие исследуемой пробы воды; 2) выбранный тест-объект (*Paramecium caudatum*) является одним из центральных видов микрозоопланктона практически во всех водных объектах, что позволяет использовать его во всех регионах страны; 3) методика биотестирования по выживаемости зоопланктона позволяет использовать природные популяции исследуемого региона, отобранные в фоновых (незагрязненных участках) водных объектов. В связи с тем, что гидробионты реагируют на специфику гидрохимического состава водных объектов различных регионов предпочтительнее использовать в случаях ЧС природные популяции гидробионтов, отобранные из фоновых (условно чистых участков). Для этого в рекомендациях приведен список возможных тест-объектов с указанием их экологических особенностей в отношении температурного фактора, pH-среды, минерализации.

1 Область применения

Настоящие рекомендации устанавливают методику экспрессного биотестирования и порядок проведения оценки токсичности поверхностных вод суши (ПВС) в условиях чрезвычайных ситуаций (ЧС) и проведения оперативных работ в мониторинге ПВС в условиях ЧС.

Рекомендации предназначены для организаций наблюдательной сети Федеральной службы по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды (Росгидромета), осуществляющих организацию и прове-

дение наблюдений за загрязнением ПВС в составе Государственной службы наблюдений за состоянием окружающей среды (ГСН) России.

Настоящие рекомендации могут быть использованы в качестве методического пособия специалистами и практическими работниками природоохранных организаций, осуществляющих наблюдения за загрязнением окружающей среды, а также для оценки токсического загрязнения поверхностных вод суши.

2 Нормативные ссылки

В настоящих рекомендациях использованы ссылки на следующие нормативные документы:

ГОСТ 19179-73 Гидрология суши. Термины и определения

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

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

ГОСТ 27065-86 Качество вод. Термины и определения

Р 52.24.566-94 Рекомендации. Методы токсикологической оценки загрязнения пресноводных экосистем

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

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

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

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

РД 52.24.670-2005 Унифицированный метод определения острой токсичности проб поверхностных вод суши, содержащих взвешенные вещества

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

Р 52.24.695-2007 Рекомендации. Оценка токсического загрязнения природных вод и донных отложений водных экосистем по коэффициенту регенерации популяции

Примечание - Ссылки на остальные нормативные документы приведены в разделе 6, пунктах 7.2 и 8.2.

3 Термины, определения и обозначения

В настоящих рекомендациях использованы следующие термины и определения:

3.1

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

[ГОСТ 27065-86, статья 39]

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

3.3 водный объект: Сосредоточение природных вод на поверхности суши, либо в горных породах имеющее характерные формы распространения и черты режима (Р 52.24.566).

3.4 загрязнение токсическое: Загрязнение воды водоемов и водотоков токсичными веществами.

3.5 зоопланктеры: Представители зоопланктона (совокупность населяющих толщу воды беспозвоночных животных, пассивно переносимых течениями) [1].

3.6

качество воды: Характеристика состава и свойств воды, определяющая пригодность ее для конкретных видов водопользования.

[ГОСТ 27065-86, статья 2]

3.7

контроль качества воды: Проверка соответствия показателей качества воды установленным нормам и требованиям.

[ГОСТ 27065-86, статья 2]

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

3.9 метрологическая характеристика метода: Характеристика чувствительности метода, определяемая для тест-объекта по $1C_{50}$ при воздействии эталонного токсиканта (медь (II) сернокислая, калий двухромовокислый).

3.10 острое токсическое действие (острая токсичность); ОТД: 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 (РД 52.24.662).

3.11 показатель токсичности: Признак тест-объекта, используемый для оценки токсичности воды.

3.12 поверхностные воды суши; ПВС: Воды, находящиеся на поверхности суши в виде различных водных объектов (Р 52.24.566).

3.13 проба воды: Количество воды, предназначенное для исследования.

3.14 пункт наблюдений за загрязнением поверхностных вод суши Государственной сети наблюдений Росгидромета: Место на водоеме или водотоке, где проводят комплекс работ для получения данных о качестве воды или донных отложений. (РД 52.24.635).

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

3.18 токсичность воды: Свойство воды вызывать патологические изменения или гибель организмов, обусловленные присутствием в ней токсичных веществ (Р 52.24.566).

3.19 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).

3.20 условно чистый участок водного объекта: Обычно это фоновый створ.

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

3.22 хемотаксис: Двигательные реакции свободно передвигающихся растительных и простейших животных организмов, а также клеток (зооспор, сперматозоидов, лейкоцитов и др.) под влиянием химических раздражителей [2].

3.23 чрезвычайная ситуация; ЧС: Обстановка на определенной территории, сложившаяся в результате аварии, опасного природного явления, катастрофы, стихийного или иного бедствия, которые могут повлечь или повлекли за собой человеческие жертвы, ущерб здоровью людей или окружающей природной среде, значительные материальные потери и нарушение условий жизнедеятельности людей [3].

3.24 чувствительность тест-объекта: Нижняя граница диапазона действия эталонного токсиканта, при которой обнаруживают параметры его токсичности на тест-объект.

3.25 эталонный токсикант: Токсическое вещество, используемое для проверки чувствительности биотеста или тест-объекта (Р 52.24.566).

3.26 LC₅₀ : Концентрация токсиканта, приводящая к гибели 50 % взятой для эксперимента выборки.

4 Общие положения

4.1 Настоящие рекомендации устанавливают требования и условия по проведению экспрессного биотестирования ПВС в условиях ЧС, обусловленного высоким уровнем загрязнения или присутствием опасных токсических веществ, поступающих в водные объекты в ходе аварий, залповых сбросов, с целью выяснения чрезвычайных экологических ситуаций.

4.2 Экспрессное биотестирование ПВС проводят с целью проверки соответствия качества отдельных исследуемых проб воды установленным нормам без идентификации загрязняющих веществ и их количественных характеристик [4].

4.3 Вода контрольного створа (природная вода) не должна оказывать токсического действия (хронического и, тем более, острого) на тест-объекты, используемые для биотестирования [4].

4.4 Биотестирование ПВС основано на определении показателей токсичности исследуемой пробы воды, отобранной в зоне влияния источника загрязнения, и их отличий от контрольной пробы, отобранной на условно чистом участке водного объекта и водопроводной водой исследуемого региона.

4.5 Экспрессное биотестирование токсичности ПВС в условиях ЧС дает возможность за короткий промежуток времени:

- оценить токсичность пробы воды;
- выявить точки (створы) и участки с чрезвычайной экологической ситуацией;
- оценить влияние источников загрязнения на состояние водной составляющей водного объекта;
- оценить экотоксикологический статус водного объекта или его участка;
- оценить эколого-токсикологическое состояние водного объекта в комплексе с методами биоиндикационных и физико-химических исследований.

4.6 Для оценки токсичности ПВС используют не менее трех биотестов с разными тест-объектами, либо трех тест-показателей одного тест-объекта. Набор биотестов и тест-показателей должен экологически соответствовать региону исследования согласно приложениям А, Б и (Р 52.24.690).

4.7 В составе системы мониторинга ПВС режимные наблюдения и наблюдения в условиях ЧС по токсикологическим показателям методом биотестирования проводят по программам работ оперативно-производственных подразделений Росгидромета в соответствии с требованиями РД 52.24.309 - для поверхностных вод суши, РД 52.24.609 и РД 52.24.635 - для вод и донных отложений.

4.8 Результаты по оценке токсичности вод методом биотестирования в условиях ЧС, в зависимости от их масштаба, представляют в органы управления Единой государственной системы предупреждения и

ликвидации ЧС (РСЧС) соответствующего уровня (региональный, территориальный и местный, объектовый).

5 Основные принципы биотестирования поверхностных вод суши в условиях ЧС

5.1 В ходе биотестирования ПВС в условиях ЧС устанавливают:

- наличие либо отсутствие токсического действия отдельных проб воды;
- острое токсическое действие отдельных проб воды;
- кратность разбавления вод, снимающую ОТД, в случае его обнаружения;
- район экологического неблагополучия исследуемой акватории.

5.2 Экспрессное биотестирование ПВС проводят с использованием различных тест-объектов: инфузорий, коловраток, ракообразных, микроводорослей, макрофитов, а также природных популяций гидробионтов, отобранных из условно чистых (фоновых) участков исследуемого водного объекта.

5.3 Использование природных популяций гидробионтов имеет преимущества:

- гидробионты из исследуемого водного объекта исключают реакцию на физико-химические особенности воды, которая может иметь место у лабораторных культур гидробионтов;
- возможность прогнозирования состояния конкретных популяций гидробионтов в исследуемом регионе в связи с произошедшим загрязнением.

Использование природных популяций гидробионтов имеет недостатки:

- адаптация к слабому постоянному воздействию загрязнения на фоновом участке, если оно имеет идентичную природу с воздействием на загрязненном участке;
- заранее нельзя предвидеть, какие именно организмы можно будет выделить на фоновом участке исследуемого водного объекта.

5.4 Оптимальным является проведение одновременного биотестирования на природных популяциях гидробионтов и лабораторных культурах тест-объектов с известными характеристиками и известной чувствительностью к загрязняющим веществам (проверка пригодности культуры к биотестированию по эталонному токсиканту).

5.5 Наиболее важным показателем, на основе которого можно дать прогноз развития популяции, является размножение. Время получения результатов по показателю размножения на общепринятом тест-объекте *Daphnia magna* составляет 30 сут. В условиях ЧС информация должна быть оперативной, поэтому преимущество среди тест-объектов нужно отдать короткоциклическим тест-объектам: инфузориям, коловраткам, микроводорослям.

5.6 Экспрессное биотестирование ПВС проводят:

а) с использованием экспрессных тест-показателей:

- скорость потребления пищи организмами-фильтраторами инфузориями, коловратками в соответствии с РД 52.24.662 (раздел 10) и РД 52.24.670;

- скорость фотосинтеза растительных тест-объектов, А-Z-Ph-тест на микроводорослях в соответствии с Р 52.24.566;

- поведенческие реакции - хемотаксис в соответствии с приложением В.

б) с использованием тест-показателей:

- выживаемость или гибель на тест-объектах, экологически соответствующих исследуемому водному объекту; выживаемость на тест-объектах из представителей крупного рачкового планктона можно наблюдать визуально без микроскопирования в соответствии с РД 52.24.662, Р 52.24.690, Р 52.24.695;

- размножение, позволяющее при использовании короткоциклических тест-объектов (микроводоросли, инфузории, коловратки) в короткие сроки определить не только их выживаемость, но и размножение, и показывающее возможность сохранения популяции в соответствии с РД 52.24.662, Р 52.24.690, Р 52.24.695;

- комплекс показателей (выживаемость и размножение) в сопряженности со временем (24, 48, 72 ч), позволяющее при использовании короткоциклических гидробионтов (инфузории, коловратки) дать прогноз развития популяции в соответствии с Р 52.24.566, РД 52.24.662.

5.7 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.

5.8 В ходе биотестирования используют два контроля: дехлорированную водопроводную воду региона и воду из условно чистого (фоновый) участка исследуемого водного объекта.

5.9 Каждый биотест проводят не менее чем в трех повторностях.

5.10 Оценку токсичности ПВС проводят по набору биотестов (не менее трех). Например, с тест-объектами парамеции, коловратки, дафнии. Либо по двум тест-объектам (парамеции, дафнии) и нескольким тест-показателям одного из тест-объектов (хемотаксис и гибель парамеций).

5.11 Обязательным в условиях ЧС при обнаружении ОТД вод является определение кратности разбавления исследуемой пробы воды, снимающей токсическое воздействие. Кратность разбавления - 2; 10; 25; 50; 100 и 500 раз. Разбавление проводят водой, отобранной из фоновый створа, или отстаиванной дехлорированной водопроводной водой исследуемого региона.

5.12 Требования к порядку проведения и оценке результатов биотестирования проводят согласно РД 52.24.669.

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

6.1 Пробы ПВС для биотестирования отбирают с учетом требований ГОСТ 17.1.5.05 и Р 52.24.566.

6.2 Объем пробы не менее $0,05 \text{ дм}^3$ (при использовании в биотестировании тест-объектов из числа микрозоопланктона) и не менее $1,5 \text{ дм}^3$ (при использовании микроводорослей и рачкового планктона).

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

6.4 Сосуды необходимо маркировать.

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

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

6.7 В случае невозможности проведения исследований не позднее 6 ч после отбора пробы охлаждают до 4°C или замораживают согласно РД 52.24.309 и хранят до 30 сут.

6.8 Консервирование проб химическими веществами не допускается.

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

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

7 Биотест по реакции хемотаксиса парameций

7.1 Принцип метода

Биотест по реакции хемотаксиса основан на способности зоопланктеров, в частности парameций, перемещаться в направлении или от источника химического воздействия. Хемотаксис положителен, если движение парameций направлено к источнику химического раздражителя (по градиенту его концентрации воде), и отрицателен, если движение направлено от источника. Влияние исследуемой воды оценивают по количеству переместившихся особей.

ОТД исследуемой воды на парameций устанавливают за время экспозиции 2 часа.

Показателем реакции хемотаксиса служит среднее количество парameций, переместившихся в исследуемую воду.

Критерием ОТД является положительный хемотаксис, когда средний процент исходного количества тест-объектов, переместившихся в исследуемую воду, составляет не более 25 %.

7.2 Необходимые материалы, оборудование, реактивы

7.2.1 Культура парameций *Paramecium caudatum*. Описание основных характеристик вида, источники получения культуры и условий культивирования даны в приложениях Г и Д.

7.2.2 Микроскоп бинокулярный стереоскопический марки МБС по ГОСТ 8074-82.

7.2.3 Дрожжи пекарские сухие.

7.2.4 Пипетки выдувные капиллярные (пастеровские, укороченные с двух сторон или глазные с оттянутым носиком) по ГОСТ 29230-91.

7.2.5 Чашки Петри по ГОСТ 25336-82.

7.2.6 Фильтровальная бумага синяя лента.

7.2.7 Стаканы вместимостью 0,5-1,0 дм³ по ГОСТ 23932-90.

7.2.8 Вода дехлорированная водопроводная исследуемого региона.

7.3 Подготовка к биотестированию

Исходный материал для биотестирования получают за 1-3 сут до опыта. Для этого парameций пересаживают в чистые чашки Петри с дехлорированной водопроводной водой, в которую предварительно вносят корм (один-два кусочка сухих пекарских дрожжей размером 1 мм³ на одну чашку Петри).

Биотестирование проводят при комнатной температуре без смены воды в нестерильных условиях, в защищенном от прямого солнечного света месте.

7.4 Проведение биотестирования

Общий объем воды для биотестирования одной пробы воды 50 см³.

Для проведения токсикологического эксперимента в чашку Петри вносят каплю (0,1 см³) культуральной среды с парameциями. Под микроскопом марки МБС подсчитывают исходное количество парameций. Далее в эту же чашку Петри рядом с первой каплей вносят каплю исследуемой воды. С помощью пипетки делают перемычку из капли контрольной воды в исследуемую воду. Наблюдают за скоростью перехода парameций из исходной капли в опыт.

Используют два контроля: дехлорированную водопроводную воду исследуемого региона и воду из фонового условно чистого участка исследуемого водного объекта.

Каждую пробу воды исследуют в трех повторностях с двумя контролями, т.е. необходимо 6 чашек Петри на одну исследуемую пробу. Постановку каждого варианта проводят через 5 мин, необходимых для учета исходного количества парameций в контрольной капле под бинокулярной лупой.

7.5 Регистрация реакции хемотаксиса

Регистрация реакции хемотаксиса основана на учете численности переместившихся парameций в каждом варианте. Для оценки реакции хемотаксиса учитывают количество особей, переместившихся из контрольной капли воды в исследуемую пробу воды.

Учет парameций ведут под бинокулярной лупой (увеличение 4x12,4) через 15, 30, 60, 120 мин.

7.6 Обработка результатов, расчеты и оценка токсичности воды

В таблицу Е.1 (приложение Е) заносят дату проведения биотестирования, номер пробы, номер повторности, количество парameций, переместившихся в исследуемую воду (в каждой повторности).

Результаты биотестирования оценивают по положительному хемотаксису, т.е. количеству парameций, переместившихся из контрольной воды в исследуемую.

В каждом варианте токсикологического эксперимента рассчитывают процент парameций, переместившихся в исследуемую воду. Затем подсчитывают средний процент переместившихся особей на основании результатов трех параллельных определений в контроле и в опыте.

Если количество переместившихся из контрольных вариантов в исследуемую воду парameций составляет не более 25 %, то воду оценивают как оказывающую ОТД.

Полученные результаты биотестирования заносят в таблицу Е.1 приложения Е.

7.7 Метрологическая характеристика метода

Диапазон перемещения парameций из контрольной в исследуемую воду в случае положительного хемотаксиса составляет от 0 % до 100 % с внутрилабораторной прецизионностью 25 %.

8 Биотест по выживаемости зоопланктеров

8.1 Принцип метода

Методика основана на оценке влияния исследуемой воды, отобранной из водных объектов, на зоопланктеров. Тест-объектами могут служить лабораторные культуры парameций, коловраток, дафний, цериодафний, а также природные популяции этих зоопланктеров, отобранные

из фоновых (условно чистых) участков водного объекта. Природные популяции используют в экспедиционных условиях при ЧС. Принципы биотестирования на природных популяциях в основном те же, что и на лабораторных культурах.

В случае ЧС оценивают ОТД пробы воды по изменению показателя выживаемости тест-объектов при экспозиции в исследуемой воде. Показателем выживаемости служит среднее количество тест-объектов, выживших в исследуемой воде за время опыта.

Критерием ОТД является снижение выживаемости тест-объектов не менее чем на 50 % в исследуемой воде по сравнению с контролем. Выживаемость в контроле при этом должна быть не менее 90 %. Наблюдения за выживаемостью проводят через 15; 30; 60 мин, далее через каждый час. Продолжительность биотестирования 24 ч.

8.2 Необходимые материалы, оборудование, реактивы

8.2.1 Культура тест-объекта из представителей зоопланктеров (см. приложения А и Б).

8.2.2 Микроскоп бинокулярный стереоскопический марки МБС по ГОСТ 8074-82.

8.2.3 Пипетки выдувные капиллярные (пастеровские, укороченные с двух сторон или глазные с оттянутым носиком) по ГОСТ 29230-91.

8.2.4 Чашки Петри по ГОСТ 25336-82.

8.2.5 Стаканы вместимостью 0,5-1,0 дм³ по ГОСТ 23932-90.

8.2.6 Вода дехлорированная водопроводная исследуемого региона.

8.3 Проведение биотестирования

При использовании в качестве тест-объектов парамеций, коловраток берут по капле массовых культур этих зоопланктеров и помещают в чашку Петри. Фильтровальной бумагой отбирают излишки воды, добавляют 1 см³ исследуемой воды. Под микроскопом подсчитывают исходное количество парамеций. Через 15; 30; 60 и 120 мин подсчитывают количество выживших парамеций.

При использовании в качестве тест-объектов крупного рачкового планктона (дафнии, цериодафнии, симоцефалюсы), их отсаживают по 10 экземпляров в стаканы вместимостью 0,5- 1,0 дм³ и добавляют 0,5 дм³ исследуемой воды.

При использовании в качестве тест-объектов бокоплавов их отсаживают по 10 экземпляров в чашки Петри.

В качестве контроля используют воду фоновую (условно чистую) участка, на котором отловлены используемые в качестве тест-объектов виды, и дехлорированную водопроводную воду исследуемого региона. В контроле выживаемость должна быть не менее 90 %.

Все варианты опыта и контроля ставят не менее, чем в трех повторностях. Общее количество организмов в опыте должно быть не менее 30.

8.4 Регистрация показателя выживаемости и оценка токсичности воды

В качестве тест-показателя токсичности используют выживаемость тест-объектов. Количество живых зоопланктеров регистрируют через 15; 30; 60; 120 мин и через 24 ч.

ОТД исследуемой воды на зоопланктеров устанавливают при кратковременном биотестировании (24 ч). Критерием токсичности служит процент от контроля выживших тест-объектов (при расчете по средним значениям всех повторностей). В случае выживаемости не более 50 % тест-объектов от контроля исследуемую воду оценивают как оказывающую ОТД.

Выживаемость в контроле должна быть не менее 90 % от исходного количества зоопланктеров. В случае значения выживаемости тест-объектов в контроле ниже 90 % токсикологический эксперимент проводят на другой популяции тест-объектов.

Результаты заносят в таблицу Е.2 приложения Е.

9 Определение кратности разбавления воды, снимающего острое токсическое действие воды

9.1 Биотест при разбавлении воды, снимающей ОТД

В случае обнаружения ОТД необходимо выявить кратность разбавления исследуемой воды, которая снимает токсическое действие.

Кратность разбавления - 2; 10; 25; 50; 100; 500 раз. Разбавление проводят водой, отобранной из фоновоего створа, или отстаиванной де-хлорированной водопроводной водой исследуемого региона.

Биотестирование проводят согласно разделам 7 и 8.

9.2 Оценка токсичности воды на основе кратности разбавления пробы

В случае ЧС и при оперативных работах токсическое состояние оценивают на конкретный момент времени исследования. В этом случае при установлении ОТД воды находят кратность разбавления исследуемой воды, при которой токсичность не проявляется.

Оценку токсичности воды и экотоксикологического статуса водного объекта или его участка с точки зрения благополучия водной экосистемы проводят согласно шкале таблицы 1.

Таблица 1 - Шкала оценки токсичности и экотоксикологического статуса водного объекта или его участка [5]

Кратность разбавления	Класс токсичности	Экотоксикологический статус
До 1 : 1 включ.	0 Нетоксичная	Чистая
Св. 1 : 1 до 1 : 25 включ.	1 Слабо токсичная	Олиготоксичная
" 1 : 25 " 1 : 50 "	2 Умеренно токсичная	Бета-мезотоксичная
"1 : 50 " 1 :100 "	3 Остро токсичная	Альфа-мезотоксичная
" 1 : 100 " 1:500 "	4 Весьма токсичная	Политоксичная
"1 : 500"	5 Чрезвычайно токсичная	Гипертоксичная

Результаты биотестирования заносят в таблицу Е.3 приложения Е.

10 Оценка токсичности воды методом биотестирования с использованием набора биотестов

10.1 Оценку токсичности исследуемой воды проводят по набору биотестов (см. 5.10). Использование набора биотестов с разными по чувствительности тест-объектами и тест-показателями увеличивает вероятность обнаружения токсичности исследуемой воды.

10.2 Итоговая оценка токсичности ПВС является экспертной. Окончательную оценку проводят по тест-объекту и тест-показателю, проявившему наибольшую чувствительность к воздействию исследуемой воды.

10.3 Токсичность воды оценивается словесно: «оказывает» или «не оказывает острое токсическое действие».

11 Требования безопасности, охраны окружающей среды

11.1 При выполнении работ следует соблюдать общие требования к безопасности на водных объектах и в химических лабораториях, установленные в национальных стандартах и соответствующих нормативных документах.

11.2 Особых требований по экологической безопасности не предъявляется.

12 Требования к квалификации оператора

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

Приложение А (рекомендуемое)

Экологические характеристики гидробионтов, используемых в качестве тест-объектов при биотестировании

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

Наименование гидробионтов	Экологические характеристики							
	Пресноводные	Солоноватоводные	Теплолюбивые	Холодолюбивые	Олигосапробы	Мезосапробы	Ацидофилы	Алкофиллы
PROTOZOA (Простейшие):								
<i>Paramecium caudatum</i>	+	+				+		+
<i>Paramecium putrinum</i>	+	+				+		
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	+	+				+	+	+
<i>Colpidium</i> sp.	+					+		
<i>Stylonichia mytilus</i>	+					+		
<i>Euplotis harpa</i>		+			+			
<i>Euplotis vannus</i> (бентический, морской)		+		+				
<i>Cristira</i> sp. (бентический)		+		+				
<i>Uronema marinum</i> (бентический)		+		+				
<i>Pavella</i> sp. (пелагический)		+		+	+			
<i>Balanoin</i> sp. (пелагический)		+		+	+			
ROTATORIA (Коловратки):								
<i>Brachionus calyciflorus</i>	+		+				+	+
<i>Brachionus rubens</i>	+		+	+				+
<i>Brachionus plicatilis</i>		+	+				+	+
<i>Philodina roseola</i>	+		+				+	
<i>Paramecium acuticornis odiosa</i>	+		+				+	
CRUSTACEA (Ракообразные):								
<i>Daphnia magna</i>	+		+			+		
<i>Moina macrocopa</i>	+		+			+		
<i>Bosmina longirostris</i>	+		+	+	+			
<i>Ceriodaphnia reticulata</i>	+		+			+		
<i>Artemia salina</i>		+				+		

Окончание таблицы А.1

Наименование гидробионтов	Экологические характеристики							
	Пресноводные	Солоноватоводные	Теплолюбивые	Холодолюбивые	Олигосапробы	Мезосапробы	Ацидофилы	Алкофиллы
MOLLUSCA (Моллюски):								
<i>Lymnaea stagnalis</i>	+		+					
<i>Anadonta</i> sp.	+		+					
<i>Dreissena</i> sp.	+	+	+	+				
<i>Crassostrea virginica</i> устрицы		+	+	+		+		+
<i>Ostrea iridescens</i> устрицы		+	+			+		+
<i>Mytilus galloprovincialis</i> мидии		+	+			+		+
<i>Mytilus edulis</i> мидии		+	+			+		+
<i>Mya arenaria</i>		+	+			+		+
<i>Mytilaster</i> sp.		+	+			+		+
<i>Patella vulgata</i>		+	+			+		+
<i>Rapana tomassina</i>		+	+	+		+		+
OLIGOCHEATA (малощетинковые черви)								
<i>Aelosoma hemprichi</i>	+		+				+	
INSECTA (Насекомые):								
<i>Chironomus plumosus</i>	+		+	+				+
П р и м е ч а н и е - Знаком «+» обозначено наличие указанных экологических особенностей гидробионтов.								

Приложение Б (рекомендуемое)

Гидробионты, используемые в качестве тест-объектов, и методы учета популяционных характеристик

Таблица Б.1 - Наименование гидробионтов и методы учета популяционных характеристик

Тест-объект	Метод учета	
	Молодь (ювенильные особи)	Гибель (отмершие особи)
PROTOZOA (Простейшие) родов Paramecium, 'retrachimena, 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 молодежи	То же
CRUSTACEA (Ракообразные) Daphnia magna, Moina macroscopa, Ceriodaphnia reticulata, Artemia salina	Визуально: - поведение - подсчет молодежи	Визуально подсчет количества погибших особей
OLIGOCHAETA (Малощетинковые черви) Aeolosoma hemprichi	Визуально: - поведение - наличие кладок	То же
Mollusca (Моллюски) Lymnaea stagnalis, Anadonta sp., p.Mytilis, p. Dreissena	Визуально: - количество кладок - количество молодежи	к п
Рыбы Poreilia reticulata, Brachydanio rerio	Визуально: количество молодежи	п п
Insecta (Насекомые) Chironomus plumosus	Визуально: наличие коконов	п п

Приложение В (справочное)

Хемотаксис

В.1 Хемочувствительность биоты возникла в истории жизни на Земле очень давно. С самого начала эволюции прокариоты были погружены в водную среду. Способность реагировать на химический состав среды была критичной для выживания. Хемотаксис - двигательные реакции свободно передвигающихся растительных и простейших животных организмов, а также клеток (зооспор, сперматозоидов, лейкоцитов и др.) под влиянием химических раздражителей. Хемотаксис может быть положительным — движение направлено к источнику химического раздражителя (по градиенту его концентрации в воздухе или воде), и отрицательным — движение направлено от источника. Явление хемотаксиса известно для ряда микроорганизмов и беспозвоночных животных.

В.2 Для возникновения хемотаксисов необходимо в среде создать градиент (неоднородность распределения) химического вещества, чтобы организм мог выбрать направление уменьшения вредного воздействия. Характеристиками таксиса служит концентрация организмов в исследуемой зоне через определенное время, которая измеряется оптическими приборами (бинокулярная лупа) (см. рисунок В. 1)

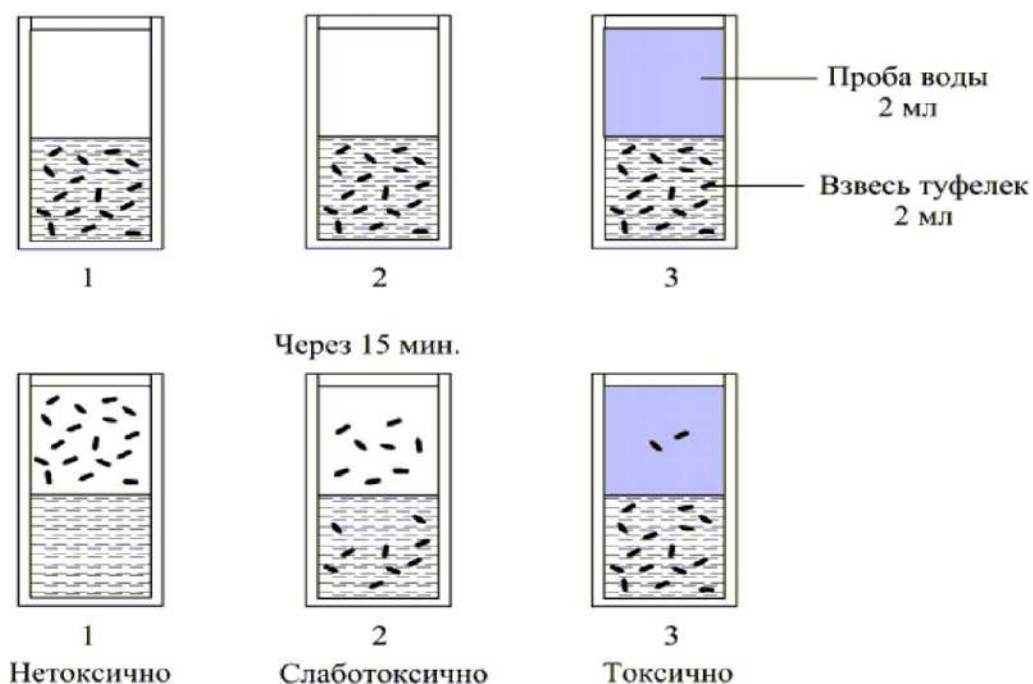


Рисунок В. 1 - Реакция хемотаксиса на примере парамеций (туфельек) [2]

Приложение Г (справочное)

Характеристика тест-объекта инфузории *Paramecium caudatum*

Г.1 Систематическое положение

Тип - Ciliophora, подтип - Ciliata, класс - Oligohymenophora, отряд - Hymenostomatida, подотряд - Peniculina, род - *Paramecium*, вид - *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1838 (в дальнейшем - парамеция).

Инфузории данного вида как тест-объект обладают рядом достоинств: высокая чувствительность к токсикантам, короткий жизненный цикл, высокая скорость размножения, сочетание признаков эукариотной клетки и организма, ярко выраженные таксисы, достаточно широкая толерантность по отношению к температуре и солености, простота содержания в лабораторных условиях.

Г.2 Местообитание

P. caudatum - свободноживущая широко распространенная ресничная инфузория. Предпочитает альфа-мезосапробные условия, близкие к нейтральному значению pH=6,5-7,5, температурный оптимум в пределах 24-28 °C. Обитает в пресных водоемах.

Г.3 Морфология, биология

Парамеции - наиболее сложно организованные простейшие, очень чувствительные к изменению химического состава среды. Парамеции, представляющие собой одноклеточные организмы. Имеют сигарообразное или веретенообразно вытянутое в поперечном сечении округлое тело. Ресничный покров густой, равномерный. Сзади чуть удлиненный. Длина тела составляет 180-300 мкм [6]. Клетка парамеций содержит два типа ядер: вегетативное и генеративное. Размножаются парамеции либо поперечным делением клеток (бесполое размножение), либо половым путем, носящим характер конъюгации. Клетки делятся 1-2 раза в сутки.

Приложение Д

(справочное)

Получение исходного материала и содержание парameций в лабораторных условиях

Д.1 Получение исходного материала для культуры парameций

Получить исходный материал для культуры парameций можно в институтах и учреждениях, занимающихся биотестированием с использованием парameций (в том числе в ГХИ). Обычно этот вид встречается в местных водоемах, поэтому можно самостоятельно вырастить культуру парameций.

Выделяют парameций из природных вод методом концентрирования [7]. Для этого из водоема отбирают пробу воды объемом 5 л. Затем путем фильтрации ее через мембранный фильтр с размером пор 3-5 мкм получают концентрированную пробу объемом 0,04 дм³. Полученный концентрат пробы сливают в стакан. Затем осадок с фильтра смывают полученным концентратом в чашки Петри. Высота слоя воды в чашке составляет 0,5-0,8 см. В чашки Петри добавляют корм - сухие пекарские дрожжи (один-два кусочка размером 1 мм³). Полученные пробы оставляют на 1-3 сут. Часто уже через сутки начинается массовое развитие разных видов микрозоопланктона. В лаборатории специалист определяет нужный вид инфузорий (парameций) под микроскопом. Заранее подготовленные чашки Петри наполняют дехлорированной водопроводной водой и в них переносят парameций с помощью капиллярной пипетки. Такую пипетку используют в дальнейшем при пересадке инфузорий. Начальная плотность размещения парameций - 5-10 особей на одну чашку Петри. В течение 1-3 сут инфузорий адаптируют к лабораторным условиям и используют полученную культуру как исходную.

Д.2 Содержание культуры, кормление

Культуру инфузорий выращивают в климатостате, боксе или в любом помещении, не содержащих токсических паров или газов. Оптимальная температура для культивирования и биотестирования (22±2) °С. Дополнительного освещения не требуется. Не допускается освещать парameций прямыми солнечными лучами. Стекланную посуду для содержания инфузорий моют водопроводной водой, нельзя использовать для мытья синтетические моющие средства и органические растворители. В помещении, в котором находится культура парameций, не хранят летучие вещества и не работают с ними.

Для культивирования парameций используют водопроводную дехлорированную воду или природную воду из незагрязненного водоема.

Вода для культивирования должна удовлетворять следующим требованиям: рН от 6,5 до 7,5, жесткость общая 3-4 ммоль/л. концентрация растворенного кислорода не менее 6,0 мг/л.

Оптимальная плотность культуры 10-20 особей на 1 см³ воды. Один раз в 7-10 сут культуру пересевают. Чтобы обеспечить стандартные условия культивирования, поддерживающие культуру парameций в стационарной фазе роста.

В качестве корма для парameций используют сухие пекарских дрожжей. Для содержания парameций в одной чашке Петри достаточно 1-2 кусочков сухих пекарских дрожжей размером 1мм³.

Д.3 Транспортировка культуры

Культуру парameций транспортируют в пробирках, не допуская перегрева и переохлаждения. Хранить ее без пересева можно в холодильнике при температуре от 8 °С до 10 °С в течение 2-3 нед. Период акклимации к лабораторным условиям составляет 24 ч.

Приложение Е (обязательное)

Формы представления результатов биотестирования

Е.1 Форма результатов биотестирования исследуемой воды по реакции хемотаксиса *Paramecium caudatum*

Таблица Е.1 - Результаты биотестирования исследуемой воды по реакции хемотаксиса *Paramecium caudatum* на территории деятельности подразделения Росгидромета

Наименование		Дата		Номер пробы	Положительный хемотаксис, %	Оценка токсичности воды
Водного объекта	Пункта наблюдений	Отбора пробы	Проведения биотестирования			
1	2	3	4	5	6	7
П р и м е ч а н и е - В графе 7 пишут: «Оказывает острое токсическое действие» или «Не оказывает острое токсическое действие».						

Е.2 Форма результатов биотестирования исследуемой воды по показателю выживаемости зоопланктеров

Таблица Е.2 - Результаты биотестирования исследуемой воды по показателю выживаемости _____ на территории _____ вид зоопланктера _____ деятельности подразделения Росгидромета

Наименование		Дата		Номер пробы	Выживаемость, % от контроля	Оценка токсичности воды
Водного объекта	Пункта наблюдений	Отбора пробы	Проведения биотестирования			
1	2	3	4	5	6	7
П р и м е ч а н и я 1 В наименовании таблицы указывают вид использованного в качестве тест-объекта зоопланктера (парамеции, коловратки, дафнии, симоцефалюсы и т.д.). 2 В графе 7 пишут: «Оказывает острое токсическое действие» или «Не оказывает острое токсическое действие».						

Е.3 Форма результатов биотестирования по кратности разбавления исследуемой воды, снимающей острое токсическое действие

Таблица Е.3 - Результаты биотестирования по кратности разбавления исследуемой воды, снимающей острое токсическое действие, на территории деятельности подразделения Росгидромета

Наименование		Дата					
Водного объекта	Пункта наблюдений	Отбора пробы	Проведения биотестирования				
1	2	3	4	5	6	7	8
П р и м е ч а н и е - В графе 8 пишут: «Оказывает острое токсическое действие» или «Не оказывает острое токсическое действие».							

Библиография

- [1] Константинов А.С. Общая гидробиология. - М.: Высшая школа, 1986. 470 с.
- [2] Методика определения токсичности почвы и донных осадков по хемотаксической реакции инфузорий. - М., 1998. 22 с.
- [3] Федеральный закон РФ "О защите населения и территорий от чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера" от 21.12.94 № 68-ФЗ.
- [4] Правила охраны поверхностных вод (типовые положения). - М.: Госкомприрода СССР, 1991.
- [5] Брагинский Л.П. Некоторые принципы классификации пресноводных экосистем по уровням токсической загрязненности // Гидробиологический журнал. - 1985. - № 6, Т. 21. С. 65-74.
- [6] Банина Н.Н. Тип Инфузории // Фауна аэротенков. Атлас. - Л.: Наука, Ленингр., 1984. С.136-186.
- [7] Бакаева Е.Н., Никаноров А.М. Гидробионты в оценке качества вод. - М.: Наука, 2006. 238 с.