

## Лабораторная работа № 2

Определение хронической токсичности сточных вод

(Продолжительность лабораторной работы – 16 часов)

### Цель работы

Определение хронической токсичности сточных вод промышленных предприятий по изменению плодовитости и выживаемости тест объекта *Daphnia magna Straus*.

Получение навыков длительного биотестирования сточных вод промышленных предприятий для определения их хронической токсичности по изменению показателя плодовитости и выживаемости и обработки полученных результатов.

### Рабочее задание

1. Ознакомиться с сутью метода биотестирования и порядком его длительного проведения.
2. Провести длительное биотестирование сточной воды.
3. Ознакомиться с порядком обработки и оценки результатов длительного биотестирования.
4. Обработать полученные результаты.
5. Оформить отчет по проделанной работе в соответствии с требованиями.
6. Ответить на контрольные вопросы, приведенные в конце данной работы.

### Оборудование, материалы, реактивы

Для выполнения данной практической работы необходимы: климатостат, люминоstat (бокс для культивирования дафний) или эквивалентное приспособление, позволяющее поддерживать искусственное освещение от 500 – 1000 лк, температуру окружающего воздуха +18-22 °С, химические стаканы для посадки тест-объектов в анализируемую и контрольную воду вместимостью 150- 200 см<sup>3</sup> (их количество зависит от числа разбавлений), пипетки стеклянные объемом 2 см<sup>3</sup> с отрезанными и оплавленными

концами для пересадки рачков (ГОСТ 29227), микроскоп бинокулярный стереоскопический (МБС-9 или —10), стекла предметные и покровные для приготовления микропрепаратов, микрокомпрессоры АЭН по ТУ 16—064, 011—84; оксиметр—1 или кислородомер КЛ—115; рН-метр ГОСТ 25.7416.0171 или его аналоги, термометр лабораторный шкальный 0-55 °С (ГОСТ 215), термометр гидрологический, -3 +65 °С (цена деления шкалы 0,5 °С, ГОСТ 2045, тип ТМ-14), сушильный электрический шкаф общелабораторного назначения (ГОСТ 13474), пипетки, автоматические дозаторы любого типа объемом 0,1-0,2 см<sup>3</sup>, сачок из планктонного газа\*, фильтровальная бумага, кристаллизаторы произвольного объема для замачивания и мытья посуды, культура тест-организмов *Daphniamagna* Straus (двухсуточные самки).

### **Условия безопасного проведения работ**

При работе с химическими веществами и сточными водами необходимо соблюдать ГОСТ 12.4.021.

Рабочие столы и поверхности должны содержаться в чистоте. Безопасность при работе с электроустановками обеспечивается по ГОСТ 12.1.019 и в соответствии с требованиями инструкций к оборудованию.

### **Требования к отбору проб и их подготовка к биотестированию**

Требования к отбору проб и их подготовка к длительному биотестированию аналогичны требованиям, предъявляемым при кратковременном биотестировании.

Для определения наличия хронического токсического действия воды в контрольном и других створах водного объекта воду тестируют без разбавления. Если требуется сравнить степень токсичности разных проб воды или использовать результаты биотестирования при установлении величин ПДС, готовят серию разбавлений. Определяют минимальную кратность разбавления, при которой хроническое токсическое действие не проявляется.

Объем пробы воды для биотестирования без разбавления – 1л, с учетом разбавлений 2 л.

## **Описание хронического токсикологического эксперимента**

В стаканы наливают по 300 мл контрольной и тестируемой воды или ее разбавлений. Повторность трехкратная. В каждый сосуд вносят одинаковое количество корма, помещают по 10 двухсуточных самок дафний и экспонируют при оптимальных условиях. Дафний кормят ежесуточно. Три раза в неделю в стаканах с дафниями производят смену контрольной и тестируемой воды на свежееотобранную. При смене воды дафний кормят за три часа до смены.

С момента появления молоди, в те сутки, когда меняют воду, производят учет выживших исходных самок и выметанной молоди. Для этого самок с помощью стеклянной трубки пересаживают в заранее подготовленные сосуды с контрольной и тестируемой водой (соответственно) и подсчитывают их количество в каждом сосуде. Оставшуюся воду процеживают через сито планктонного газа. При этом на сите остается выметанная молодежь, которую подсчитывают и удаляют.

После того, как в контроле все исходные самки дадут по четыре помета, биотестирование заканчивают. Время биотестирования сокращается, если при промежуточном подсчете устанавливают достоверное отличие от контроля показателя выживаемости или плодовитости дафний.

### **Определяемые параметры, для установления хронического действия сточной воды на дафний**

При постановке хронических экспериментов регистрируются следующие биологические показатели: выживаемость, некоторые показатели обмена веществ (наполненность кишечника, цвет его содержимого, количество жировых капель), окраска тела, интенсивность размножения (сроки полового созревания, плодовитость), линька и линейный рост, качество потомства.

Проблема токсикологического контроля очень сложна, так как структурные и функциональные показатели отклика на загрязнение многочисленны. Так как основной задачей является сохранение популяций и биоценозов и нормальное воспроизводство особей, то Н.С.Строгановым (1940, 1972) в качестве критерия токсичности было

выдвинуто не выживание особей, а сохранение видов и их нормальное воспроизводство в нескольких поколениях без ухудшения качества потомства. Н.С.Строганов подчеркивал, что именно воспроизводство особей в нескольких поколениях должно рассматриваться как основной критерий токсичности среды или отсутствия токсичности. Все остальные критерии должны рассматриваться как дополнительные.

В тех случаях, когда необходимо дать быструю оценку токсичности среды, используют экспресс-методы, основа которых была разработана Я.Я.Никитинским и В.И.Долговым в 1913 г. Сущность метода заключается в определении выживаемости испытуемых объектов (рыб, беспозвоночных, растений) в различных концентрациях испытуемых веществ в течение суток или нескольких суток.

При оценке хронической токсичности сточных вод на дафниях необходимо оценить состояние дафний по оценочной шкале, разработанной Л.А.Лесниковым (1971).

По шкалам проводится оценка окраски тела (табл.1), накоплению жировых капель (табл.2) наполненности кишечника (табл.3), состоянию гонад (табл.4), состоянию яиц (табл.5).

Таблица 1.

### Шкала окраски тела дафний

Окраска тела	балл
Прозрачное, стекловидное	1
Прозрачное, желтоватое	2
Прозрачное, бледно-розовое	3
Прозрачное, розовое	4
Прозрачное, ярко-розовое	5
Мутно-желтое	6
Мутно-розовое	7

Таблица 2.

**Шкала накопления жировых капель в теле дафний**

<b>Размеры жировых капель, цвет, количество</b>	<b>Балл</b>
Капли отсутствуют	0
Капли мелкие, бесцветные в небольшом количестве	1
Капли крупные, бесцветные, в большом количестве	2
Капли крупные, бледно-розовые, в большом количестве	3
Капли крупные, розовые, в большом количестве	4
Капли крупные, ярко розовые, в большом количестве	5
Капли очень крупные, «эмбриональные» капли жира вокруг средней части кишечника у сформированных эмбрионов и молоди до 4 дней	6

Таблица 3.

**Шкала наполнения кишечника дафний**

<b>Степень наполнения кишечника</b>	<b>Балл</b>
Пустой	1
Заполнен на $\frac{1}{4}$ или меньше, местами лишь отдельными комками пищи	2
Весь заполнен, но чуть заметной прозрачной жидкостью	2а
Заполнен пищей наполовину	3
Заполнен весь, но содержимое прозрачно или окрашено	3а
Заполнен, но с большими промежутками или местами пища отстает от стенок кишечника	4
Туго набит пищей	5

### Шкала развития гонад дафний

Состояние гонад	Балл
В зоне роста визуально яйцеклеток не обнаружено	1
В зоне роста тетрады яйцеклеток с прозрачными каплями жира	2
Яйцеклетки дымчатые, промежутки между ними просвечивают	3
Яйцеклетки темные, промежутки между ними не видны	4

### Шкала развития партеногенетических яиц в выводковой камере дафний

Состояние яиц	Балл
Яйца темные, непрозрачные, в начале стадии вытянуты, в конце – округлые	1
У яиц более светлый периферический край и грануляция в середине	2
Начало стадии- появление двух вторых антенн, конец стадии- формирование парного глаза	3
От слияния парного глаза, появления в нем пигментации, до формирования молодой дафнии	4

Результаты наблюдения удобно фиксировать в следующей последовательности: размер дафнии, балл гонад, балл выводковой камеры, число яиц, окраска тела, капли жира, их цвет, наполненность кишечника, цвет его содержимого, отдельно в передней и задней части .

Для количественной оценки токсичности сточных вод применяется четырехбалльная система Н.С.Строганова (1971) (табл.6)

### Шкала оценки токсичности сточных вод по выживаемости дафний

Продолжительность жизни 50% особей	Токсичность	Балл
До 20 суток	Слабая	1
До 10 суток	Средняя	2
До 5 суток	Высокая	3
Менее 2 суток	Очень высокая	4

В целях государственного экологического контроля в соответствии с «Методикой определения токсичности воды по смертности и изменению плодовитости дафний» хроническая токсичность устанавливается по двум параметрам: гибели 20% и более исследуемых тест-организмов и по достоверному отклонению в плодовитости исследуемых тест-организмов по сравнению с контролем. Для оценки результатов используются следующие значения. При определении токсичности отдельных веществ: устанавливают концентрацию вещества, вызывающую хроническую токсичность за 24 суток экспозиции, если смертность дафний составит 20% и более и (или) в плодовитости будет установлено достоверное от контроля снижение; безвредную концентрацию вещества, не вызывающую хроническую токсичность за 24 суток экспозиции, если смертность дафний составит менее 20% и (или) в их плодовитости не будет установлено достоверное отклонение от контроля.

При определении хронической токсичности возвратных вод и их разбавлений устанавливают кратность разбавления вод, вызывающую хроническую токсичность за 24 суток экспозиции, если смертность дафний составит 20% и более и (или) в их плодовитости установлено достоверное отклонение от контроля; безвредную кратность разбавления вод, не вызывающую хроническую токсичность за 24 суток экспозиции, если смертность дафний составит менее 20% и (или) в их плодовитости не установлено достоверное отклонение от контроля.

### Обработка и оценка результатов при длительном биотестировании

Для определения хронической токсичности воды рассчитайте:

1. Процент погибших дафний в тестируемой воде для каждой серии по сравнению с контролем;
2. Среднее количество родившейся молоди на одну самку делением общего числа молоди, родившейся за 24 дня на на 30 (или выживших из 30) самок для каждой серии разведений;
3. Достоверное отклонение в количестве родившейся молоди на одну самку из числа выживших по отношению к контролю.

Для статистической обработки результатов проведите следующие расчеты:

Средний арифметический показатель плодовитости в контрольной и тестируемой

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n},$$

воде по формуле:

где  $n$  — количество параллельных серий (стаканов);  $x_i$  — количество молоди в  $i$ -том стакане.

Рассчитайте среднее квадратическое отклонение плодовитости по формуле:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}}$$

Определите ошибку среднего арифметического показателя плодовитости

$$m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}},$$

Затем определите показатель достоверности разности двух сравниваемых величин

$$t_d = \frac{\bar{x}_k - \bar{x}_t}{\sqrt{m_k^2 + m_t^2}},$$



где  $x_k, x_t$ —средние арифметические показатели плодовитости в контроле и тестируемой воде;  $m_k^2, m_t^2$ — квадраты ошибок среднего арифметического в контроле и тестируемой воде.

Рассчитанный показатель  $t_d$  сравните со значением критерия Стьюдента  $t_{st}$  для уровня значимости  $P=0,05$  и степени свободы  $f = n_k + n_t - 2$  (табл.7)

Таблица 7.

### Значения критерия Стьюдента ( $t_{st}$ )

<b>f</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<b><math>t_{st}</math></b>	12,7	4,3	3,18	2,78	2,57	2,45	2,36	2,31	2,26	2,23	2,20	2,18	2,16	2,14	2,13

16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
2,12	2,11	2,10	2,09	2,09	2,08	2,07	2,07	2,06	2,06	2,06	2,05	2,05	2,05	2,04

Если рассчитанная величина  $t_d$  больше или равна значению критерия Стьюдента  $t_{st}$ , то различие между величинами показателя в контрольной и тестируемой воде достоверно. В этом случае считают, что тестируемая вода оказывает хроническое токсическое действие на дафний.

Если рассчитанная величина  $t_d$  меньше  $t_{st}$ , то различие между сравниваемыми величинами недостоверно. В этом случае считают, что тестируемая вода не оказывает хронического токсического действия на дафний.

Результаты биотестирования разбавлений тестируемой воды с целью их использования при установлении величин ПДС или определения степени хронического токсического действия тестируемой воды обрабатывают с определением БКР (безвредная кратность разбавления, или кратность разбавления природной воды при которой хроническое токсическое действие не проявляется). Определяют минимальную кратность разбавления тестируемой воды, при которой различия между величинами показателей выживаемости и плодовитости дафний в контроле и соответствующем разбавлении будут недостоверными.

Если получают две разные величины минимальной кратности разбавления тестируемой воды (одну, при которой недостоверным будет отличие от контроля показателя выживаемости, и другую, при которой недостоверным окажется отличие от

контроля показателя плодovitости), вывод об отсутствии хронического токсического действия на дафний делают на основании большей величины.

### **Требования к оформлению отчета**

Отчет должен содержать:

1. Название и цель практической работы.
2. Краткое описание методики длительного биотестирования.
3. Результаты длительного биотестирования.
4. Анализ полученных результатов и выводы по практической работе.

### **Контрольные вопросы**

1. Почему необходимо проводить длительное биотестирование сточных вод?
2. Какие организмы применяются в качестве тест-объектов при длительном биотестировании?
3. Какой критерий токсичности Н.С. Строганов считал основным?
4. Какие шкалы состояния дафний используются при токсикологических опытах?
5. Что является критерием хронического токсического действия исследуемой воды?
6. Опишите процедуру длительного биотестирования и определения хронической токсичности сточных вод.
7. Как производится обработка и оценка результатов при длительном биотестировании?

**Форма регистрации условий и результатов биотестирования  
в рабочем журнале**

1. Дата, время отбора проб	20 ноября 2023 г, 10 <sup>00</sup>
2. Место отбора	Очистные сооружения г. Казани. Очищенная сточная вода, выходящая из вторичного отстойника
3. Используемые тест-организмы, возраст	Дафнии, возраст менее 24 часов, разница между особями не более 8 часов
4. Место биотестирования и условия	Люминостат, $t = 18-22^{\circ}\text{C}$ , фотопериод: 16 ч. световой, 8 часов – ночной, освещенность искусственная (550 лк)
5. Режим кормления	1 см <sup>3</sup> суспензии водорослей <i>Chlorella</i> на 100 см <sup>3</sup> исследуемой воды ежедневно
6. Повторности для каждой концентрации	3
7. Смена растворов	1 раз в пять дней
8. Исследуемые концентрации сточных вод	0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 100%
Соответствующая степень разбавления сточных вод, определяемая по формуле $X = \frac{\text{концентрация в исследуемой воде}}{\text{концентрация в общем растворе}} \times 100\%$	Без разбавления, в 2, 3, 9, 19, 99, 199 раз
10. $t^{\circ}\text{C}$ , pH, O <sub>2</sub> v исследуемой воде	Измерения перед началом биотестирования, при смене

	растворов, и при завершении экспериментов все показатели в пределах установленных в методике оптимальных значений
11. Кратность разбавления, вызывающая хроническую токсичность за 24 дня эксперимента	0,5 % концентрация сточных вод
12. Безвредная кратность разбавления, не вызывающая хроническую токсичность за 24 дня эксперимента	Не установлена