

Муниципальное бюджетное учреждение дополнительного образования
«Станция юных натуралистов» Асбестовского городского округа

Секция: Экология

**Тема: Токсичность почв в районе завода ФОРЭС методом
биотестирования (тест-объект *Daphnia magna*)**

Автор: Столярова Анастасия Денисовна

Научный руководитель: Столярова Оксана
Александровна, педагог дополнительного
Образования, 1КК

2020

Содержание

1.	Введение.....	3
2.	Теоретическая часть.....	4
2.1	Описание завода ФОРЭС.....	4
2.2	Проблемы загрязненности почвы в городах.....	4
2.3	Применение биологических методов для оценки качества среды обитания.....	5
3.	Методика проведения исследования.....	6
4.	Исследовательская часть.....	8
5.	Заключение.....	10
6.	Список литературы.....	11
7.	Приложения.....	13

Введение

Город Асбест, как и большинство городов Уральского региона, является промышленным городом. В окрестностях нашего города и вблизи него находится много промышленных предприятий, которые оказывают влияние на окружающую среду. Одним из заводов, находящихся в окрестностях Асбеста, является ФОРЭС.

В непосредственной близости к заводу ФОРЭС (в восточном направлении) расположены коллективные сады «Яблонька». Для людей дача - это место отдыха, место для выращивания сельскохозяйственных культур. А место отдыха должно быть экологически безопасным. Люди, имеющие дачные участки в районе завода, должны иметь достоверную информацию об экологическом состоянии данной местности. Поэтому тема данного проекта является **актуальной** для жителей города Асбеста.

Объект исследования: почва

Предмет исследования: токсичность почвы

Цель: оценка токсичности почвы в районе завода ФОРЭС методом биотестирования.

Для достижения цели я поставила перед собой **следующие задачи:**

1. изучить проблемы загрязнения почвы и методы оценки качества окружающей среды
2. отобрать пробы почв в районе завода ФОРЭС
3. подготовить образцы почв к биотестированию
4. провести биотестирование почв с помощью тест-объекта *Daphnia magna*

Теоретическая часть

Описание завода ФОРЭС

Завод ФОРЭС расположен в черте города Асбеста. На этом заводе производятся небольшие керамические гранулы - пропанты, которые помогают разорвать нефтяной пласт и повысить давление в нём. Основное вещество, которое выбрасывается в атмосферу - оливиновая пыль (кремнийсодержащая) и продукты сгорания природного газа (оксиды азота и CO₂). Выбросы каких-либо других металлов, солей и кислот отсутствуют. Благодаря постоянной модернизации сегодня предприятие выбрасывает в половину меньший объём веществ, чем ему разрешено. Стоков здесь вообще нет: сточные бытовые и промышленные воды, пройдя через очистные сооружения, включаются в технологический процесс.

Проблемы загрязненности почвы в городах

Почва является бесценным природным богатством, обеспечивающим человека необходимыми продовольственными ресурсами. Ничто не может заменить почвенный покров: без этого колоссального природного объекта невозможна жизнь на земле. Вместе с тем сегодня можно наблюдать неправильное использование почвы, что приводит к росту её загрязнения и, как следствие, снижению её плодородных свойств [9].

Загрязнение окружающей среды – процесс привнесения в среду или возникновение в ней новых, обычно нехарактерных для нее физических, химических, биологических агентов, оказывающих негативное воздействие [4]. Воздействие человека сказывается на всех природных ресурсах: почве, воде, флоре, фауне [3].

Особенностью загрязнения почв населенных мест химическими веществами является то, что загрязнения происходят одновременно от множества источников, в результате этого в почве накапливается сложная многокомпонентная смесь химических веществ различной природы. Из-за активного использования природных ресурсов, технического прогресса и ряда других факторов процесс загрязнения почвы становится неизбежным [8].

В составе почв обнаружены почти все известные химические элементы. Содержание отдельных химических элементов в почве колеблется в широких пределах [10]. Почвы, депонируя значительную часть атмосферных загрязнений, служат индикаторами техногенной нагрузки на окружающую среду [8]. Антропогенные факторы приводят к ухудшению состояния почв и в результате - к потере плодородия и неспособности выполнять свои экологические функции. Поэтому все более нарастает актуальность

своевременного и результативного мониторинга за состоянием окружающей среды, почвенного покрова.

Применение биологических методов для оценки качества среды обитания

При оценке состояния окружающей среды ведущая роль отводится физическим и химическим методам экологического контроля. Их сущность сводится к сравнению загрязнения отдельных компонентов природных комплексов с ПДК или ПДУ. Однако существующие нормативы не обеспечивают экологическую безопасность экосистем [4]. Используемые в производственных лабораториях методы физико-химического и аналитического контроля качества окружающей среды не всегда могут дать адекватную картину действия того или иного вещества на целостный организм. Кроме того, многие вещества как природного, так и синтетического происхождения, являются многокомпонентными, что затрудняет их физико-химическую стандартизацию.

В последние десятилетия для интегральной характеристики состояния среды стали интенсивно изучаться и применяться методы биологической оценки [3]. **Биологические методы** контроля в ряде ситуаций позволяют быстро оценивать качество окружающей среды и наличие некоторых загрязнений, не обнаруживаемых химическими методами контроля. Живые организмы способны воспринимать более низкие концентрации веществ, чем любой аналитический датчик [8].

Биологический контроль окружающей среды включает две основные группы методов: **биоиндикация и биотестирование** [4,5].

Биотестирование – процедура установления токсичности среды с помощью тест – объектов, сигнализирующих об опасности независимо от того, какие вещества и в каком сочетании вызывают изменения жизненно важных функций (тест-функций) [4,5].

Тест - объекты – это подопытные биологические объекты, используемые при оценке токсичности химических веществ, природных и сточных вод, почв и др. [4]. Тест – объекты должны удовлетворять следующим требованиям: должны быть **генетически однородными**, что обеспечивает сходство их чувствительности; **функциональная активность** тест - организмов **не должна иметь сезонной периодичности**, что позволит получить одни и те же результаты независимо от времени года; организмы должны иметь **высокий уровень метаболизма**, что обеспечит быстроту возникновения ответных реакций на действие токсиканта [8].

Методика проведения исследования

1. Отбор образцов проб почвы
2. Подготовка проб к анализу
 - 2.1 Доведение до воздушно-сухого состояния
 - 2.2 Составление смешанной пробы методом квартования
 - 2.3 Определение гигроскопичности образцов почв
3. Приготовление водных почвенных вытяжек
4. Проведение биотестирования
 - 4.1 Приготовление культуры водоросли *Chlorella* для кормления *Daphnia magna*
 - 4.2 Подготовка культивационной воды
 - 4.3 Подготовка синхронизированной культуры дафнии
 - 4.4 Проведение предупредительного контроля (модельного токсиканта)
 - 4.5 Исследование токсичности почвенных образцов
 - 4.6 Расчёт БКР (безопасная концентрация разбавления) и ЛКР (летальная концентрация разбавления).

Отбор образцов проб проводится согласно требованиям ГОСТ 17.4.4.02-84 [1] и ГОСТ 17.4.3.01-83 [2] (приложение №1).

Подготовка проб к анализу и проведения биотестирования осуществляется в соответствии с **ФР.1.39.2007.03222** «Биологические методы контроля. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, остатков сточных вод, отходов по смертности дафний и изменению плодовитости дафний» [7].

Исследовательская часть

1. Отбор образцов проб почвы проводили 16.09.2019 согласно методике проведения исследования. Пробы почв отобрали в направлении расположения садовых участков в 4 точках, точки на карте обозначены соответствующими цифрами (**рис. №2, приложение №1**):

1. в непосредственной близости к заводу ФОРЭС (вблизи ограждения с восточной стороны)

2. в районе санитарно – защитной зоны (далее - СЗЗ) завода (300м от ограждения завода в восточном направлении)

3. на расстоянии 1000 м от завода в восточном направлении

4. возле автотрассы при въезде в город Асбест

Пробы почв отбирали чистой лопатой в чистые пакеты. Пакеты пронумеровали на месте отбора (**рис. №1, приложение №1**).

2. Подготовка проб к анализу осуществлялась в соответствии с ФР.1.39.2007.03222 [7].

2.1 Все пробы после доставки в лабораторию были доведены до воздушно-сухого состояния (**рис. №3, приложение №2**).

2.2 Из подготовленных образцов почв методом квартования составили смешанные пробы (**рис. №3, приложение №2**).

2.3 У всех образцов почв определили гигроскопичность (**рис. №4, приложение №2**) в соответствии с требованиями методики исследования (**приложение №3**). Результаты гигроскопичности почвенных проб представлены в **таблицах №1-№3 (приложение №3)**.

3. Используя коэффициент гигроскопичности почвенных образцов, определили массы почв, необходимых для приготовления почвенных вытяжек (**таблица №4, приложение №3**). Приготовили почвенные водные вытяжки из всех образцов почв (**рис. №5, приложение №2**).

4. Проведение биотестирования осуществляли согласно ФР.1.39.2007.03222 [7].

4.1 Культуру водоросли *Chlorella* выращивали на питательной среде Тамия (**рис. 6, приложение №4**) в соответствии с **приложением №4**.

4.2 Культивационная вода должна соответствовать требованиям методики (**приложение №5**). В качестве **культивационной воды** использовали бутилированную негазированную питьевую воду «Чистогорье».

Температуру и водородный показатель культивационной воды определяли с помощью датчиков цифровой лаборатории «Сенсор-1». Общую жёсткость воды определили титриметрическим методом анализа согласно методике ПНД Ф 14.1:2. 98-97 [6]. Расчет жесткости представлен в **таблице №5 (приложение №5)**. По химическому составу данная вода соответствует требованиям культивационной воды (**таблица №6, приложение №5**).

4.3 Осуществили подготовку **синхронизированной культуры** дафнии (**приложение №6**). Этапы приготовления синхронизированной культуры указаны в **таблице №7 (приложение №6)**.

4.4 **Предупредительный контроль** провели 24.09.2019 согласно методике проведения исследования (**приложение №7**). Была приготовлена серия разбавлений бихромата калия ($K_2Cr_2O_7$) с концентрациями 0,5; 0,9; 1; 1,5; 2; 2,5; мг/дм³. Каждую концентрацию готовили в 3 повторностях. В каждый стакан посадили по 10 дафний (**рис. №7, приложение №7**). 25.09.2019 (через 24 часа) мы посчитали количество живых дафний в каждом стакане и рассчитали процентное количество погибших особей. Результаты контроля представлены в **таблице №8 (приложение №7)**. Согласно **рис. №8 (приложение №7)** по уравнению графика 50% гибель дафний наблюдается при концентрации $K_2Cr_2O_7$ 1,06 мг/дм³. Значит, культура дафний является чувствительной к действию токсиканта и может быть использована в биотестировании.

4.5 Определение токсичности почвенных образцов проводили в порядке, указанном в **приложении №8**. 27.09.2019 из водных почвенных вытяжек приготовили серии разбавлений с концентрациями: 100%, 30%, 9%, 5%, 1%. Все разбавления приготовила в трёх повторностях (**рис. №9, приложение №8**). Во всех приготовленных растворах измерили температуру и значения водородного показателя (**рис. №10, приложение №8**). Результаты зафиксировали в **таблице №14 «Условия проведения эксперимента» (приложение №12)**. Освещенность в кабинете находится в пределах от 580 до 820 лк (что соответствует требованиям методики).

В полученные растворы посадили по 10 дафний в каждый стакан (**рис. №11, приложение №8**). Через 24, 48, 72 и 96 часов подсчитывала количество погибших и выживших дафний. Данные заносили в **таблицу №9 «Результаты проведения биотестирования почвенных вытяжек» (приложение №9)**. 01.10.2019 по окончании эксперимента во всех стаканах замерили температуру и водородный показатель, данные в **таблице №14 (приложение №12)**.

В соответствии с ФР.1.39.2007.03222 рассчитали смертность дафний (**таблица №10, приложение №9**). Так же в соответствии с **приложением №10** рассчитали БКР (безопасная концентрация разбавления) для нетоксичных

образцов проб и ЛКР (летальная концентрация разбавления) для токсичных проб (таблица №13). Для расчёта ЛКР определили значения десятичных логарифмов разбавлений и значения пробитов процентной гибели дафний (таблица №12, приложение №10) и установили линейную зависимость данных значений (рис. №13, приложение №10)

Заключение

1. В ходе исследования я изучила проблемы загрязнения почвы и освоила биологический метод оценки качества среды обитания – биотестирование.

2. Для проведения исследования было отобрано и подготовлено к анализу 4 образца почв.

3. В ходе проведённого биотестирования **мы сделали следующие выводы:**

- Из 4 исследованных образцов почв только 1 образец (возле автотрассы) оказался токсичным. Образцы проб, собранные на разной удаленности от завода ФОРЭС, в нашем эксперименте оказались нетоксичными.

- С увеличением удаленности от завода ФОРЭС показатели токсичности почв снижаются. Это доказывается тем, что смертность дафний уменьшается (**рис. №13, приложение №11**), а БКР возрастает (**рис. №14, приложение №11**). Смертность дафний в почвенной вытяжке из образца почвы возле завода в 13,1 раза больше, чем смертность дафний в почвенной вытяжке из образца почв лесной зоны (в 1000м от завода), а БКР - меньше в 33 раза.

- Смертность дафний в почвенной вытяжке из образцов проб возле автотрассы в 1,2 раза выше, чем смертность дафний в почвенной вытяжке из образцов возле завода (**рис. №15, приложение №11**).

Таким образом, завод ФОРЭС не оказывает токсического действия на почвенные покровы исследуемых нами участков. А загруженные автотрассы оказывают более токсическое воздействие на почвы, чем завод ФОРЭС.

В дальнейшем мне было бы интересно подробнее изучить химический состав почв в данных точках отбора и сравнить их с результатами биотестирования.

Список литературы и интернет –источников

1. ГОСТ 17.4.4.02-84 Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического и гельминтологического анализа. - М: Стандартиформ. – 2008.
2. ГОСТ 17.4.3.01-83 Почвы. Общие требования к отбору проб. – М: ИПК Издательство стандартов. - 2004
3. Ершов Г.Л. Основы экологического мониторинга: учебное пособие для студентов и аспирантов высших учебных заведений/ Ростов-на-Дону: Феникс, 2016. - 239 с.
4. Ляшенко О.А. Биоиндикация и биотестирование в охране окружающей среды: учебное пособие/ СПб ГТУРП- СПб., 2012, 67с.
5. Мелехова О. П., Егорова Е. И., Евсеева Т. И. Биологический контроль окружающей среды: Биоиндикация и биотестирование: учеб, пособие для студентов. высших. учеб, заведений. 2007, 288с.
6. ПНД Ф 14.1:2.98-97Количественный химический анализ вод. Методика выполнения измерений жесткости в пробах природных и очищенных сточных вод титриметрическим методом. – Москва. – 1997.
7. ФР.1.39.2007.03222 Биологические методы контроля. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, остатков сточных вод, отходов по смертности дафний и изменению плодовитости дафний. – М: «Акварос». – 2007.
8. Чеснокова С.М, Чугай Н.В. Биологические методы оценки качества объектов окружающей среды: учебное пособие. В 2 частях. Часть 2. Методы биотестирования / Владимирский государственный университет- Владимир: издательство Владимирского государственного университета, 2008, 92 с.
9. Экологические проблемы загрязнения почвы и пути их решения [Электронный ресурс] // Дельта Эко URL: <https://delta-eco.ru/pererabotka/ekologicheskie-problemy-zagryazneniya-pochvy-i-puti-ih-resheniya.html>
10. Химический состав почв. Содержание химических элементов в почвах – Почвоведение. [Электронный ресурс] // Studme.org URL: https://studme.org/294250/ekologiya/himicheskiiy_sostav_pochv

Приложения

Приложение № 1

Требования к отбору проб почвы

1. Точечные пробы отбирают на пробной площадке (часть исследуемой территории, характеризующаяся сходными условиями) [2]. методом конверта, по диагонали или любым другим способом с таким расчетом, чтобы каждая проба представляла собой часть почвы, типичного для данного типа почв [1,2].

2. Объединенную пробу составляют путем смешивания точечных проб, отобранных на одной пробной площадке [1].

3. Для химического анализа объединенную пробу составляют не менее, чем из пяти точечных проб, взятых с одной пробной площадки.

4. Масса объединенной пробы должна быть не менее 1 кг

5. При отборе точечных проб и составлении объединенной пробы должна быть исключена возможность их вторичного загрязнения.

6. Все объединенные пробы должны быть зарегистрированы в журнале и пронумерованы [1].

Рис. №1 Отбор проб образцов почвы

Рис. №2 Точки отбора проб

Подготовка образцов почв к анализу

Рис. №3 Подготовка почвы к биотестированию

Рис. №4 Определение гигроскопичности почвенных образцов

Рис. №5 Приготовление водных почвенных вытяжек

Определение массовой доли почвы в воздушно-сухой пробе

(ФР.1.39.2007.032222 (п.7.5.2.2))

1. Взвешивают 2 пустых высушенных бюкса с крышками, затем взвешивают эти же бюксы с навесками воздушно-сухой пробы (около 1 г).

2. Устанавливают открытые бюксы с воздушно-сухими пробами в сушильный шкаф. Пробы выдерживают в сушильном шкафу в течение 3 ч при температуре от 105°С до 115 °С. Закрывают бюксы притертыми крышками, переносят их в эксикатор и выдерживают там до полного остывания (около 40 мин). Взвешивают бюксы с навесками пробы.

3. После взвешивания пробы почвы повторно высушивают в течение 2 ч, затем охлаждают в эксикаторе и снова взвешивают.

4. Рассчитывают значения коэффициента пересчета для каждого эксперимента по формуле:

$$K_i = \frac{M_{\text{абс.сух.}i} - M_{0i}}{M_{\text{возд.сух.}i} - M_{0i}},$$

где K_i - коэффициент пересчета в i -том измерении; $M_{\text{абс.сух.}i}$ - масса бюкса с абсолютно-сухим образцом в i -м измерении, г; $M_{\text{возд.сух.}i}$ - масса бюкса с воздушно-сухим образцом в i -м измерении, г; M_{0i} - масса пустого бюкса в i -м измерении, г.

5. Так как по результатам измерений получено 2 значения коэффициента, производят расчет его среднего значения ($K_{\text{ср}}$)

6. Далее среди 2 величин K_i рассчитывают размах (R) полученных значений с учетом максимального (K_{max}) и минимального (K_{min}) значения по формуле:

$$R = \frac{K_{\text{max}} - K_{\text{min}}}{K_{\text{ср}}} \cdot 100\%.$$

Если полученное значение $R > 10\%$, то эксперимент повторяют, устранив причину неудовлетворительных результатов [7].

Таблица № 1. Распределение бюксов по пробам

Номер пробы	Номер бюксов
1	1 и 7
2	2 и 6
3	3 и 8
4	4 и 5

Таблица № 2. Результаты взвешивания и расчёт коэффициента гигроскопичности (К)

Номер	Масса пустого бюкса, М ₀ , г	Масса бюкса с почвой, М ₁ , г	Масса после сушки, М ₂ , г	Коэффициент гигроскопичности, К _і ($K=(M_2- M_0)/(M_1-M_0)$)
1	8,25	13,3	12,9	0,921
2	8,00	12,25	11,85	0,906
3	8,65	12,8	12,5	0,928
4	8,20	12,65	12,25	0,910
5	8,50	13,6	13,25	0,931
6	7,80	12,9	12,5	0,922
7	9,65	15,15	14,7	0,918
8	8,75	14,95	14,5	0,927

Таблица №3. Расчёт гигроскопичности проб

Номер пробы	Номер бюксов	Размах значений, R, %	Норматив, N, %	Сравнение R и N	К (ср. арифм. двух рез.) ($K=(K_1+K_2)/2$)
1	1 и 7	0,3	10	0,3<10	0,92
2	2 и 6	1,8	10	1,8<10	0,91
3	3 и 8	0,1	10	0,1<10	0,93
4	4 и 5	2,3	10	2,3<10	0,92

Таблица №4. Расчёт массы почвы для приготовления почвенной вытяжки

Номер пробы	Коэффициент гигроскопичности, К	Масса почвы для приготовления водных вытяжек, М _п , г ($M=100/K$)
1	0,92	109
2	0,91	110
3	0,93	107
4	0,92	109

Приготовление водорослей для кормления дафний

(ФР.1.39.2007.03222 (п. 7.4))

Дафниям необходимо обеспечить комбинированное дрожжево-водорослевое питание. В качестве корма используются зеленые водоросли родов *Chlorella*.

Водоросли для кормления дафний выращивают в стеклянных кюветах или плоскодонных колбах вместимостью 250 см³ при освещении лампами дневного света (освещенность 3000 - 4000 лк), температуре от +22 °С до +25 °С, на одной из питательных сред, представленных в методике. Питательные растворы готовят на дистиллированной воде.

Чтобы избежать образования осадка в питательной среде, каждый ее компонент предварительно готовят отдельно в 100 см³ дистиллированной воды. Полученные растворы солей кипятят каждый по 30 мин, охлаждают, после чего их можно использовать для приготовления среды.

Для приготовления среды для культивирования водорослей добавляют по 1 см³ каждого концентрированного раствора (кроме солей железа) в колбу вместимостью 1 дм³, заполненную до половины дистиллированной водой, поочередно, в последовательности как указано в таблице №1, доводят до метки 1 дм³ дистиллированной водой, тщательно перемешивают, кипятят раствор 30 мин, охлаждают и после этого добавляют 1 см³ концентрированного раствора соли железа, и если это необходимо, отдельно приготовленные растворы микроэлементов.

Компоненты для приготовления среды Тамия (г/дм³): KNO₃ – 5,00; MgSO₄*7H₂O – 2,50; KH₂PO₄*3H₂O – 1,25; FeSO₄*7H₂O – 0,003.

Приготовленную питательную среду разливают в колбы по 100 см³ и добавляют 1 - 5 см³ концентрированной суспензии водорослей. Закрывают колбы ватными пробками.

Во время выращивания водорослей 2 - 3 раза в день встряхивают питательный раствор с водорослями, чтобы обеспечить удаление образующегося углекислого газа, при накоплении которого развитие водорослей угнетается [7].

Приложение № 5

Подготовка культивационной воды (ФР.1.39.2007.03222 (п.7.2))

Культивационная вода должна удовлетворять следующим требованиям:

- отсутствие органических загрязняющих веществ, хлора, токсических веществ;
- рН - 7,0 - 8,5;
- жесткость общая от 80 до 250 мг/дм³ (выраженная в СаСО₃), что соответствует 1,6 – 5,0 °Ж
- отсутствие углекислого газа, метана и др. газов (при наличии газов для их удаления культивационную воду кипятят 30 мин, затем охлаждают и аэрируют);
- концентрация растворенного кислорода - не менее 6 мг/дм³;
- температура (+20 ± 2) °С [7].

Таблица №5. Определение общей жёсткости культивационной воды.

Параллельные измерения	Объем воды, взятый для анализа, см ³	Объем титранта, см ³	Концентрация раствора трилона Б, моль/дм ³	Жесткость образца, °Ж	Результат повторности, °Ж	Норматив повторности, °Ж	Жесткость воды, °Ж (как ср. арифм. двух параллельных результатов)
1	100	9,30	0,010	1,86	0,01	0,11	1,87
2	100	9,35	0,010	1,87			

Таблица №6. Показатели культивационной воды.

Показатель	Концентрация, ед.изм.
Температура	20,1 °С
Водородный показатель	7,86 ед. рН
Сухой остаток*	Не более 540 мг/дм ³ *
Общая жёсткость	1,87 °Ж

Примечание: * - данные взяты с этикетки бутылки

Подготовка синхронизированной культуры дафний

(ФР.1.29.2007.03222(п.7.3.3))

Культуру дафний выращивают при поддержании искусственного освещения лампами дневного света с интенсивностью света от 500 до 1000 лк, 16-часовой световой и 8-часовой ночной (без освещения) период; температуру (+20 ± 2) °С. Кормят маточную и синхронизированную культуру дафний ежедневно, один раз в сутки, добавляя 7 - 10 см³ концентрированной водорослевой суспензии на 1 дм³ культивационной воды и 1 - 2 раза в неделю добавляя дополнительно 3 см³ дрожжевой суспензии на 1 дм³ культивационной воды.

Биотестирование воды и водных вытяжек проводят только на синхронизированной культуре дафний. **Синхронизированной** является одновозрастная культура, полученная от одной самки путем ациклического партеногенеза в третьем поколении. Такая культура генетически однородна. Рачки, ее составляющие, обладают близкими уровнями устойчивости к токсическим веществам, одновременно созревают и в одно время дают генетически однородное потомство. Для получения синхронизированной культуры отбирают одну самку средних размеров с выводковой камерой, заполненной эмбрионами, и помещают в химический стакан вместимостью 250 см³, заполненный культивационной водой на 200 см³. Появившуюся молодежь переносят в ёмкость (25 особей на 1 дм³ воды) и культивируют. Полученная третья генерация является синхронизированной культурой и может быть использована для биотестирования в возрасте 6 - 24 часов.

Пересадку плодоносящих самок в свежую культивационную воду осуществляют один раз в неделю. Родившуюся молодежь ежедневно отсаживают и используют для биотестирования [7].

Таблица №7. Подготовка синхронизированной культуры дафний

Дата	Действия	Поколение
03.09.2019	Отсадка дафний с эмбрионами в отдельный стакан	Маточная культура
06.09.2019	Появление молодежи. Отсадка маточной особи от молодежи. Пересадка молодежи в колбу объемом 250 см ³ .	Первое поколение
15.09.2019	Появление молодежи. Отсадка маточной особи от молодежи. Пересадка молодежи в колбу объемом 500 см ³ .	Второе поколение

24.09.2019	Появление молодежи. Отсадка маточной особи от молодежи. Пересадка молодежи в колбы объемом 1000 см ³ .	Синхронизированная культура(третье поколение)
------------	---	--

Приложение №7

Предупредительный контроль (ФР.1.39.2007.03222, п.12)

Предупредительный контроль качества оценки токсичности воды проводят один раз в квартал по определению чувствительности используемых тест-организмов к модельному «эталонному» токсиканту - калию двухромовокислому (K₂Cr₂O₇). Диапазон концентраций модельного токсиканта, при действии которого в течение 24 часов гибнет 50 % дафний, составляет 0,9 - 2,0 мг/дм³.

Определяют ту концентрацию модельного токсиканта, при которой за 24 часа гибнет 50 % подопытных организмов. Для этого методом последовательных разбавлений готовят серии растворов двухромовокислого калия в культивационной воде с концентрациями 0,5; 0,9; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 мг/дм³.

При проведении процедуры проверки чувствительности рачков к модельному токсиканту дафний не кормят.

Если концентрация двухромовокислого калия, вызвавшая острую токсичность, находится в интервале 0,9 - 2,0 мг/дм³, то чувствительность культуры дафний соответствует необходимым требованиям, и она может быть использована в биотестировании. [7].

Рис. №7 Проведение предупредительного контроля

Таблица №8. Результаты предупредительного контроля

Концентрация раствора K ₂ Cr ₂ O ₇ , мг/дм ³	Повторности	Количество дафний, 0 сутки, шт	Количество дафний через 24 часа, шт	Среднее количество выживших дафний, шт	Процент погибших дафний, %
Контроль	1	10	10	10	0%

	2	10	10		
	3	10	10		
0,5	1	10	9	8,7	13%
	2	10	9		
	3	10	8		
0,9	1	10	7	6,7	33%
	2	10	7		
	3	10	6		
1,0	1	10	4	4,3	57%
	2	10	4		
	3	10	5		
1,5	1	10	1	0,7	93%
	2	10	1		
	3	10	0		
2,0	1	10	0	0	100%
	2	10	0		
	3	10	0		
2,5	1	10	0	0	100%
	2	10	0		
	3	10	0		

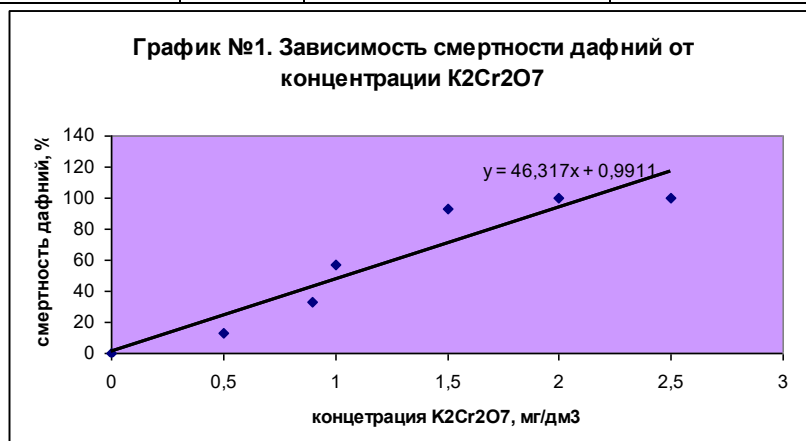


Рис. №8 Результат предупредительного контроля

Порядок проведения биотестирования (ФР.1.29.2007.03222)

Воды с неизвестной степенью токсичности анализируют в 100, 30, 9, 3 и 1 %-ной концентрациях. В качестве мерной посуды для объемов меньше 10 см³ используют мерные пипетки. Для объемов более 10 см³ - мерные цилиндры.

Определение токсичности каждой пробы без разбавления и каждого разбавления проводят в трех параллельных сериях. В качестве контроля используют три параллельные серии с культивационной водой.

Биотестирование проводят в химических стаканах вместимостью 100, которые заполняют исследуемой воды, в них помещают по десять дафний в возрасте 6 - 24 ч.

Посадку рачков начинают с контрольной серии. В исследуемые растворы дафний помещают, начиная с больших разбавлений к меньшим разбавлениям. После каждой посадки в исследуемые растворы сачок тщательно промывают в сосуде с культивационной водой.

В экспериментах по определению острой токсичности дафний кормят перед началом эксперимента, в последующие сутки ежедневно. Дафний в опыте кормят, добавляя 1,0 см³ концентрированной или разбавленной в два раза дистиллированной водой водорослевой суспензии на 100 см³ культивационной воды

Учет смертности дафний в опыте и контроле проводят через каждый час до конца первого дня опыта, а затем 2 раза в сутки ежедневно до истечения 96 часов.

Неподвижных особей считают погибшими, если не начинают двигаться в течение 15 секунд после легкого покачивания стакана.

Если гибель дафний в контроле превышает 10 %, результаты опыта не учитывают, и он должен быть повторен.

После того, как результаты эксперимента учтены, все дафнии из стаканов выбрасывают и в каждом стакане проводят измерения рН и температуры. Температура должна находиться в диапазоне 18-22⁰С, рН в диапазоне [7].

Рис. №9 Приготовление разбавлений водных почвенных вытяжек

Рис. №10 Измерение температуры и рН в растворах почвенных вытяжек

Рис. №11 Посадка дафний в растворы почвенных вытяжек

Приложение №9

Результаты проведения биотестирования

Таблица №9. Результаты проведения биотестирования почвенных вытяжек

Номер пробы	Разбавления, %	Повторности	Количество посаженных дафний, шт	Количество дафний, шт			
				через 24 часа	через 48 часов	через 72 часа	через 96 часов
1	2	3	4	5	6	7	8
№1	100	1	10	10	8	6	5
		2	10	10	8	6	6
		3	10	10	7	6	6
	30	1	10	10	9	8	8
		2	10	10	9	9	8
		3	10	10	9	7	7
	9	1	10	10	10	9	9
		2	10	10	9	9	8
		3	10	10	9	9	9
	3	1	10	10	10	10	10
		2	10	10	10	3	9
		3	10	10	10	10	10
	1	1	10	10	10	10	10
		2	10	10	10	10	10
		3	10	10	10	10	10
№2	100	1	10	9	8	8	8
		2	10	10	10	9	9
		3	10	9	9	9	9
	30	1	10	10	9	9	9
		2	10	10	10	10	10
		3	10	9	9	9	9
	9	1	10	10	10	10	10
		2	10	10	10	10	10
		3	10	10	10	10	10
	3	1	10	10	10	10	10
		2	10	10	10	10	10
		3	10	10	10	10	10
	1	1	10	10	10	10	10
		2	10	10	10	10	10
		3	10	10	10	10	10
№3	100	1	10	10	9	9	9
		2	10	10	10	10	10
		3	10	10	10	10	10
	30	1	10	9	9	9	9
		2	10	10	10	10	10
		3	10	10	10	10	10
	9	1	10	10	10	10	10
		2	10	10	10	10	10
		3	10	10	10	10	10

	3	1	10	10	10	10	10
		2	10	10	10	10	10
		3	10	10	10	10	10
	1	1	10	10	10	10	10
		2	10	10	10	10	10
		3	10	10	10	10	10
№4	100	1	10	7	6	6	5
		2	10	7	5	5	4
		3	10	7	6	5	5
	30	1	10	9	9	8	6
		2	10	9	8	7	6
		3	10	8	8	7	6
	9	1	10	10	9	9	8
		2	10	9	9	9	8
		3	10	10	10	9	9
	3	1	10	10	10	10	9
		2	10	10	10	10	9
		3	10	10	10	10	10
	1	1	10	10	10	10	10
		2	10	10	10	10	10
		3	10	10	10	10	10
контроль	100	1	10	10	10	10	10
		2	10	10	10	10	10
		3	10	10	10	10	10

Таблица №10. Расчёт смертности дафний в опыте

Номер пробы	Исследуемая концентрация	Количество выживших дафний через 96 часов		Смертность в опыте, % ($A = (X_k - X_t) / X_k * 100\%$)
		в опыте (ср. ар. повторностей) X_t	в контроле, X_k	
№1	100	5,67	10	43,3
	30	7,67	10	23,3
	9	8,67	10	13,3
	3	9,67	10	3,3
	1	10	10	0
№2	100	8,67	10	13,3
	30	9,33	10	6,7
	9	10	10	0
	3	10	10	0
	1	10	10	0
№3	100	9,67	10	3,3
	30	9,67	10	3,3
	9	10	10	0
	3	10	10	0
	1	10	10	0

№4	100	4,67	10	53,3
	30	6	10	40
	9	8,33	10	16,7
	3	9,33	10	6,7
	1	10	10	0

Приложение №10

Определение БКР и ЛКР

При определении острой токсичности устанавливают:

- среднюю **летальную кратность разбавления** вод, водных вытяжек, вызывающую гибель 50 % тест-объектов за 96-часовую экспозицию (ЛКР₅₀₋₉₆);
- **безвредную кратность разбавления** вод, водных вытяжек, вызывающую гибель не более 10 % тест-объектов за 96-часовую экспозицию (БКР₁₀₋₉₆).

Для определения острой токсичности рассчитывают процент погибших в тестируемой воде дафний (A) по сравнению с контролем по формуле:

$$A = \frac{X_k - X_t}{X_k} \cdot 100\%,$$

где X_k - количество выживших дафний в контроле; X_t - количество выживших дафний в исследуемой воде.

При $A < 10$ % исследуемая вода или водная вытяжка не оказывает острого токсического действия (безвредная кратность разбавления). При $A > 50$ % тестируемая вода, водная вытяжка оказывает острое токсическое действие (средняя летальная кратность разбавления).

Если экспериментально не удалось получить точного значения кратности разбавления, вызывающей 50 %- ную гибель дафний за 96 часов экспозиции, то для получения точного значения ЛКР₅₀₋₉₆ используют графический метод определения.

Чтобы получить на графике линейную зависимость, используют **пробит-анализ**. Для экспериментально установленного процента гибели дафний определяют значения пробитов по **таблице №11** и значения десятичных логарифмов для исследованных концентраций водных вытяжек из почв,

По значениям пробитов и десятичных логарифмов от экспериментально полученных данных строят график. По оси абсцисс откладываются значения логарифмов процентных концентраций исследуемых вод, по оси ординат - пробиты от значений процента гибели дафний. Экспериментально полученные значения вносятся в систему координат, и через точки проводят прямую.

Таблица №11. Значения пробитов для экспериментально устанавливаемой гибели дафний

Гибель, %	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,35	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,83	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,4	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33

По уравнению зависимости рассчитать логарифм концентрации. Далее логарифм концентрации переводят в процентную концентрацию [7].

Таблица №12. Значения логарифмов и пробитов

Номер пробы	Разбавление, раз	Десятичный логарифм разбавления	Смертность дафний	Значение пробитов для % гибели
№4	1	0,00	0	
	3	0,48	6,7	3,52
	9	0,95	16,7	4,05
	30	1,48	40	4,75
	100	2,00	53,3	5,08

Рис. №12 Расчет ЛКР

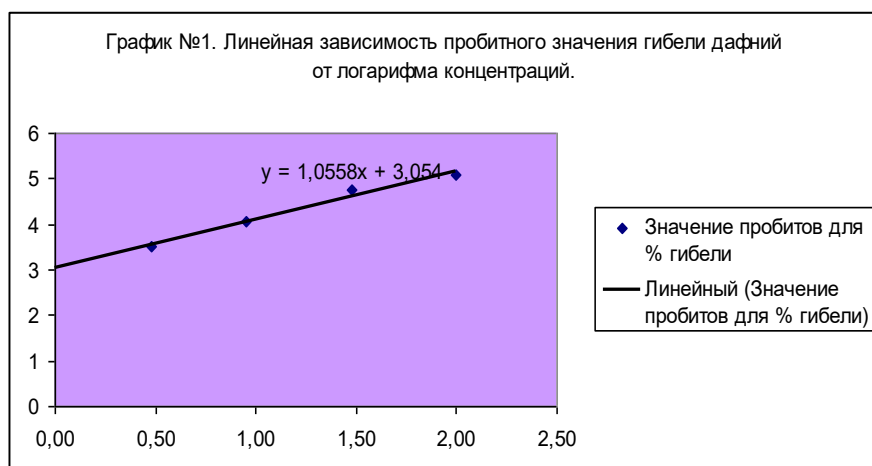


Таблица №13. БКР и ЛКР почвенных образцов

Номер пробы	БКР 10-96	ЛКР 50-96
1	3%	-
2	30%	-
3	100%	-
4	3%	75%

Выводы

Рис. №13. Смартность дафний в почвенных вытяжках

Рис. №14. БКР почвенных вытяжек образцов почв возле завода

Рис. №15. Сравнение смертности дафний в почвах возле завода и автотрассы

Таблица №14. Условия проведения эксперимента

Номер пробы	Разбавление, %	До начала эксперимента						После окончания эксперимента					
		Температура, 0С			Водородный показатель, ед. рН			Температура,0С			Водородный показатель, ед. рН		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	1	19,6	19,6	19,6	7,69	7,73	7,62	19,3	19,2	19,3	7,74	7,78	7,69
	3	19,6	19,6	19,6	8,00	7,97	8,02	19,2	19,2	19,2	8,07	8,06	8,06
	9	19,6	19,6	19,7	8,12	8,07	8,11	19,3	19,2	19,2	8,10	8,09	8,12
	30	19,6	19,5	19,6	8,02	8,05	8,01	19,2	19,2	19,3	8,06	8,07	8,10
	100	19,4	19,6	19,6	8,03	8,04	8,03	19,2	19,3	19,2	8,03	8,06	8,01
2	1	19,7	19,7	19,6	8,02	8,01	8,02	19,7	19,6	19,6	8,03	8,03	8,03
	3	19,6	19,7	19,6	8,05	8,05	8,06	19,7	19,5	19,6	8,05	8,04	8,06
	9	19,7	19,7	19,6	8,07	8,06	8,06	19,7	19,6	19,6	8,10	8,10	8,09
	30	19,6	19,6	19,7	8,15	8,15	8,14	19,6	19,4	19,6	8,16	8,15	8,15
	100	19,5	19,6	19,6	8,22	8,20	8,21	19,5	19,6	19,5	8,28	8,26	8,24
3	1	19,6	19,6	19,6	8,11	8,11	8,11	19,6	19,6	19,6	8,12	8,11	8,12
	3	19,6	19,5	19,6	8,15	8,15	8,15	19,6	19,6	19,6	8,17	8,16	8,18
	9	19,6	19,5	19,5	8,19	8,17	8,17	19,7	19,6	19,5	8,22	8,23	8,22
	30	19,5	19,6	19,6	8,21	8,21	8,21	19,6	19,7	19,6	8,64	8,63	8,65
	100	19,6	19,5	19,6	8,29	8,30	8,29	19,6	19,6	19,6	8,32	8,30	8,30
4	1	19,6	49,6	19,6	8,03	8,03	8,04	19,5	19,5	19,5	8,01	8,00	8,02
	3	19,5	19,5	19,5	8,05	8,06	8,05	19,6	19,6	19,6	8,05	8,04	8,08
	9	19,7	19,6	19,6	8,07	8,08	8,09	19,6	19,6	19,6	8,09	8,08	8,10
	30	19,5	19,5	19,5	8,10	8,11	8,12	19,6	19,5	19,6	8,12	8,12	8,13
	100	19,6	19,6	19,6	8,18	8,19	8,18	19,5	19,5	19,6	8,20	8,23	8,21