

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО РЫБОЛОВСТВУ

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Государственный научно-исследовательский институт озерного и
речного рыбного хозяйства им. Л.С.Берга»**



УТВЕРЖДАЮ
Заместитель директора ФГБНУ «ГосНИОРХ»

А.А. Полевский
2018

**ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ**



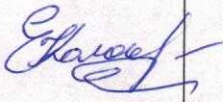
**«ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТА «УНИГАРД М» ДЛЯ
ОЦЕНКИ ЕГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ВОДНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ»**

Руководитель темы:
И.о. зав лабораторией, к.г.н.

Ю.В.Крылова

Санкт-Петербург 2018

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

И.о. зав. лабораторией экологической токсикологии, к.г.н		Ю.В. Крылова
Старший научный сотрудник, экологической токсикологии, к.б.н		Г.Ф. Ляшенко
Н.с. лаборатории экологической токсикологии		Е.В. Колосовская

Реферат

Отчет 17 с., 2 рис., 3 табл., 3 источника, 1 приложение

ВОДА, ТЕСТ – ОБЪЕКТЫ, БИОТЕСТИРОВАНИЕ, ВОДОРΟΣЛИ,
РАКООБРАЗНЫЕ, «УНИГАРД М».

В отчете представлены результаты биотестирования водной вытяжки из полимерного материала «Унигард М». Установлено, что водная вытяжка из анализируемого материала как неразведённая, так и в разведении 1:10 и 1:100. не оказывает токсичного воздействия (безвредна) для *Daphnia magna* и *Scenedesmus quadricauda*

Содержание

Список исполнителей	2
Реферат	3
Содержание	4
Введение	5
1 Материал и методы	6
2 Результаты биотестирования водной вытяжки материала «Унигард М» с различной степенью разведения на планктонном ракообразном <i>Daphnia magna</i> и зелёной водоросли <i>Scenedesmus quadricauda</i>	10
Заключение	13
Список использованных источников	13
Приложение	14

Введение

В связи с использованием различных полимерных материалов в качестве покрытий ёмкостей, используемых для разведения и содержания рыб, возникает проблема оценки их экологической безопасности. Традиционные методы химического и физико-химического анализа не позволяют оценить состояние воды как среды обитания живых организмов. Даже полная характеристика химического состава воды не дает представления о ее общей токсичности, ее пригодности для жизни гидробионтов.

Для интегральной оценки токсичности водной среды для гидробионтов широко используется метод биотестирования, основанный на оценке реакции тест-организма на присутствие в испытуемой пробе воды комплекса загрязняющих веществ.

Целью данной работы была оценка токсичности методом биотестирования материала «Унигард М» и определение безопасного для гидробионтов разведения водной вытяжки материала.

Исследования проведены на двух тест-объектах – планктонном ракообразном *Daphnia magna* Straus и зелёной водоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp) Breb. Исследуемый препарат «Унигард М» предоставлен Заказчиком.

1 Материал и методы

Представленная проба полимерного материала «Унигард М» анализировалась в лабораторных условиях по методикам ФР.1.39.2007.03222 и ФР.1.39.2007.03223, допущенной для целей государственного экологического контроля, разработанной ООО «Акварос» и аттестована в соответствии с ГОСТ Р 8.563-96 и ГОСТ Р ИСО 5725 – 2002 (Части 1-6) [1,2,3].

Для приготовления водной вытяжки из материала «Унигард М» в соответствии с методическими указаниями измельченный образец материала заливался культивационной (для опыта с дафниями) или дистиллированной (для опыта с водорослями) водой (в соотношении твёрдая фаза: жидкость равном 1:10) согласно требованиям к биотестированию твёрдых отходов. Смесь перемешивалась в мешалке в течение 8 часов с последующим отстаиванием (12 часов). Полученную жидкость над осадком подвергали процедуре биотестирования.

В настоящем исследовании при определении токсичности пробы методом биотестирования использовали в качестве тест-организмов международный стандартный биосигнализатор - *Daphnia magna* Straus и зеленую водоросль *Scenedesmus quadricauda* (Turp).

Daphnia magna относится к низшим ракообразным, отряду ветвистоусых. Дафнии обитают в планктоне стоячих и слабопроточных пресноводных водоемов, широко распространены на территории России.

Морфология. Тело дафний овальной формы, сжато с боков, заключено в прозрачный панцирь. Тело нечетко сегментировано на головной, грудной и брюшной отделы (рис. 1). Голова покрыта щитом, передний край которого вытянут, образуя рострум. Под рострумом расположены две пары конечностей: антеннулы и антенны, последние сильно развиты, служат для скачкообразного перемещения в толще воды. Пять пар грудных конечностей сильно расчленены, снабжены щетинками, служат для фильтрации воды, питания, дыхания. Брюшной (абдоминальный) отдел туловища заканчивается постабдоменом, дорсальный край которого имеет выемку, характерную для дафний данного вида. Расположение внутренних органов представлено на рис. 1. В головном отделе, не покрытом раковиной, расположена пара глаз: большой — сложный, маленький — простой. Под панцирем дафний легко различимы сердце, кишечник, выводковая камера, которая находится в спинной части туловища. В выводковой камере протекает эмбриональное развитие дафний.

Рост, развитие и размножение. Наиболее интенсивно дафния растет первые дни после рождения, при каждой линьке сбрасывая старый панцирь. Оптимальное питание

обеспечивает удвоение размеров рачков в промежутке между линьками. После наступления половой зрелости рост дафний замедляется, снижается и частота линек. Всего в течение жизни дафния может линять до 24 раз. Выметанная молодь имеет в длину 0,7-0,9 мм, половозрелые самки — 2,2-2,4 мм, самцы — 2,0-2,1 мм. Максимальные размеры самок — 6,0 мм при сыром весе 7-10 мг. В природе в летнее время, а в лаборатории при оптимальных условиях культивирования круглый год дафнии размножаются без оплодотворения — партеногенетически (рождаются только самки). При резком изменении условий существования или культивирования (похолодание, голод, перенаселенность и т.п.) в культуре появляются самцы. Самцы отличаются от самок меньшими размерами, видоизмененной формой тела, антеннул, постабдомена. Резкое изменение условий существования вызывает переход к половому размножению, дафнии откладывают "зимние яйца", размещающиеся в эффипиуме, образованном из части створок панциря. При очередной линьке эффипиум отделяется (в природе — осенью), падает на дно водоема, где яйца проходят стадию зимнего покоя. Весной из них появляются самки, снова переходящие к партеногенетическому размножению.

Период созревания рачков при оптимальной температуре ($+20 \pm 2^\circ\text{C}$) и хорошем питании — 5-8 суток, длительность эмбрионального развития — 3-4 суток, а при повышении температуры до 25°C — 46 часов. Затем происходит вымет молоди (партеногенетических самок) каждые 3-4 суток. Количество молоди у молодых самок — 10-15, у зрелых — 30-40 особей. В природе дафнии живут в среднем 20-25 суток, а в лаборатории при оптимальном режиме — 3-4 месяца и более. При температуре свыше 25°C продолжительность жизни дафний может сокращаться до 25 суток. Голодание увеличивает продолжительность жизни, но задерживает рост и наступление линек.

Питание и отношение к содержанию кислорода. По характеру питания относятся к фильтраторам, в природе дафнии питаются взвешенными в воде бактериями, одноклеточными водорослями, детритом, растворенными органическими веществами. Пища поступает с потоком воды, направленным грудными конечностями, через выросты — в брюшной желоб вдоль основания конечностей и ко рту рачка. Оптимальное для жизнедеятельности дафний содержание растворенного в воде кислорода — $6-7 \text{ мг/дм}^3$. Однако дафния достаточно устойчива к изменению кислородного режима и снижению растворенного в воде кислорода до 2 мг/дм^3 и ниже, что связано с ее способностью синтезировать гемоглобин. Повышенное содержание гемоглобина в крови дафний при ухудшении кислородного режима сопровождается окрашиванием рачков в красный цвет.

Острые опыты (кратковременное биотестирование) позволяют оценить токсичность представленной пробы уже через 96 часов, по выживаемости тест-организмов. Показатель выживаемости – среднее количество дафний, выживших в тестируемой пробе за определенное время. Критерием острой токсичности является гибель 50 и более % дафний за период времени до 96 часов в тестируемой пробе по сравнению с контролем.

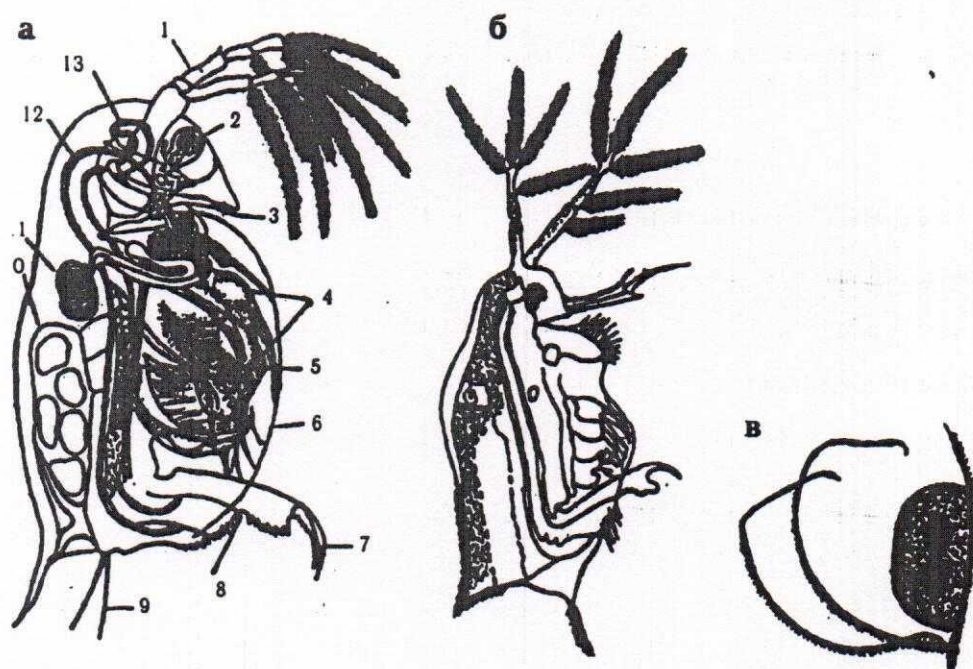


Рис. 1. Строение *Daphnia magna* Straus: а — самка: 1 — антенна, 2 — сложный глаз, 3 — антеннула, 4 — грудные ножки, 5 — яичник, 6 — створки панциря, 7 — каудальные когти, 8 — постабдомен, 9 — хвостовые щетинки, 10 — выводковая камера, 11 — сердце, 12 — кишечник, 13 — печеночные выросты; б — самец; в — внешний вид эффипиума

Scenedesmus quadricauda относится к ценобиальным организмам (рис.2). Вид распространен в разнообразных биотопах, главным образом в планктонных слоях пресных водоемов.

Систематическое положение

Отдел - Chlorophyta

Класс – Euchlorophyceae

Порядок – Chlorococcales

Семейство – Scenedesmaceae

Подсемейство – Scenedesmoideae

Род – Scenedesmus Meyen

Вид – Scenedesmus quadricauda (Turp.) Breb

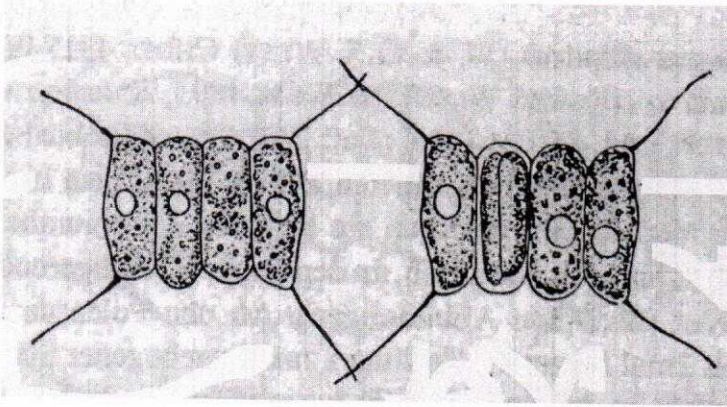


Рис.2 Зелёная хлорококковая водоросль *Scenedesmus quadricauda*

Водоросль образует ценобии 2-, 4-, реже 8-, 16-клеточные, в виде плоских пластинок. Клетки - удлиненно-овальные, с закругленными концами, краевые клетки имеют два отогнутых наружу рога. Оболочка гладкая. Размеры клеток 7 – 43 на 2,5 – 15 мкм. Размножается автоспорами. Автоспоры располагаются пучком, после освобождения разворачиваются в виде пластинки. Вместо ценобиев могут формироваться отдельные клетки.

Биотестирование проводилось в люминостате, при наличии дополнительного освещения лампами дневного света и 24-часового светового режима.

Для процедуры биотестирования использовалась 3-5 суточная альгологически чистая культура *Scenedesmus quadricauda*, находящаяся на экспоненциальной стадии роста.

Для определения токсичности исследуемого вещества в стеклянные плоскодонные колбы объемом 250 см³ добавляли по 100 см³ контрольной воды (дистиллированной, со значением pH = 7-7,5) или водной вытяжки в различной степени разведения (повторность двукратная). Затем, в каждую колбу пипеткой, стерильно, над пламенем горелки, добавили по 0,1 см³ концентрированного раствора реактивов в следующем порядке: KNO₃, MgSO₄ · 7H₂O, K₂HPO₄ · 3H₂O, FeCl₃ · 6H₂O. После чего во все колбы добавили равные объемы суспензии водорослей.

После добавления водорослей и перемешивания производили подсчет клеток водорослей в камере «Учинская» во всех контрольных и испытуемых пробах. После подсчета колбы помещались в люминостат.

Клетки водорослей поддерживали во взвешенном состоянии в колбах путем встряхивания 1-2 раза в сутки. Далее производили подсчет численности клеток в камере «Учинская» в контрольных и опытных колбах через 72 ч от начала биотестирования.

2 Результаты биотестирования водной вытяжки материала «Унигард М» с различной степенью разведения на планктонном ракообразном *Daphnia magna* Straus и на зелёной водоросли *Scenedesmus quadricauda*

Результаты биотестирования водной вытяжки материала «Унигард М» с различной степенью разведения в остром опыте (96 ч.) представлены в таблице 1.
Таблица 1 – Результаты биотестирования одной вытяжки материала «Унигард М» на тест-объекте *Daphnia magna* Straus в остром опыте (96 ч.)

№ пробы, кратность разбавления	Выживаемость, % Экспозиция, час				ЛТ ₅₀ сутки	% гибели	Заключение о токсичности
	24	48	72	96			
№ 1 1:1	100,0	100,0	100,0	96,7	>4	3,3	Безвредна
№ 2 1:10	100,0	100,0	100,0	100,0	>4	0	Безвредна
№ 3 1:100	100,0	100,0	100,0	100,0	>4	0	Безвредна
№ 4 1:1000	100,0	100,0	100,0	100,0	>4	0	Безвредна
Контроль	100,0	100,0	100,0	100,0	>4	0	-

Исследования показали, что в опыте с экспозицией 96 часов, водная вытяжка полимерного материала «Унигард М» (без разведения) вызывала гибель менее 10% экземпляров тест-объекта. Таким образом, водную вытяжку (без разбавления) полимерного материала «Унигард М» можно признать безвредной по показателю «токсичность».

По применяемым методическим руководствам для оценки токсичности достаточно острого опыта, однако, для более корректной оценки токсичного воздействия водной вытяжки исследуемого материала наблюдения за пробами были продолжены до завершения хронического опыта, который длится в течение 20 суток.

Результаты биотестирования водной вытяжки материала «Унигард М» с различной степенью разведения в хроническом опыте представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты биотестирования одной вытяжки материала «Унигард М» на тест-объекте *Daphnia magna* Straus в хроническом опыте (20 сут.)

Время от начала биотестирования, сут	Шифр пробы, вид пробы	Количество выживших дафний (суммарное кол-во по параллельным сериям), экз.		Процент гибели самок по отношению к контролю	Плодовитость дафний (рассчитывается на одну выжившую самку среднее арифметическое по параллельным сериям), экз.		Критерии достоверности отклонений опытных данных от контрольных по плодовитости дафний «+» - достоверное отличие «-» - не достоверное отличие	Оценка качества водной среды: оказывает (не оказывает) хроническое токсическое действие
		в контроле	в опыте		в контроле	в опыте		
25	Водная вытяжка «Унигард М» без разведения	29	26	10,3	6,4	18,7	-	Не оказывает
25	Водная вытяжка «Унигард М» с разведением 1:10	29	28	3,4	6,4	6,0	-	Не оказывает
25	Водная вытяжка «Унигард М» с разведением 1:100	29	28	3,4	6,4	6,8	-	Не оказывает
25	Водная вытяжка «Унигард М» с разведением 1:1000	29	29	0	6,4	7,0	-	Не оказывает

Результаты хронического опыта показали, что водная вытяжка полимерного материала «Унигард М» без разведения не обладает хронической токсичностью по обеим тест-функциям: выживаемость и плодовитость дафний.. Разведенная водная вытяжка (1:10-1:1000) токсичного воздействия в хроническом опыте также не оказывала.

Результаты биотестирования водной вытяжки материала «Унигард М» на клетках зелёной водоросли *Scenedesmus quadricauda* представлены в таблице 3.

Результаты биотестирования показали, что водная вытяжка из материала «Унигард М» безвредна для водорослей в неразведённом состоянии и при кратностях разведения 1:10 и 1:100.

Таблица 3 – Результаты биотестирования материала «Унигард М» на *Scenedesmus quadricauda* (72 ч).

Численность клеток в начале эксперимента - 28 тыс кл/ см³

N пробы	Кратность разведения вытязки	№ повторностей	Численность водорослей, тыс. кл/см ³		Средние значения \bar{x} измерений, тыс. кл/ см ³	Фактическая повторяемость для 2-х повторностей	Ср. значение по 2-м повторностям, тыс. кл/см ³	Значение погрешности измерений, тыс кл/см ³	Конечный результат измерений, тыс кл/см ³	Отклонение от контроля, %
			1	2						
Контроль		1	539	583	561					
		2	568	624	596	6	578	185	578±185	
Опыт	Неразведённая	1	586	542	564					
		2	595	625	610	8	587	188	587±188	+2%
	1/10	1	557	622	590					
		2	548	566	557	6	573	183	573±183	1%
	1/100	1	514	582	548					
		2	513	528	520	5	534	171	534±171	8%

Заключение

Результаты биотестирования водной вытяжки из материала «Унигард М» на двух тест-объектах – планктонном ракообразном *Daphnia magna* Straus и зеленой водоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp) Vreb показали, что вытяжка испытуемого материала без разведения безвредна для тест-объектов.

Результаты опытов с водной вытяжкой из полимерного материала в разведении 1:10-1:1000 для опытов с дафниями, и в разведении 1:10-1:100 для опытов со сценедесмусом также показали, что они безвредны для обоих тест-объектов.

Список использованных источников

- 1 Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний ФР.1.39.2007.03222, допущенной для целей государственного экологического контроля, разработанной ООО «Акварос» и аттестована в соответствии с ГОСТ Р 8.563-96 и ГОСТ Р ИСО 5725 – 2002 (Части 1-6), (Москва, 2007)
- 2 Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флюоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей ФР.1.39.2007.0322, допущенной для целей государственного экологического контроля, разработанной ООО «Акварос» и аттестована в соответствии с ГОСТ Р 8.563-96 и ГОСТ Р ИСО 5725 – 2002 (Части 1-6), (Москва, 2007)
- 3 Методические рекомендации по биотестированию природных, сточных вод и отдельных загрязняющих веществ, ВНИРО, Москва 1982



Федеральное агентство по рыболовству

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ОЗЕРНОГО И РЕЧНОГО РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА им. Л. С. БЕРГА»
ФГБНУ «ГОСНИОРХ»

ЛАБОРАТОРИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ТОКСИКОЛОГИИ

199053 г. Санкт-Петербург, наб. Макарова, 26 тел.(812)400-01-77, факс.(812)400-01-78

Протокол биотестирования № Э-120/18

от «12» сентября 2018 г.

Наименование организации: НПК «Реагент»

Место отбора, наименование проб: Полимерный материал «Унигард М»

Биотестируемая среда: водная вытяжка полимерного материала

Условия отбора и транспортировки проб: материал предоставлен заказчиком.

Дата отбора проб: 31.07.2018

Дата доставки проб: 03.08.2018

Акт приемки: №Э- 270 от 03.08.2018

Используемая МВИ: ФР.1.39.2007.03222; ФР.1.39.2007.0322

Характеристика условий испытаний и внешних факторов:

в начале биотестирования на *Daphnia magna*: O_2 – 7,8 мг/дм³, рН – 7,9, Т – 20,5 °С;
при завершении биотестирования: O_2 – 6,9 мг/дм³, рН – 7,7, Т – 20,5 °С;

в начале биотестирования на *Scenedesmus quadricauda*: O_2 – 6,8 мг/дм³, рН – 6,9, Т – 21,7 °С;
при завершении биотестирования: O_2 – 8,3 мг/дм³, рН – 7,8, Т – 20,8 С


Таблица 1– Результаты измерений с учетом данных контроля приемлемости результатов измерений

Рег. № пробы, тип пробы	Время хранения от отбора проб до начала биотестирования	Дата, время биотестирования	Тестируемая проба	Тест-объект	Продолжительность наблюдения (час.)	Оценка тестируемой пробы
№ Э-774.1 Водная вытяжка «Унигард М» без разведения 1:1	Перемешивание и отстаивание 20 ч.	15.08.2018	Водная вытяжка	<i>Daphnia magna</i>	96 ч	Безвредна
		27.08.2018		<i>Scenedesmus quadricauda</i>	72 ч.	Безвредна
№ Э-774.2 Водная вытяжка «Унигард М» в разведении 1:10	Перемешивание и отстаивание 20 ч.	15.08.2018	Водная вытяжка	<i>Daphnia magna</i>	96 ч	Безвредна
		27.08.2018		<i>Scenedesmus quadricauda</i>	72 ч.	Безвредна
№ Э-774.3 Водная вытяжка «Унигард М» в разведении 1:100	Перемешивание и отстаивание 20 ч.	15.08.2018	Водная вытяжка	<i>Daphnia magna</i>	96 ч	Безвредна
		27.08.2018		<i>Scenedesmus quadricauda</i>	72 ч.	Безвредна
№ Э-774.4 Водная вытяжка «Унигард М» в разведении 1:1000	Перемешивание и отстаивание 20 ч.	15.08.2018	Водная вытяжка	<i>Daphnia magna</i>	96 ч	Безвредна

Таблица 2 – Результаты определения хронической токсичности (20 суток) проб водной вытяжки полимерного материала «Унигард М» по смертности тест-объекта *Daphnia magna* Straus

Время от начала биотестирования сут	Шифр пробы, вид пробы	Количество выживших дафний (суммарное кол-во по параллельным сериям), экз.		Процент гибели самок по отношению к контролю	Плодовитость дафний (рассчитывается на одну выжившую самку среднее арифметическое по параллельным сериям), экз.		Критерии достоверности и отклонений опытных данных от контрольных по плодовитости дафний «+» - достоверное отличие «-» - не достоверное отличие	Оценка качества водной среды: оказывает (не оказывает) хроническое токсическое действие
		в контроле	в опыте		в контроле	в опыте		
25	Водная вытяжка «Унигард М» без разведения	29	26	10,3	6,4	18,7	-	Не оказывает
25	Водная вытяжка «Унигард М» в разведении 1:10	29	28	3,4	6,4	6,0	-	Не оказывает
25	Водная вытяжка «Унигард М» в разведении 1:100	29	28	3,4	6,4	6,8	-	Не оказывает
25	Водная вытяжка «Унигард М» в разведении 1:1000	29	29	0	6,4	7,0	-	Не оказывает

Биотестирование проводил


Подпись

Колосовская Е.В.
расшифровка подписи

Биотестирование проводил


Подпись

Ляшенко Г.Ф.
расшифровка подписи

Заключение: Водная вытяжка полимерного материала «Унигард М» и ее разбавления в 10, 100 и 1000 раз безвредны для тест-объекта *Daphnia magna* Straus, неразбавленная водная вытяжка и её разбавление в 10 и 100 раз безвредны для *Scenedesmus quadricauda*.

И.о. зав. лабораторией
экологической токсикологии



Подпись

Крылова Ю.В.
расшифровка подписи