

Лабораторная работа № 1

Определение острой токсичности сточных вод

(Продолжительность лабораторной работы – 14 часов)

Цель работы

Получение навыков кратковременного биотестирования сточных вод для определения их острой токсичности и обработки результатов при кратковременном биотестировании.

Рабочее задание

1. Ознакомиться с порядком проведения биотестирования.
2. Самостоятельно заполнить акт отбора проб сточной воды промышленного предприятия.
3. Изучить основные морфологические и функциональные особенности тест-объекта.
4. Провести кратковременное биотестирование сточных вод.
5. Обработать полученные результаты.
4. Оформить отчет по проделанной работе в соответствии с требованиями.
5. Ответить на контрольные вопросы, приведенные в конце данной работы.

Оборудование, материалы, реактивы

Для выполнения практической работы необходимы: климатостат, люминоостат (бокс для культивирования дафний) или эквивалентное приспособление, позволяющее поддерживать искусственное освещение от 500 – 1000 лк, температуру окружающего воздуха +18-22⁰С, химические стаканы для посадки тест-объектов в анализируемую и контрольную воду вместимостью 150- 200 см³ (их количество зависит от числа разбавлений), пипетки стеклянные объемом 2 см³ 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 см³, сачок из планктонного газа*, фильтровальная бумага, кристаллизаторы произвольного объема для замачивания и мытья посуды, синхронизированная культура тест-организмов *DaphniamagnaStraus* (одновневная молодь).

*Сачок для посадки дафний в сосуды для биотестирования изготавливают из планктонного газа №№ 26—35. Раму для сачка делают из стальной нержавеющей проволоки диаметром 1 мм. Диаметр сачка 2,5 — 3,0 см. К раме крепят круг из планктонного газа диаметром 3,5—4,0 см, который вырезают из полотнища с помощью нагретого скальпеля. Оплавленный край газа облегчает его крепление к раме. Крепление производят с помощью хлопчатобумажных ниток. Газ по периметру сачка распределяют равномерно, он не должен иметь складок, мешающих подсчету дафний в сачке и посадке в сосуды для биотестирования.

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

Предварительная подготовка к отбору проб и выполнению биотестирования должна обеспечить подготовку посуды, пробоотборников, мест хранения отобранных проб, а также подготовку рабочего места для обработки проб и исследования их на токсичность.

Все процедуры предварительной подготовки должны исключить попадание токсичных, органических и каких-либо других веществ в исследуемую воду.

Подготовка посуды для отбора, хранения проб и биотестирования

Обычно для отбора проб используется посуда из пластика, а при наличии в воде нефтепродуктов, моющих средств и пестицидов используются банки из темного стекла.

Посуда для биотестирования должна быть химически чистой. Она промывается смесью бихромата калия и серной кислоты (хромовой смесью). Стенки посуды осторожно смачиваются хромовой смесью, после чего на 2-3 часа посуда оставляется, затем она тщательно промывается холодной водой, нейтрализуется раствором пищевой соды, промывается водопроводной водой и ополаскивается 3-4 раза дистиллированной водой. Для мытья посуды не разрешается пользоваться синтетическими поверхностно-активными веществами и органическими растворителями. Посуду для отбора проб сушат на воздухе, а используемую для биотестирования, за исключением мерной, в сушильном шкафу при 160 °С в течение одного часа. Химически чистая посуда должна храниться в закрытом виде (в закрытых ящиках, стеллажах и т.п.).

После проведения анализов вся грязная посуда должна подвергаться стерилизации кипячением в течение одного часа.

Пробы сточной воды для биотестирования отбирают, руководствуясь инструкцией по отбору проб для анализа сточных вод НВН 33-5.3.01-85; пробы природной воды отбирают, руководствуясь «ГОСТ 17.1.5.05-85. Охрана природы. Гидросфера. Общие требования к отбору поверхностных и морских вод, льда и атмосферных осадков». Биотестирование проб проводят не позднее 6 часов после их отбора. Если указанный срок не может быть соблюден, пробы охлаждают до +4 °С. Не допускается консервирование проб с помощью химических консервантов. Перед биотестированием пробы фильтруют через фильтровальную бумагу с размером пор 3,5-10 мкм.

Для учета результатов биотестирования при установлении величин ПДС и определении степени токсичности сточной и природной воды готовят серию разбавлений.

Объем пробы воды для биотестирования без разбавления— 500 мл, с учетом разбавления— 1 л.

Подготовка культивационной воды

Культивационная вода используется для культивирования дафний, в качестве контрольной при биотестировании, для разбавления исследуемых вод.

Для подготовки культивационной воды питьевую воду отстаивают в течении 3-7 суток (до полного дехлорирования) в бутылки из бесцветного стекла в присутствии высшей водной растительности. При отсутствии питьевой воды удовлетворительного качества допускается использование поверхностной пресной или грунтовой воды, отобранной вне зоны влияния источников загрязнения и профильтрованной через фильтр с размером пор 3,5 мкм.

Культивационная вода должна удовлетворять следующим требованиям:

- отсутствие органических загрязняющих веществ, хлора, токсических веществ и антагонистических для дафний организмов (сине-зеленых водорослей, простейших, многоклеточных);
- РН – 7-8;
- жесткость общая от 60 до 200 мг/дм³ ;
- концентрация растворенного кислорода – не менее 6 мг/дм³ (если концентрация кислорода ниже указанного значения, то вода аэрируется при помощи аквариумного компрессора до начала биотестирования);
- температура 18-22 °С.

При исследовании вод с повышенным содержанием (содержание сухого остатка выше 1 г/дм³) необходимо провести предварительную постепенную адаптацию культуры тест-объектов. При использовании в силу необходимости культивационной воды, не отвечающей требованиям установленного качества, все отклонения отмечаются в протоколе измерений.

Подготовка дафний к биотестированию, процедура биотестирования

В лабораториях содержат два вида культуры дафний: маточную (массовую) и синхронизированную. Маточная культура используется как источник возобновления в период гибели синхронизированной культуры. Непосредственно для биотестирования

используется только синхронизированная культура. Синхронизированной является одновозрастная культура, полученная от одной самки путем ациклического партеногенеза в третьем поколении. Такая культура генетически однородна. Рачки, составляющие синхронизированную культуру, обладают близкими уровнями устойчивости к токсическим веществам. Для получения синхронизированной культуры отбирают одну самку средних размеров с выводковой камерой, заполненной эмбрионами, и помещают в химический стакан, заполненный культивационной водой. Появившаяся молодежь переносится в кристаллизатор (25 особей на 1 дм³ воды). Полученная следующая генерация является синхронизированной культурой и может быть использована для биотестирования в возрасте 6-24 часа. Чтобы отобрать для опытов одновозрастную культуру, дафний фильтруют с помощью набора сит. Условия содержания синхронизированной и маточной культур рассматриваются в приложении 2.

Условия биотестирования

Перед началом биотестирования в пробе воды определите концентрацию растворенного кислорода, которая должна быть не менее 6,0 мг/л. Если она ниже 6,0 мг/л, то перед биотестированием воду аэрируйте с помощью микрокомпрессора. В процессе биотестирования аэрировать воду не рекомендуется. Биотестирование проводите в климатостате, люминостате, боксе или помещении, в котором отсутствуют токсические пары или газы, при оптимальном температурном и световом режимах. Результаты биотестирования считают правильными, если гибель дафний в контроле не превышает 10 % за весь период наблюдений и концентрация растворенного в тестируемой воде кислорода в конце биотестирования составляет не менее 2 мг/л.

Процедура биотестирования

Приготовьте стаканы объемом 150-200 мл для контрольной и тестируемой воды (повторность каждого опыта трехкратная). Стаканы пронумеруйте.

Налейте в три стакана по 100 мл контрольной воды (в качестве контрольной используется культивационная вода).

Приготовьте серию разбавлений анализируемых проб. Для приготовления разбавлений исследуемых вод используйте культивационную воду. Рекомендуются для

разбавления коэффициент 0,3. В этом случае будут анализироваться 100, 30, 9, 3 и 1% концентрации. При заведомо ожидаемой высокой токсичности исследуемые воды анализируются в 10, 3, 1, 0,3 и 0,1% концентрациях. Возможен произвольный выбор разведений. Чем выше предполагаемая токсичность, тем большей должна быть кратность разбавлений исходной воды.

Налейте в приготовленные стаканы по 100 мл тестируемой воды и ее разбавлений. Повторность каждого опыта трехкратная.

Посадите по 10 дафний синхронизированной культуры в сосуды с приготовленными разбавлениями и контрольную воду. Посадку рачков начните с контрольной воды. В исследуемые растворы дафний помещайте, начиная со стаканов с большим разбавлением к меньшему разбавлению. Посадку дафний в сосуды для биотестирования проводите одним из следующих способов (возможны и другие):

1. Стеклой трубкой диаметром 0,5—0,7 см отлавливайте дафний из культуры, помещайте в сачок из планктонного газа, погрузив его в тестируемую воду, переводите в нее дафний; посадку проводите от разбавлений тестируемой воды с большей кратностью к меньшей;

2. Стеклой трубкой отлавливайте дафний и вместе с водой, попавшей в трубку, переносите в пустой сосуд для биотестирования. Затем пастеровской пипеткой удалите жидкость и осторожно, чтобы не повредить дафний, приливайте отмеренный объем тестируемой воды.

Экспонируйте дафний при оптимальных условиях в течение часа (учет выживших дафний производят через 1, 6, 24, 48, 72 и 96 ч, мы ограничили время экспозиции из-за ограничения времени лабораторного занятия). При кратковременном биотестировании дафний не кормят.

Через час после посадки проведите учет выживших дафний.

Особей считают выжившими, если они свободно передвигаются в толще воды или всплывают со дна сосуда не позднее 15 секунд после его легкого покачивания.

Если в любой учитываемый период времени в сточной воде гибнет 50 и более процентов дафний, биотестирование прекращают.

Если гибель дафний в контроле превысила 10 %, то результаты опыта не учитываются, опыт должен быть повторен.

Обработка и оценка результатов при кратковременном биотестировании

Определите процент погибших дафний в тестируемой воде по сравнению с контролем по формуле

$$A = \frac{X_k - X_m}{X_k} 100,$$

где X_k —среднее арифметическое количество дафний, выживших в контроле, X_m — среднее арифметическое количество дафний, выживших в тестируемой воде.

Процент погибших дафний A_1 , % определяется как $A_1 = 100 - A$.

Если $A_1 \leq 10$ %, тестируемая вода не оказывает острого токсического действия, если $A \geq 50$ %, тестируемая вода оказывает острое токсическое действие на дафний. При $A_1 = 50\%$, мы получаем среднюю летальную кратность разбавления ЛКР₅₀. ЛКР₅₀ — это кратность разбавления тестируемой воды, при которой гибнет 50% дафний за время эксперимента (96 часов). При $A_1 = 10\%$ мы получаем безвредную кратность разбавления (БКР₁₀). БКР₁₀ — это безвредная кратность разбавления воды, вызывающая гибель не более 10% тест-объектов за время проведения опыта (96 часов).

Если экспериментально не удалось определить точное значение ЛКР₅₀ и БКР₁₀, то определите их, пользуясь графическим способом.

Графический метод определения ЛКР₅₀ И БКР₁₀

Чтобы получить на графике линейную зависимость, используйте пробит-анализ.

Для этого результаты эксперимента по определению острой токсичности занесите в таблицу 1. Затем установите значения пробитов по таблице 2. Установив значения пробитов для экспериментально установленного процента гибели дафний и значения десятичных логарифмов для исследованных концентраций, занесите их в таблицу 3. По значениям пробитов и логарифмов чисел постройте график. На оси абсцисс (рис. 1) отложите логарифмы величин кратности разбавления тестируемой воды, а на оси ординат —пробиты от значений процента гибели дафний.

**Форма записи результатов определения
острой токсичности сточной воды**

Дата, время, место отбора пробы	Исследуемая концентрация сточной воды	Время от начала биотестиров.	Кол-во выживших дафний		Смертность дафний в опыте, в % к контролю	Оценка качества водной среды	
			В контроле	В опыте		ЛКР ₅₀₋	БКР ₁₀₋
			Среднее арифметическое по трем параллельным сериям			96	96
10 октября 2023г., после очистных сооружений ТЭЦ, в месте спуска в природный водоем	5%	Через 96 часов	30	30	0	21,38 %	5%
	10%		30	27	10		
	25%		30	12	60		
	50%		30	6	80		
	100%		30	2	93		

**Значения пробитов для экспериментально
устанавливаемой гибели дафний от 0 до 99 %**

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

Таблица 3.

**Значения десятичных логарифмов для исследованных концентраций сточных
вод и пробитное значение от экспериментально установленного процента гибели
дафний**

Концентрация сточных вод, %	Десятичный логарифм концентрации lgC	Количество погибших дафний, %	Значение пробита для % гибели
5	0,6989	0	
10	1,0000	10	3,72
25	1,3980	60	5,25
50	1,6990	80	5,84
100	2,0000	93	6,48

Экспериментально полученные значения внесите в систему координат и через точки проведите прямую. Пробитное значение 5 соответствует 50%-ной гибели дафний.



Рис. 1. Пример расчета ЛКР₅₀ и БКР₁₀ за установленный период времени

От точки на оси ординат, соответствующей 50% выживаемости, проведите линию, параллельную оси абсцисс. Из точки пересечения координаты пробитного значения 5 и проведенной прямой опустите перпендикуляр на ось абсцисс, точка пересечения с осью абсцисс является логарифмом концентрации сточной воды (в данном случае 1,33), вызвавшей гибель 50% дафний за время экспозиции.

Логарифм процентной концентрации исследуемой воды переведите в процентную концентрацию. Например, $lgC_{50} = 1,33$, что соответствует процентной концентрации 21,38%.

Аналогичным образом определите БКР₁₀.

Степень токсичности можно также установить, рассчитав ЛТ₅₀—среднее время гибели 50% дафний в тестируемой воде. Для этого строят график (на оси абсцисс откладывают время наблюдения, на оси ординат — **ВЫЖИВАЕМОСТЬ**- (в процентах к контролю)).

Чем меньше ЛТ₅₀, тем токсичнее тестируемая вода.

Требования к оформлению отчета

Отчет должен содержать:

1. Название и цель практической работы.
2. Краткое описание тест-объекта.
3. Краткое описание методики кратковременного биотестирования.
4. Результаты кратковременного биотестирования.
5. График для определения ЛКР₅₀ и БКР₁₀.
6. Анализ полученных результатов и выводы по практической работе.

Контрольные вопросы

1. Что такое биотестирование?
2. Почему необходимо проводить биотестирование сточных вод?
3. Какие организмы применяются в качестве тест-объектов?
4. Что определяют при проведении кратковременного биотестирования (острого опыта), что определяют при проведении длительного биотестирования?
5. Какие требования предъявляются к отбору и хранению проб тестируемой воды?
6. Какие требования предъявляются к содержанию дафний в лабораторных условиях?
7. Опишите процедуру кратковременного биотестирования и определения острой токсичности сточных вод.
8. Как производится обработка и оценка результатов при кратковременном биотестировании?
9. Объясните, что такое тест-параметр и критерий токсичности?

Приложение 1 (справочное)

Термин	Пояснение
Токсичность воды	Свойство воды вызывать патологические изменения или гибель организмов, обусловленное присутствием в ней токсичных веществ.
Биологическое тестирование воды (биотестирование)	Оценка качества воды по ответным реакциям водных организмов, являющихся тест-объектами.
Токсикологический контроль	Проверка методами биотестирования соответствия качества воды установленным требованиям.
Тест-реакция	Изменение какого-либо показателя тест-объекта под воздействием токсических веществ, содержащихся в воде, например, снижение выживаемости дафний.
Тест-параметр	Количественное выражение тест-реакции, например, процент погибших дафний в воде, содержащей токсические вещества, по сравнению с контролем (вода без токсических веществ).
Критерий токсичности	Значение тест-параметра или правило, на основании которого делают вывод о токсичности воды, например, гибель 50 и более процентов дафний за 96 часов в воде, содержащей токсические вещества, по сравнению с контролем; достоверное снижение выживаемости рыб в воде, содержащей токсические вещества, по сравнению с контролем.
ЛКР ₅₀₋₉₆	Летальная кратность разбавления тестируемой воды, при которой гибнет 50% дафний за 96 часов;
БКР ₅₀₋₉₆	Безвредная кратность разбавления сточной воды, при которой погибает не более 10 % дафний за

Приложение 2 (справочное)

ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕСТ-ОБЪЕКТА

Систематическое положение, местообитание.

Тип Arthropoda

Класс Crustacea

Отряд Cladocera

Семейство Daphniidae

Род Daphnia

Вид Daphnia magna Straus

В природных условиях дафнии обитают в стоячих и слабо проточных водоемах. Являются широко распространенными организмами. Переносят осолонение до 6‰.

МОРФОЛОГИЯ ТЕСТ-ОБЪЕКТА

Тело дафний овальной формы сжато с боков, заключено в хитиновый прозрачный панцирь. Край панциря со спинной стороны вытянут в длинный шип. Створки на брюшной стороне не соединены, образуют щель. Тело дафний нечетко сегментировано на головной, грудной и брюшной отделы (рис.2). Голова покрыта щитом, передний край которого клювообразно вытянут, образуя рострум. Под рострумом впереди прикреплены две передние маленькие антеннулы (3), вооруженные осязательными щетинками. Антеннулы сильнее развиты у самцов. В основании головы по бокам расположены две задние сильно развитые антенны, служащие для скачкообразного передвижения в толще воды. Ротовое отверстие у дафний расположено в передней части раковины. Затем идет кишечник, в передней части которого расположены печеночные выросты. Пищеварительный тракт заканчивается задней кишкой. В грудном отделе дафний расположено пять пар грудных ножек. Они сильно расчленены, снабжены многочисленными щетинками, которые образуют частое сито. Функции ножек связаны с процессами фильтрации воды, питания и дыхания. Частота движения ножек изменяется в пределах 150-470 ударов в минуту в зависимости от качества воды, температуры,

физиологического состояния рачков.

Задний отдел туловища – брюшной – лишен конечностей, изогнут и снабжен парой крупных придатков – каудальных когтей. Заканчивается брюшной отдел постабдоменом, имеющим у дафний magna характерную выемку, наличие которой является видовым признаком. На спинной стороне грудного отдела за кишечником находится сердце, оно сокращается до 200-290 ударов в минуту. Половая система дафний представлена парными гонадами: яичниками у самок и семенниками у самцов, которые расположены по обеим сторонам кишечника. Между спинной частью туловища и панцирем расположена выводковая камера, в которой протекает эмбриональное развитие рачков. Над грудными ножками и кишечником расположено жировое тело. При полноценном питании клетки жирового тела окрашены в желтый цвет.

РОСТ, РАЗВИТИЕ И РАЗМНОЖЕНИЕ

Рост дафний в течение всей жизни неравномерный, замедляется с возрастом и связан с периодическими линьками; первые три – ювенильные – следуют через 20, 24, 36 часов, четвертая – созревание яиц в яичнике – и пятая – откладывание яиц в выводковую камеру – следуют с интервалом 2-3 сут. Начиная с шестой, каждая линька сопровождается откладыванием яиц. Растет дафния наиболее интенсивно в первые дни после рождения. При хорошем питании размеры молодых дафний после каждой линьки удваиваются. После наступления половой зрелости рост замедляется. Выметанная молодь имеет 0,7-0,9 мм в длину, к моменту половой зрелости самки достигают 2,2-2,4 мм, самцы 2,0-2,1 мм. Максимальная длина тела самок может достигать 6,0 мм при сыром весе 7-10 мг.

В природе в летнее время, а в лаборатории при благоприятных условиях круглый год дафнии размножаются без оплодотворения – партеногенетически, причем рождаются в основном самки. При резком изменении условий существования (недостаток пищи, перенаселенность, понижение температуры и т.д.) в популяции дафний появляются самцы, и дафнии переходят к половому размножению, откладывая после оплодотворения “зимние яйца” (1-2 шт.), которые размещаются в специальном седлышке – эфиппиуме, образованном из части створок панциря самки. Это седлышко при очередной линьке отделяется вместе с яйцами и падает на дно водоема, где проходит стадию покоя. Весной из яиц появляются самки, которые в дальнейшем дают партеногенетические поколения

дафний. Период созревания рачков при оптимальной температуре (20-22⁰С) и хорошем питании 5-8 суток. Наступление половозрелости отмечают по моменту выхода яйцеклеток в выводковую камеру. Длительность эмбрионального развития обычно 3-4 сут., а при повышении температуры до 25 ⁰С - 46 ч. По истечении этого времени происходит вымет молоди. Партегенетические поколения следуют одно за другим каждые 3-4 сут. Вначале число яиц в кладке дафний 10-15, затем возрастает до 30-40 и более, потом снижается до 3-8; кладка яиц прекращается за 2-3 сут. до смерти. В природе дафнии живут в среднем 20-25 сут., а в лаборатории при оптимальном режиме 3-4 месяца и более. При высоких температурах (свыше 25 ⁰С) продолжительность жизни дафний может сокращаться до 25 суток.

ПИТАНИЕ

Источником питания дафний в природных водоемах являются бактерии, одноклеточные водоросли, детрит, растворенные органические вещества. Интенсивность потребления корма зависит от его характера, концентрации в среде, температуры, возраста рачков и т.д. Процесс питания дафний непосредственно связан с движением грудных ножек, направляющих ток воды внутрь панциря. Пищевые частицы, отфильтрованные на “сите”, поступают в продольный желоб (между основаниями ног) и передаются ко рту рачка. Скопление пищи в желобе свидетельствует о неблагополучии в питании дафний, как и в случае, когда “сито” забито взвесью. Чрезмерно высокое содержание кормовых частиц снижает активность питания дафний, и они могут погибнуть вследствие засорения пищевого аппарата.

Интенсивный водно-солевой обмен (более 80% воды рачок заменяет менее чем за 2 мин) способствует поддержанию постоянного осмотического давления внутри панциря и сохранению формы тела. Поэтому при ухудшении состоянии дафний тело часто деформируется, что можно считать признаком нарушения водно-солевого обмена.

ОТНОШЕНИЕ К СОДЕРЖАНИЮ КИСЛОРОДА

Оптимальное содержание растворенного кислорода для роста и размножения дафний 6-7 мг/л. Они устойчивы к ухудшению кислородного режима – выживают при

уменьшении концентрации растворенного в воде кислорода до 2 мг/л, что связано с их способностью синтезировать гемоглобин. Повышение содержания гемоглобина в крови дафний отмечено при понижении концентрации растворенного кислорода. В этом случае рачки приобретают красноватый цвет вместо розовато-желтого при благоприятных условиях.

СОДЕРЖАНИЕ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

Культуру дафний выращивают в климатостате, люминостате, боксе или помещении, не содержащем токсических паров или газов. Оптимальная температура для культивирования дафний и биотестирования составляет 20 ± 2 °С, освещенность 400-600 лк при продолжительности светового дня 12-14 часов. Не допускают освещения дафний прямыми солнечными лучами. Стеклянную посуду для содержания дафний моют питьевой водой, хромовой смесью или соляной кислотой. Для культивирования дафний используют водопроводную воду, которую отстаивают и насыщают кислородом с помощью микрокомпрессоров не менее 7 суток. Используют также природную воду из незагрязненных водоемов. Вода для культивирования должна удовлетворять следующим требованиям: рН 7,0-8,2; жесткость общая 3-4 мг экв/л; концентрация растворенного кислорода не менее 6,0 мг/л.

Оптимальная плотность культуры – 25 половозрелых самок в 1 л воды. Раз в 7-10 суток половину объема воды в сосуде с культурой дафний заменяют на свежую, удаляют сифоном скопившийся на дне осадок и при большей плотности культуры ее прореживают. Кормом для дафний служат зеленые водоросли (хлорелла или сценедесмус) и хлебопекарные дрожжи. Культуру зеленых водорослей выращивают на питательных средах в лабораторных условиях. Водоросли вносят в культуру дафний из расчета 1 мл суспензии (600-1000 млн. кл/мл) на 1 л воды.

1-2 раза в неделю дафний кормят хлебопекарными дрожжами. Для приготовления дрожжевого корма 1 г свежих или 0,3 г сухих дрожжей заливают 100 мл дистиллированной воды. После набухания дрожжи тщательно перемешивают. Образовавшуюся суспензию отстаивают в течение 30 мин. Надосадочную жидкость добавляют в сосуды с дафниями в количестве 3 мл на 1 л воды.

АДАПТАЦИЯ ДАФНИЙ К СРЕДЕ С ПОВЫШЕННОЙ МИНЕРАЛИЗАЦИЕЙ

При необходимости биотестирования воды с общим содержанием солей свыше 3 г/л выращивают культуру, адаптированную к повышенной минерализации среды. Для этого в воду, в которой культивируют дафний, постепенно вносят хлористый натрий до необходимой концентрации. Адаптированных к повышенному содержанию солей дафний нельзя использовать для тестирования вод с более низким содержанием солей.

ТРАНСПОРТРОВКА ДАФНИЙ

Дафний транспортируют в стеклянной емкости с крышкой (в термосе, если температуры окружающей среды выходит за пределы 18-22 °С. Емкость заполняется местной культивационной водой на 2/3 объема и в нее сачком переносятся дафнии. Плотность посадки приблизительно 25 особей на 1 дм³ воды; для кормления добавляется 3 см³ водорослевой суспензии. В лаборатории воду с дафниями по стенке переливают в емкость для культивирования, объем которой должен в 2-3 раза превышать количество воды с рачками. Культиватор с дафниями помещают в люминостат (климатостат, бокс) и в течение 1-2 дней небольшими порциями приливают приготовленную культивационную воду для адаптации дафний к новой воде.