

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КРЕМЕНЧУЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ МИХАЙЛА ОСТРОГРАДСЬКОГО



МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
ЩОДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ
З НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ
«ОСНОВИ БІОІНДИКАЦІЇ ТА БІОТЕСТУВАННЯ»
ДЛЯ СТУДЕНТІВ ДЕННОЇ ФОРМИ НАВЧАННЯ
ЗА НАПРЯМОМ 6.051401– «БІОТЕХНОЛОГІЯ»

КРЕМЕНЧУК 2017

Методичні вказівки щодо виконання лабораторних робіт з навчальної дисципліни «Основи біоіндикації та біотестування» для студентів денної форми навчання за напрямом 6.051401 – «Біотехнологія»

Укладачі: старш. викл. С. В. Дігтяр

Рецензент д.б.н., проф. В. В. Никифоров

Кафедра біотехнологій та біоінженерії

Затверджено методичною радою Кременчуцького національного університету імені Михайла Остроградського

Протокол №__ від_____2017 р.

Голова методичної ради

проф. В. В. Костін

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
1 Перелік лабораторних робіт.....	6
Лабораторна робота № 1 Біондикація забруднень атмосферного повітря за допомогою лишайників.....	6
Лабораторна робота № 2 Флуктуюча асиметрія деревних і трав'янистих форм рослин як система оцінки якості середовища.....	10
Лабораторна робота № 3 Біологічний контроль водойми методом сапробності.....	15
Лабораторна робота № 4 Біологічний аналіз активного мулу.....	22
Лабораторна робота № 5 Оцінка трофічних властивостей водойми з використанням вищих рослин.....	27
Лабораторна робота № 6 Визначення якості води у прісній водоймі за видовою різноманітністю макрофітів	31
Лабораторна робота № 7 Метод привитої сополімеризації з використанням в якості тест-об'єкта <i>Daphnia magna</i>	35
Лабораторна робота № 8 Біотестування з використанням зелених мікроводоростей.....	39
Лабораторна робота № 9 Визначення забруднення середовища важкими металами за ростовими властивостями відрізків колеоптилей.....	43
Лабораторна робота № 10 Біотестування з використанням риб.....	45
2 Критерії оцінювання знань студентів.....	49
Список літератури.....	50

ВСТУП

Метою викладання навчальної дисципліни «Основи біоіндикації та біотестування» є розкриття взаємозв'язків між біологічними об'єктами та системами і факторами навколишнього середовища на основі сучасних досягнень сучасної фізіології, токсикології та екології, формування поняття про взаємозалежність і єдність екосистеми та її компонентів; вироблення у студентів розуміння механізму функціонування екосистем різного рівня як єдиного цілого, а також механізму взаємодії організму із зовнішнім середовищем, розвинути вміння використовувати знання під час системних моніторингових досліджень, застосуванні методів біотестування та біоіндикації, інтерпретації результатів досліджень тощо.

Основними **завданнями** вивчення навчальної дисципліни «Основи біоіндикації та біотестування» є:

- ознайомлення з методами біоіндикації та біотестування природного середовища;
- установлення взаємозв'язку між будовою і функціями тест-об'єктів та впливом на них зовнішніх факторів;
- дослідження біологічних маркерів, що можуть бути використані з метою спостереження за змінами довкілля.

Згідно з вимогами освітньо-професійної програми студенти повинні **знати:**

- загальні принципи, на яких базуються методи біоіндикації та біотестування;
- механізм процедури біотестування;
- взаємозв'язок між різними компонентами екосистем;
- чинники, що впливають на біоіндикатори та тест-об'єкти;
- процес саморегуляції функцій організму залежно від умов, в яких він знаходиться;

- предмет, мету біоіндикації та біотестування, завдання та значення для майбутньої практичної діяльності;
- загальні питання біомоніторингу;
- механізм функціонування різних органів і систем біоіндикаторів та тест-об'єктів;
- вікові особливості функцій організму, їх регуляцію;
- зміни діяльності органів і систем за умов впливу різних чинників довкілля;
- механізм інтегративної діяльності біосистем;

уміти:

- пояснювати зв'язок між параметрами навколишнього середовища і функціональним станом біоіндикатора чи тест-об'єкту;
- досліджувати стан екосистем за допомогою біоіндикаційних методів чи біотестування;
- обґрунтовувати вплив на піддослідні організми зовнішніх та внутрішніх факторів;
- застосовувати знання для проведення польових та лабораторних досліджень;
- робити висновок про стан і регуляцію біосистем;
- аналізувати стан біоіндикаторів та тестових організмів за різних умов на підставі фізіологічних критеріїв;
- пояснювати фізіологічні основи методів дослідження функцій організму;
- пояснювати механізм інтегративної діяльності екосистем;
- інтерпретувати анатомо-фізіологічні зміни у піддослідних об'єктів з огляду на умови їх існування;
- аналізувати стан фізіологічних процесів у піддослідних об'єктів.

ПЕРЕЛІК ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

Лабораторна робота № 1

Тема. Біондикація забруднень атмосферного повітря за допомогою лишайників

Мета: ознайомитися з основними представниками лишайників, розглянути особливості їх будови, розмноження і розповсюдження. Зібрати необхідний матеріал з даного питання і з'ясувати забрудненість атмосфери по кількості лишайників, оцінити чистоту повітря в конкретному місці.

Матеріали та обладнання: мікроскоп, ножиці, спиця, формалін, етанол, дистиллят, біхромат калію, оцтова кислота, сульфат натрію;

Навчальні елементи: гістологічний препарат, фіксатори.

Короткі теоретичні відомості

Лишайники – своєрідні симбіотичні організми, шари якого утворені грибом (мікробіонтом) і водоростями (фітобіонтом) з перевагою в більшості випадків першого. Гриби відносяться до класу *Ascomyces* – сумчасті гриби, водорості відносяться до зелених (*Chlorophyta*) або синьозелених (*Cyanophyta*) водоростей.

Слань лишайника складається з переплетених ниток грибниці – гіф і розташованих між ними клітин або ниток водоростей. Розрізняють два основних типи мікроскопічної структури слані: гомеомерний і гетеромерний. Гомеомерні лишайники – клітини водорості рівномірно розподілені по всьому талому (слані), між гіфами гриба. Гетеромерні лишайники – виділяється окремий шар утворений клітинами водорості, цей шар називається гонідіальним шаром. Під ним знаходиться серцевина, яка складається із пухко розташованих ниток гриба. Зовнішніми шарами лишайника є щільно зімкнуті грибні гіфи, які називаються корковими шарами. За допомогою грибних ниток, що відходять від нижньої кори, лишайник прикріплюється до субстрату, на якому росте. У деяких лишайників нижня кора відсутня і він зростається з субстратом гіфами серцевини.

За морфологічними ознаками розрізняють:

– Кіркові або накипні – у вигляді тонкої забарвленої кірочки, дуже щільно зрослої із субстратом. Складають до 80 % всіх видів лишайників.

– Листуваті – вигляд листоподібної пластинки, нещільно прикріпленої до субстрату. Краї слані піднесені. Верхня частина сірувата. Нижня – білувата

– Кущисті – слань має вигляд прямостоячого кущика.

Слань різноманітна за формою, розмірами, будовою, забарвленням. Колір слані зумовлений наявністю пігментів у оболонках гіф і плодових тілах лишайників. Розрізняють 5 груп пігментів: зелені, сині, фіолетові. Червоні і коричневі.

Розмножуються лишайники в основному вегетативно – частинами слані, які не є спеціалізованими «органами» вегетативного розмноження. Крім того, розмноження проходить ізидіями (виростами слані), а також соредіями (невеличкими утворами, які складаються з клітин водоростей, обплетених гіфами грибів).

Соредії утворюються всередині слані в гонідіальному шарі листуватих та кущистих лишайників. Сформовані соредії виштовхуються із слані назовні, підхоплюються і розносяться вітром.

Ізидії мають вигляд зернин, на відміну від соредій ізидії не висипаються на поверхню слані, а разом з його шматочками відламуються тваринами і людиною.

Статеве розмноження – утворюються статеві спороношення у вигляді плодових тіл. Розвиток і дозрівання їх триває 4–10 років. В плодовому тілі розвивається жіночий статевий орган – архікарп.

Живлення лишайників здійснюється за рахунок фотосинтезу, у клітинах водоростей. Синтезовані при цьому органічні речовини використовуються грибом. Дихання, поглинання води і мінеральних солей забезпечує грибний компонент (мікобіонт) слані лишайника. Активність цих процесів залежить від освітленості, температури, вологості.

Ростуть лишайники на найрізноманітніших субстратах: кам'янистих породах, ґрунті, корі дерев, хвої, листках вічнозелених рослин, мохах, гниючій деревині та інших рослинних рештках. Вони можуть поселятися на склі, шкірі, залізі, ганчірках та інших предметах, при цьому головна умова для їх поселення – тривалість перебування предмета в нерухомому стані.

Характерна біологічна особливість лишайників – утворення так званих лишайникових кислот, які відкладаються на поверхні гіф у вигляді кристалів, паличок і зерняток.

Лишайники – рослини-піонери. Руйнують виділеннями субстрат, підготовляючи умови для зростання інших рослин. Лишайники служать укриттям і їжею для багатьох безхребетних рослин. Ними живляться і деякі крупні хребетні.

Лишайники – індикатори стану навколишнього середовища. Вони дуже чутливі до забруднення повітря. Найбільш стійкі – накипні, а куцисті та листуваті не витримують найменшого забруднення, тому вони не ростуть біля доріг. Особливо шкідливі для лишайників SO_2 , CO , NO , сполуки фтору. Лишайники нагромаджують радіоактивні елементи – уран, радій, торій. Процедура визначення якості повітря за допомогою лишайників має назву лишеноіндикація.

Лишайники широко використовує людина в своїй господарській діяльності. Перш за все це цінний корм для північних оленів. Частково їх вживає в їжу і людина. Із лишайників дістають спирт, лакмус, фарби, та використовують як сировину для парфумерної промисловості, в медицині для виготовлення ліків.

Хід роботи

1. Вибрати місце дослідження (парк, освітлена ділянка ліса, подвір'я в місті). Помітити цю область на карті.

2. Вибрати площу для дослідження, яка включає 10 дерев одного виду на відстані 5 – 10 метрів один від одного. Дерев повинні бути приблизно одного віку і розміру і не мати пошкоджень.

3. Прикласти прозору сітку щільно до стебла дерева на висоті 0,3 – 1,3 м.

Підрахувати кількість квадратів з лишайниками.

4. Підрахувати кількість усіх видів лишайників під прозорою сіткою.

5. Підрахувати кількість лишайників домінуючого виду.

6. Отримані результати занести до табл. 1.1 (використовуючи табл. 1.2)

Таблиця 1.1 – Журнал оцінки якості повітря по проектованому покриттю стовбурів дерев

Порядковий номер дерева на схемі	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ступінь покриття лишайниками										
Кількість видів лишайників										
Кількість лишайників домінуючого виду										

Таблиця 1.2 – Шкала якості повітря на проектованому покритті лишайниками стовбурів дерев.

Якісний рівень забруднення повітря	Проективне покриття	Частота трапляння
Дуже високий «Лишайникова пустеля»	До 10 – 15 %	Рідко, поодинокі таломи
Високий «Зона пригнічення»	До 20 – 25 %	Часто, місцями дуже часто
Середній	До 50 %	Дуже часто, домінант
Низький «Зона нормальної життєдіяльності»	До 80 %	Дуже часто, домінант

7. Зробити висновки, вказавши родову назву кожного лишайника та дати характеристику якості атмосферного повітря дослідженого місця.

Контрольні питання

1 Дайте визначення лишайника.

2 Яке будова лишайникової слані? Назвіть основні теорії, що пояснюють взаємини фітобіонта і мікобіонта в організмі лишайника.

3 Назвіть відомі Вам способи розмноження лишайників. Дайте характеристику вегетативного розмноження.

4 Охарактеризуйте безстатеве і статеве розмноження лишайників.

Література: [3; 4; 26; 34].

Лабораторна робота № 2

Тема. Флуктуюча асиметрія деревних і трав'янистих форм рослин як система оцінки якості середовища.

Мета: провести інтегральну експрес-оцінку якості середовища проживання живих організмів за структурою флуктуючої асиметрії листяної пластини берези повислої.

Матеріали та обладнання: курвіметр (лінійка); гербарій листя берези повислої, індивідуальне завдання на картці.

Навчальні елементи: життєві форми рослин, симетрія та асиметрія.

Короткі теоретичні відомості

Оцінка повітряного середовища, або інтегральна оцінка якості середовища проживання живих організмів, проводиться за станом вищих деревних і трав'янистих рослин.

Найбільш зручним для цілей біоіндикації є наступні види рослин: трав'янисті – яглиця звичайна (*Aegopodium podagraria*); мати-й-мачуха звичайна (*Tussilago farfara*); деревні: тополя бальзамічний (*Populus balsamifera*); клен гостролистий (*Acer platanoides*) та ясенелистий (*A. negundo*); береза бородавчаста (*Betula pendula*); водна – рдесник (*Potamogeton perfoliatus*, *P. lusens*, *P. natans*).

Всі перераховані рослини мають чітко виражену двосторонню симетрію, що є головною вимогою методу.

Принцип методу заснований на виявленні порушень симетрії розвитку листової пластини деревних і трав'янистих форм рослин під дією антропогенних факторів.

Збір матеріалу. Для збору матеріалу в польових умовах необхідних олівець, блокнот, компас, курвіметр або лінійка, атласи-визначники вищих рослин, пакети для збору листя.

Вибірка листя приземкуватих рослин робиться в кількох примірниках на площі 1м³. Разом треба зібрати на дослідження 25 листків середнього розміру з одного виду рослин. Листя збирають в нижній частині, на рівні піднятої руки, з

максимальної кількості доступних гілок, спрямованих умовно на північ, захід, схід і південь.

Обробка матеріалу. Обробку матеріалу зручно проводити в лабораторії. Зібраний матеріал повинен бути забезпечений точною інформацією про місце збору, наявність поблизу можливого забруднення, інтенсивності рух транспорту, часу збирання і виконавця. Зберігати зібраний матеріал можна не більше тижня на нижній полиці холодильника.



Рисунок 1 – Вимірювання довжин жилок на листках трав'янистих і деревних порід

Обробка полягає у зміні довжин жилок на аркуші праворуч і ліворуч. На малюнку цифрами позначені листя наступний дерев: 1 – берези, змінюється перша жилка від основи листка; 2 – тополі, перша жилка від основи листка; 3 – клена гостролистого, середня жилка бічних пластин праворуч і ліворуч, 4 – мати-й-мачухи, друга жилка від основи черешка, 5 – клена американського, перша жилка від основи черешка; 6 – яглиці, перша жилка від основи черешка. Жилки вимірюються курвіметром або лінійкою з точністю до одного міліметра.

Існує більш детальні розрахунки з флуктуючої асиметрії. З одного аркуша знімають показники 5 параметрів (рис. 2). Окремо фіксують «загнутість» верхівки листка (рис. 3). Дані вимірювань заносять у таблицю 1.

Величину флуктуючої асиметрії оцінюють за допомогою інтегрального показника – величини середньої відносної відмінності за ознаками (середнє арифметичне співвідношення різниці і суми промірів листа праворуч і ліворуч, віднесене до числа ознак).

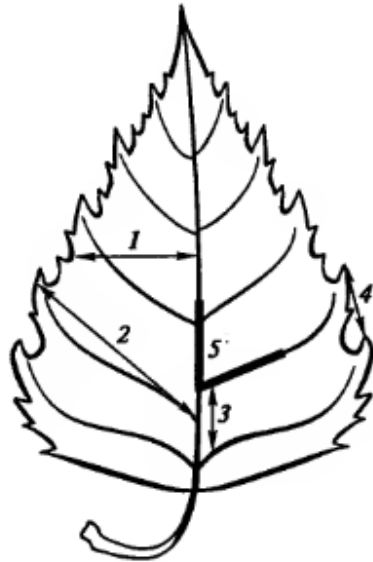


Рисунок 2 – Параметри промірів листа для детального розрахунку:

1 – ширина половинки листа (лист складають навпіл, потім розділяють і вимірюється складка, що утворилася); 2 – довжина другої жилки від основи листа; 3 – відстань між основою листа і другою жилкою; 4 – відстань між кінцями цих жилок; 5 – кут між головною та другою від основи жилками.

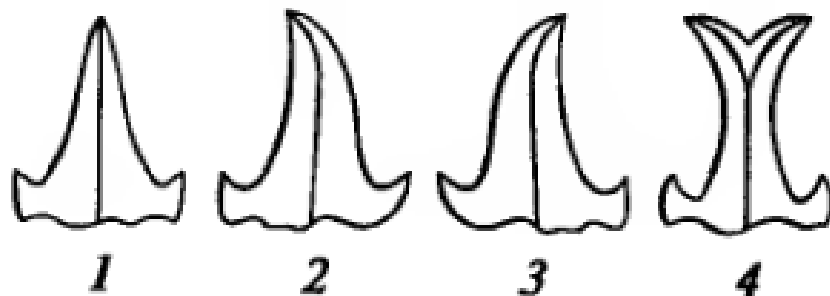


Рисунок 3 – Приклад «загнутості» верхівки лист:

1 – не загнута; 2 – загнута вліво; 3 – загнута вправо; 4 – «ластівчин хвіст».

Коефіцієнт флуктуючої асиметрії визначають за формулою, запропонованою В. М. Захаровим:

$$\delta_d^2 \frac{\sum (d_{1-r} - M_d)^2}{n-1}$$

де $M_d = \frac{\sum d_{1-r}}{n}$ – середня різниця між сторонами;

$d_{1-r} \frac{2(d_1 - d_r)}{d_1 + d_r}$ – різниця значень ознак між лівою (1) і правою (r) сторонами; n – число вибірок.

Кількісні ознаки рахують за відсотками з суми асиметричного листа:

$$M_A = \frac{n_a}{n_a + n_c}$$

де n_a – число асиметричних особин; n_c – кількість симетричних листків.

Показник асиметрії вказує на наявність у середовищі існування живих організмів негативного чинника. Це може бути хімічне забруднення, зміна температури, перебування біологічного об'єкта на краю ареалу та інше. Показник реагує підвищенням на зміни факторів і стабільний при адаптації до наявних умов. Таким чином, на підставі періодичного обчислення показників можна простежити зміни умов існування об'єкта.

При бальній оцінці використовують таблицю відповідності балів якості середовища і значенням коефіцієнта асиметрії (табл. 2.2).

Хід роботи

1. Отримати у викладача завдання на картці.
2. У відповідності до рисунку 1 виміряти жилки листової пластини берези. Занести дані до таблиці 1. Провести статистичну обробку даних.

Таблиця 2.1 – Результати вимірів листа деревних і трав'янистих рослин.

Дата		Виконавець									
Місце збору											
№	Ширина половинок		Довжина 2-ї жилки		Відстав між основами 1 та 2 жилок		Відстав між кінцями 1 та 2 жилок		Кут між центральною та 2ю жилкою		Форма верхівки
	л	пр	л	пр	л	пр	л	пр	л	пр	
1											
2											

Примітки: л – лівий бік, пр – правий бік.

Таблиця 2.2 – Система якості середовища мешкання живих організмів
за показником флюктууючої асиметрії вищих рослин
(за А. Б. Стрельцовим, 2003)

Види	Бали				
	1	2	3	4	5
№					
Береза бородавчата	< 0,055	0,056–0,060	0,061–0,065	0,065–0,070	> 0,070
Всі види рослин	< 0,0018	0,0019–0,0089	0,0090–0,022	0,022–0,04	> 0,04

3. У відповідності з рисунком 2 виміряти жилки листової пластини берези за 5 параметрами. Занести дані в таблицю 1. Провести статистичну обробку даних.

4. Провести експрес-оцінку забруднення навколишнього середовища за результатами всіх видів. Зробити висновки про якість середовища, в якому перебувають живі організми, відповідно до таблиці 2.

Відповідають наступним характеристикам середовища мешкання живих організмів: 1 – чисто; 2 – відносно чисто («норма»); 3 – забруднено («тривога»); 4 – брудно («небезпечно»); 5 – дуже брудно («шкідливо»).

Контрольні питання

1. Розповісти про пристосування рослин до умов середовища їх існування.
2. Назвати основні життєві форми рослинних організмів.
3. Назвати вегетативні органи рослин.
4. Які органи рослин відносяться до генеративних?
5. Охарактеризуйте листову пластинку за її формою.

Література: [11; 20; 25]

Лабораторна робота № 3

Тема. Біологічний контроль водойми методом сапробності

Мета: опрацювати методику визначення сапробності водойми на конкретному прикладі.

Матеріали та обладнання: мікроскоп, акваріуми, предметні і покривні скла, пінцет.

Навчальні елементи: сапробність, сапробіонти.

Короткі теоретичні відомості

Під сапробністю прийнято розуміти ступінь розпаду органічних речовин в забруднених водоймах. Сапробіонти або сапробні організми можуть слугувати індикаторами забруднення або різного ступеню розкладу органічних речовин у водоймі. Розпад органіки у водоймі призводить до дефіциту кисню і накопичення ядовитих продуктів. Здатність організмів існувати в умовах різного ступеню сапробності пояснюється необхідністю в органічному харчуванні, стійкістю до нестачі кисню і стійкістю до шкідливих речовин, що утворюються в результаті розкладу органічних речовин.

Принцип методу сапробних організмів заснований на взаємозв'язку організмів із середовищем існування. Значення сапробності з однієї сторони наближається до значення евтрофікації так як включає трофічну характеристику, а з іншої сторони сапробність близька до токсичності або забруднення, тому що характеризує дію в середовищі несприятливих факторів (дефіцит або відсутність кисню, продукти розкладу органіки тощо). Таким чином сапробність набуває поняття характеристики якості води.

Організми водойми відносяться до бентосу і планктону ряд з них складає перифітон. В планктон включають ті форми організмів тварин і рослин, які проводять все своє життя в звішеному стані в товщі водойми. До фітопланктону належать мікрowodорості, до зоопланктону – найпростіші організми.

Найбільш показові для оцінки забруднення водойми бентос і перифітон. До складу біоценозів бентоса входять всі форми рослин і тварин, які своїм

життям тісно пов'язані з дном водойми. Організми обростання прикріплюються до каменів, днищ судів, залізним і бетонним арматури мостів.

Таблиця 3.1 – Основні характеристики зон сапробності

Показник	Полісапробні	Альфа-мезосапробні
Кисневі умови	Анаеробні	Напіванаеробні
Азотисті сполуки	Білкові речовини	Аміак, амінокислоти
Сірководень	Багато	Достатньо багато
Загноєння	Загниває	Загниває
Бактерій в 1 мл води	109	106
Переважає окремих видів	Дуже сильне	Невелике
Різноманітність видів	Дуже мала	Невелике
Зміна співтовариств	Катастрофічна	Часто катастрофічна
Потреба організмів в кисні	Мінімальна	Слабка
Показник	Бета-мезосапробні	Олігосапробні
Кисневі умови	Аеробні	Аеробні
Азотисті сполуки	Амонійні солі, нітрати	Нітрати
Сірководень	Мало	Нема
Загноєння	Не загниває	Не загниває
Бактерій в 1 мл води	100000	10–100
Переважає окремих видів	Значне	Дуже велике
Різноманітність видів	Значна	Дуже велике
Зміна співтовариств	Досить повільна	Повільна
Потреба організмів в кисні	Велика	Дуже велика

У польових умовах для оцінки сапробності проводять попереднє обстеження водойми. Слід зазначити, що водойма реагує на забруднення цілим комплексом взаємозв'язків біотичної і абіотичного середовища. Тому при біологічному дослідженні вивчають водойму в цілому – воду, дно, береги, а не тільки організми, які населяють водойми.

Перш ніж приступити до обстеження, необхідно мати відомості про гідрологічний режим водойми: витрати води, характер водозбірної площі, розташуванні, кількості і якості випусків стічних вод, наявності забруднених територій вздовж берега водойми. У момент огляду водойми в польовому журналі зазначають температуру води, її прозорість (по білому диску Секке), наявність або відсутність плівок на поверхні, запах і особливості кольору води, наявність водної рослинності, забруднення берегів, замулюваність дна і характер мулу, плівки нафтопродуктів на дні і поверхні водойми.

При остаточному обстеженні водойми проводять відбір і обробку проб. Проби відбирають нижче джерела забруднення, по можливості, на всьому протязі забрудненості водойми, а також для порівняння – в чистому пункті вище скидання. Для повної біологічної діагностики водойми повинні бути враховані всі спільноти: перифітон, бентос, планктон, плейстон, нектон, макрофіти. Але практично при одиничному обстеженні можна обмежитися розглядом найбільш типових спільнот: наприклад, в малих водостоках досліджують перифітон, в річках – планктон, бентос і перифітон, в ставках – зарості макрофітів і т.д.

Перифітон збирають скребком, переносять в лабораторію в термосі, щоб зберегти пробу для мікроскопування в живому вигляді. Згодом фіксують формальдегідом, довівши його концентрацію в пробі до 2–4%, і потім остаточного визначають види. Враховують сапробність і частоту зустрічальності організмів.

Зони сапробності виділяють по різного ступеня розкладання органічної речовини. Від щирого водойми до забрудненого збільшується індекс сапробності водойми: ксеносапробной – 0–0,05 → олігосапробной – 0,51–1,50 → бета-мезосапробні – 1,51–2,50 → альфа-мезосапробні – 2,51–3,50 → полісапробні – 3,51–4,0. Індокси позначаються грецькими буквами $\kappa \rightarrow o \rightarrow \beta \rightarrow \alpha \rightarrow \rho$.

Таблиця 3.2 – Організми-індикатори сапробності

Організми	Зона сапробності (S)	Організми	Зона сапробності (S)
Нитчасті бактерії		Інфузорії	
<i>Beggiatoa sp.</i>	ρ	<i>Colpidium campylum</i>	ρ
<i>Thoithrix sp.</i>	ρ	<i>Colpidium colpoda</i>	ρ
Гриби		<i>Euplotes charon</i>	β
		<i>Opercularia coaretata</i>	α
<i>Leptomitus lacteus</i>	α	<i>Paramecium caudatum</i>	α
<i>Mucor racemosus</i>	α	<i>Spirostomus ambiguus</i>	α
<i>Fusarium aquaeductum</i>	ρ	<i>Stentor coeruleus</i>	α
Водорості: синьозелені		<i>Vorticella convallaria</i>	α
		<i>Vorticella microstoma</i>	ρ
<i>Anabaena flos aquae</i>	β	<i>Podophrya fixa</i>	α
<i>Aphanizomenon flos aquae</i>	β	Коловертки	
<i>Oscillatoria tenuis</i>	α	<i>Keratella cochlearis</i>	β
Діатомові		<i>Keratella quadrata</i>	β
<i>Cymbella cesati</i>	o	<i>Rotaria rotatoria (syn. Rotifer vulgaris)</i>	α
<i>Melosira granulata</i>	β	Олігохети	
<i>Navicula apiculata</i>	α	<i>Tubifex tubifex</i>	ρ
Євгленові		<i>Stylaria lacustris</i>	β
<i>Euglena viridis</i>	ρ	Ракоподібні	
<i>Euglena deses</i>	α	<i>Daphnia magna</i>	α
Зелені і протококові		<i>Leptodora Kindtii</i>	o
<i>Vohox globator</i>	$o-\beta$	<i>Astacus fluviatilis</i>	o
<i>Ulothrix zonata</i>	o	Комахи	
Тварини: амеби		<i>Caenis macrura</i>	o
<i>Pelomyxa palustris</i>	ρ	<i>Heptagenia coeruleana</i>	β
		<i>Chironomus Plumosus</i>	ρ

Перелік видів-індикаторів із зазначенням приналежності їх до зон сапробності мається на методичному посібнику «Уніфіковані методи дослідження якості води». Деякі з них наводяться в таблиці 3.2.

Для кількісного обліку переглядають 50 полів зору не менше ніж на трьох препаратах – стеклах обростання. Число організмів оцінюють за шкалою частот після перерахунку на 100 полів зору відповідно категорії крупності (таблиця 3.3):

1-а категорія – організми розміром до 50 мкм;

2-а категорія – 50– 200 мкм;

3-а категорія – 200 тисяч мкм.

Частоту народження враховують за загальноприйнятою в біоіндикаційних дослідженнях дев'ятибальною шестиступінчастою шкалою з такими позначеннями: 1 – дуже рідко; 2 – рідко; 3 – нерідко; 5 – часто; 7 – дуже часто; 9 – маса.

Таблиця 3.3 – Шкала для перерахунку організмів-сапробіонтов в 100 полях зору мікроскопа на частоту потрапляння

Частота зустрічання в балах	Сапробіонти
1-а категорія крупності	
1	Не більше 1 в кожному 2-у полі зору
2	Не більше 2 в полі зору
3	Не більше 10 в полі зору
5	Не більше 30 в полі зору
7	Не більше 60 в полі зору
9	Більше 60 в полі зору
2-а категорія крупності	
1	Не більше 1 в кожному 20-у полі зору
2	Не більше 1 в кожному 5-у полі зору
3	Не більше 1 в полі зору
5	Не більше 3 в полі зору
7	Не більше 6 в полі зору
9	Більше 6 в полі зору
3-а категорія крупності	
1	1 в 100 полях зору
2	1 в 50-х полях зору
3	Не більше 1 в 10-х полях зору
5	Не більше 1 в 4-х в полях зору
7	Не більше 1 в 2-х в полях зору
9	Приблизно 1 в полі зору

Для однаковості кількісного обліку і вираження даних в шкалі сапробності можна результати щодо прорахунку планктону і мікробентосу висловити в значеннях частоти народження (таблиця 3.4).

Таблиця 3.4 – Шкала оцінки якості води по системі сапробності

Клас якості водойми	Характеристика води	Індекс сапробності за Пантле і Буком
1	Дуже чиста	<1,00
2	Чиста	1,00–1,50
3	Помірно (слабо) забруднена	1,51–2,50
4	Забруднена	2,51–3,50
5	Брудна	3,51–4,00
6	Дуже брудна	>4,00

Найбільш поширений спосіб визначення сапробності водойми за методом Пантле і Бука. Даний метод дозволяє порівняти стан водойми в різних пунктах, наприклад по повздовжньому профілю річки, і представити результати в цифровому і графічному вигляді.

Зонам сапробності надається цифрове значення від 0 до 4 в порядку зростання забруднення. Визначається частота народження A організмів в співтоваристві. Обидві величини входять в формулу для визначення індексу сапробності:

$$Ind S = \sum (Sh) / \sum h.$$

ПРИКЛАД ОБЧИСЛЕННЯ САПРОБНОСТІ

Проба: річка, забір води нижче міста. Дата _____ Спільнота: перифітон

Організми	S	h	Sh
<i>Euglena viridis</i>	4	3	12
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	2	1	2
<i>Spirogyra sygmoidae</i>	2	3	6
<i>Closterium acerosum</i>	3	2	6
<i>Closterium moniliferum</i>	2	1	2
<i>Cyclotella menengiana</i>	3	3	9
<i>Cymbella vesiculosa</i>	2	2	4
<i>Diatoma vulgare</i>	2	3	6
<i>Melosira varians</i>	2	5	10
<i>Navicula viridua</i>	3	2	6
<i>Navicula cryptocephala</i>	3	2	6
<i>Nitzschia acicularis</i>	2	3	6
<i>Nitzschia palea</i>	2	2	6
<i>Surirella ovata</i>	2	2	4
<i>Chilidonella cuculata</i>	3	2	6
<i>Colpoda cuculus</i>	3	2	6

$$\sum h = 41; \quad \sum (Sh) = 103;$$

$$\sum h_{\rho} = 3; \quad \sum h_{\alpha} = 15; \quad \sum h_{\beta} = 23.$$

$$Ind S = \sum (Sh) / \sum h = 103 / 41 = 2,51.$$

Хід роботи

1. Отримати у викладача «скла обростання» з різним часом експозиції в акваріумі (від тижня до півтора-двох місяців).
2. Розглянути під мікроскопом препарати з об'єктивом х40.
3. Використовуючи ключ для визначення основних груп водних безхребетних тварин і визначники водоростей, скласти таблицю видового різноманіття. Оцінити сапробність виявлених організмів по таблиця 3.2.
4. Провести облік організмів по частоті по таблиця 3.3.
5. Визначити сапробність водойми за методом Пантле і Бука (див. Приклад в тексті). Визначити клас якості води за допомогою таблиця 3.4.
6. У звіті привести всі відомості з п.п. 3 – 5, в тому числі малюнки виявлених видів.

Контрольні питання

1. Дати визначення поняттю «сапробність».
2. Охарактеризувати водойму за показниками сапробності гідробіонтів, що її населяють.
3. Яким чином здійснюється підрахунок планктону та перифітону?
4. Які виділяють зони сапробності?
5. Назвіть види-індикатори поліса пробної зони.

Література: [1; 13; 17; 27]

Лабораторна робота № 4

Тема. Біологічний аналіз активного мулу

Мета: ознайомлення з біологічним методом аналізу активного мулу.

Матеріали та обладнання: мікроскоп; предметні і покривні стекла; піпетка на 1 мл; активний мул (або настій сіна 5-, 15-, 20-, 25-, 30-, 35-денної витримки в склянках на 250 м); формалін 40 %-й, вата, спирт.

Навчальні елементи: активний мул, фіксатори

Короткі теоретичні відомості

Біологічний аналіз активного мулу має велике значення для оперативного контролю стану процесу біологічної очистки стічних вод. Найпростіші індикаторні організми добре реагують на зміни умов існування: навантаження на мул, забезпеченість киснем, наявність токсичності, ступінь регенерації активного мулу і т. п. Загальна кількість найпростіших і різноманітність видів змінюються, крім того, за сезонами року. У зимовий період (температура води 12–13° С) спостерігається найбільша кількість найпростіших при порівняно невеликій їх різноманітності (9–11 видів). Влітку (температура води 23–25° С) різноманітність видів найбільше (понад 15) при незначній загальній кількості найпростіших.

У зв'язку зі своєрідною екологічною обстановкою в аеротенках всі організми активного мулу можна розглядати як показники умов середовища існування, тобто складу стічних вод і технологічного режиму їх очищення.

Причини численних відхилень від оптимального режиму біологічного очищення можна розділити на дві великі групи. Перша група – надходять стічні води несприятливі для біологічної очистки: можуть бути токсичними, незбалансованими за елементами живлення (перевантаження або недовантаження, як по зваженим речовинам, так і по витраті стічних вод), нерівномірно потрапляють на аераційні споруди.

Друга група – порушення експлуатації очисних споруд. До них відносяться: несвоєчасне вивантаження осілого мулу в аеротенк, недостатня аерація активного мулу в аераційних спорудах. Відхилення в режимі експлуатації міських очисних споруд або у складі стічних вод позначаються на чисельності біологічних індикаторів активного мулу (табл. 4.1). При погіршенні циркуляції мулу сума всіх вільноживучих війчастих інфузорій превалює над сумою прикріплених війчастих інфузорій, знайдених в активному мулі. На напруженість у процесах циркуляції мулу вказує рівність між сумою прикріплених і вільноплаваючих інфузорій. Збільшення чисельності дрібних джгутіконосців і дрібних голих амеб свідчить про погіршення режиму аерації. Сума всіх видів коловерток – показник інтенсивності процесу нітрифікації: при відсутності нітрифікації коловертки в активному мулі не виявляються.

Таблиця 4.1 – Використання індикаторних організмів активного мулу для технологічного контролю роботи міських очисних споруд

Зміни в технологічному режимі	Індикаторні організми та ознаки
Токсичні стоки	<i>Actinophrye</i> <i>Gromia neglesta</i> (чисельність перевищує 2 млн. на 1 г сухого мулу) <i>Zooglea ramigera</i> Цисти найпростіших Нитчасті водорості, гриби
Порушення циркуляції мулу в системі	Позитивні ознаки: наявність прикріплених інфузорій Негативні ознаки: наявність вільноплаваючих інфузорій
Порушення аерації	Дрібні джгутіконосці Дрібні амеби
Зміни малих навантажень на мул	Зміна суми бентосних ракоподібних амеб
Продуктивність процесу нітрифікації	Зміна суми коловерток

Принцип запропонованого в лабораторній роботі методу – облік кількості та стану організмів-індикаторів за результатами мікроскопування активного мулу. На підставі цих характеристик роблять висновок про стан активного мулу і його здатності до переробки забруднень. Біологічний аналіз доповнює технологічний контроль якості очищення та роботи комплексу споруд біологічної очистки.

Проби для аналізу беруть окремо з кожної споруди: аеротенка, регенератора, вторинного відстійника, біофільтра. Рідку пробу, відібрану ковшем, переливають в широкогорлу банку, заповнюють її на половину обсягу і закривають пробкою. негайно переносять в лабораторію і приступають до аналізу не пізніше ніж через 20–30 хв з моменту взяття проби (протягом 1–2 год пробу, не закриту пробкою, можна зберігати в холодильнику). Для відбору проб з дна споруди з вторинного відстійника або з резервуару може бути застосований батометр. Якщо його немає, використовують склянку з пробкою, відкриваючи її на заданій глибині за допомогою троса, прикріпленого до пробки. Проби з біофільтрів відбирають скребком на різних глибинах завантаження. В лабораторії беруть зіскрібки плівки з твердого субстрату і розглядають під мікроскопом. негайно після доставки проб з аераційних споруд в лабораторію відливають з кожної проби 100 мл у циліндр для визначення обсягу мулу через 30 хв відстоювання та дози мулу.

Зазвичай для фіксації препаратів використовують 40 %-й формалін. По можливості для фіксації застосовують рідину Утермеле: в 20 мл дистильованої води з 5 г двічі сублімованого йоду розчиняють 10 г KI, додають 50 мл дистильованої води і 5 г оцтовокислого натрію. Розчин зберігають не більше 1 міс в склянці з темного скла з притертою кришкою.

Для мікроскопування джгутикових придатний йод, 0,3 %-й водний розчин; для наркозу коловерток – сульфат нікелю, 1 %-й водний розчин. Нейтральрот, водний розчин (1:800) застосовують для мікроскопування найпростіших; гліцерин – для мікроскопування черв'яків і виготовлення

тимчасових препаратів. Спирт етиловий 96 %-й є універсальним засобом для фіксації організмів.

Основним методом аналізу організмів активного мулу (найпростіших, коловерток і ін.) є мікроскопування в живому стані. В очищеній воді для згущення проби застосовують центрифугування, відстоювання або фільтрування через мембранний фільтр № 6 (розмір пор 2–5 мкм). Краплю свіжого мулу наносять на скло, покривають покривним склом і розглядають під мікроскопом. Рекомендується переглядати до 10–15 крапель. Крім визначення видів організмів відзначають фізіологічний стан організмів, структуру мулу, наявність зооглеї, включення мінеральних або органічних частинок, сміття і т.д. При визначенні видів організмів треба детально розглянути їх внутрішню будову, тому їх роблять нерухомими, застосовуючи фіксацію або наркоз. Звичайні фіксатори (етиловий спирт та формалін) сильно деформують найпростіших, тому застосовують швидкодіючий фіксатор – пари осмієвої кислоти. Щоб зафіксувати препарат, на предметне скло наносять краплю рідини з найпростішими, скло швидко перевертають краплею всередину склянки з розчином осмієвої кислоти і витримують протягом декількох секунд щільно притиснутими до шийки склянки. Потім розглядають препарат під покривним склом при великому збільшенні.

При якісному перегляді проб організми можна враховувати за п'ятибальною шкалою. Найбільш прийнята шкала шестиступінчаста дев'ятибальна (1, 2, 3, 5, 7, 9). Однак якісна оцінка суб'єктивна, а також недостатньо точна, тому кількісний облік застосовують у лічильних камерах. Якщо неможливо підрахувати кожний вид організмів окремо, то кількісний облік організмів проводять за наступними рахунковим групами: нитчасті бактерії, губки, зооглеї, джгутикові, амеби, вільноплаваючі і сидячі інфузорії, коловертки, черв'яки, личинки комах, рачків і т. п. При взятті проби піпеткою слід ретельно перемішувати рідину.

Кількість організмів виражають в примірниках або об'ємних одиницях біомаси на 1 мл мулової суміші активного мулу, а також на 1 г сухої речовини

активного мулу. При порівнянні активного мулу з різних споруд – аеротенка і регенератора або двох аеротенків з різними дозами мулу – краще виражати вміст організмів на 1 г сухої речовини мулу. Для цього одночасно з мікроскопіюванням з тієї ж проби визначають дозу мулу і потім ділять число організмів на дозу мулу в грамах. Оскільки організми сильно відрізняються між собою за розмірами, правильніше виражати вміст організмів не в числі, а в їх біомасі. Для цього обчислюють об'єм організмів, виходячи з вимірів їх розмірів за допомогою окуляра-мікрометра і прирівнюючи форму кожного організму до простого геометричного тіла. Щільність організмів приймають рівною одиниці, отримують біомасу в грамах.

Порядок виконання лабораторної роботи

1. Отримати у викладача зразки активного мулу або його «макет». Зручним є макетом сінної настій різного терміну витримки з країнами, що розвиваються в ньому індикаторними видами. Техніку приготування сінного настою див. у довідковому матеріалі до лабораторної роботи.

2. Використовувати мікроскоп з малим збільшенням. На предметне скло нанести піпеткою краплю попередньо добре перемішаної мулової суміші і накрити покривним склом. негайно приступити до мікроскопіювання. Замальовувати виявлені у всіх полях зору види в робочий зошит.

3. На наступному етапі на предметне скло нанести довільну кількість осілого мулу і затиснути між двома предметними скельцями. Тут слід зосередити увагу на стан організмів, величиною, формою і щільності пластівців мулу, наявності сторонніх домішок.

4. Дати можливу характеристику активного мулу за наявності індикаторних видів.

5. У звіті представити малюнки наявних груп організмів – індикаторів, відомості по їх кількісному обліку, оцінку ступеня очистки мулу.

Контрольні питання

1. Дати визначення поняттю «активний мул».
2. Охарактеризувати воду за видовим складом коловерток, що в ній

знаходяться.

3. Яким чином здійснюється визначення видового складу активного мулу?

4. Як визначається об'єм організмів, що знаходяться у досліджуваних пробах?

5. Якими фіксаторами користуються при дослідженні активного мулу?

Література: [8; 18; 24; 31]

Лабораторна робота № 5

Тема. Оцінка трофічних властивостей водойми з використанням вищих рослин

Мета: оволодіти методикою визначення трофності водойми за видовим складом ВВР. Засвоїти навичку виготовлення гербаріїв ВВР.

Матеріали та обладнання: гербарій рослин, які ростуть у водоймах; визначники, каталоги вищих рослин.

Навчачльні елементи: вища водна рослинність (ВВР), трофність

Короткі теоретичні відомості

Вищі водні рослини серед вищевказаних груп організмів-індикаторів є найменш вивченою ланкою, хоча мають ряд переваг. Вони являють собою видимий неозброєним оком і тому дуже зручний об'єкт для спостереження, а також дають можливість при рекогносціювальному гідробіологічному огляді водойм в першому наближенні візуально оцінити їх екологічний стан. Макрофіти дозволяють визначити трофічні властивості води, а іноді і специфіку її хімізму, що має істотне значення при біоіндикації чистих вод.

Принцип методу заснований на обліку видового різноманіття представників водної макрофлори і їх індикаторної значимості. В прибережно-водної рослинності виявляється виключно легко піддається обліку домінантна флора. При цьому підтипу водної рослинності, представленій гідромезофітними, гідрофітними і гігрофітними видами, відводиться

принципова роль в оцінці забруднення водного середовища. Підтипу прибережної рослинності, представленої гігрофітними, мезофітними і ксеромезофітними видами, визначальне значення надається при оцінці забруднення донних відкладень малорозчинними токсичними речовинами.

При ботанічній індикації стоячих водойм доцільно враховувати наступні показники при візуальному огляді водного об'єкта: ступінь покриття його макрофітами, флористичне різноманіття рослин, відхилення в розвитку і рості. При наступних лабораторних дослідженнях, у разі необхідності, визначається ряд кількісних характеристик: величини фітомаси та продукції, висота і маса стебла, хімічний склад рослин.

Велику роль при індикації вод відіграє наявність певних видів-індикаторів. Але виявлення таких рослин зустрічає ряд труднощів внаслідок того, що багато з них володіють широкими екологічними та географічними ареалами. Більш того, в різних фізико-географічних умовах дані рослини-індикатори можуть зустрічатися у водоймах неоднакового трофічного статусу і мати відповідно різне індикаторне значення.

Лімітуючим фактором при виявленні індикаторних видів є також обмеженість відомостей про екології та фізіології більшості видів макрофітів.

За загальноприйнятою класифікацією стоячі водойми (озера, природні ставки тощо) поділяються на ацидотрофні, дистрофні, оліготрофні, мезотрофні та евтрофні. Крім того, є низка перехідних стадій. Для розрахунку загальної трофності кожному типу водойми надається номер: ацидотрофні – 0, дистрофні – 1, оліготрофні – 2, мезотрофні – 3, евтрофні – 4. Частоту зустрічальності враховують за дев'ятибальною шестиступінчатою шкалою частот з такими позначеннями:

1 – дуже рідко, 2 – рідко, 3 – нерідко, 5 – часто, 7 – дуже часто, 9 – багато (табл. 5.1).

Таблиця 5.1 – Співвідношення значень відносного достатку і частоти трапляння організмів (h)

Частота зустрічання	Кількість екземплярів одного виду, %	h
Дуже рідко	< 1	1
Рідко	2-10	2
Нерідко	10-40	3
Часто	40-60	5
Дуже часто	60-80	7
Багато	80-100	9

У робочий журнал вносяться назви всіх індикаторних видів водних рослин (табл. 5.2).

Вид	Тип водойми (1)	Частота зустрічання (2)	(1)x(2) =(3)
<i>Nuphar lutea</i>	1	1	1
<i>Myriophyllum altemiflorum</i>	2	2	4
<i>Potamogeton lucens</i>	2	5	10
<i>P. compressus</i>	3	5	15
<i>Lemna trisulca</i>	3	7	21
<i>Elodea canadensis</i>	3	9	27
<i>Carex vesicaria</i>	3	3	9

$$\Sigma(2) = 31 \quad \Sigma(3) = 87$$

Приклад розрахунку сумарної трофності водойми

Загальна сумарна трофність водойми $\Sigma(3)/\Sigma(2) = 2,8$, що відповідає перехідному типу водойми між оліго- та мезотрофними.

Хід роботи

1. Отримати у викладача завдання на картці.
2. Дати назву кожній рослині, зазначеному у завданні номером, використовуючи гербарій, а також каталоги-визначники.

3. Виділити індикаторні види водойм різної трофності. Дати характеристику водойми в шкалі трофності по рослинах-індикаторах.

4. Привести у звіті назви всіх рослин, вказати індикаторні види водойм за шкалою трофності, охарактеризувати трофічні властивості водойми.

Довідковий матеріал

Класифікація стоячих водойм по трофності

Ацидотрофні водойми досить своєрідні за своєю природою. За класифікацією Тинеманна-Науманна до них відносяться водойми з кислою реакцією води ($\text{pH} < 5,5$). Вони можуть мати як безбарвну, так і пофарбовану в бурий колір воду. У першому випадку має місце комбінація ацидотрофії з оліготрофією, у другому – ацидотрофії з дистрофією. Густі зарості очерету, що процвітають в лужних водах, у більш кислих зменшуються, зустрічаються більш обмежено, а у дуже кислих водах зникають зовсім, на їх місці починають розвиватися осока, хвощ і лепешняк.

Ацидотрофно-оліготрофні водойми можна встановити за наявністю показників оліготрофії – по слабкому розвитку рослинного покриву, значною розрідженості заростей і пригнобленого стану рослин з низьким значенням фітомаси.

Ацидотрофно-дистрофні водойми можна виділити по переважанню водно-болотних рослин видів. Зареєстровано в них також водяна сосонка, пухирчатка звичайна. Ступінь покриття цих водойм макрофітами невелика, зарості значною мірою розріджені, рослини пригнічені, величини фітомаси низькі. Кисла реакція середовища і низька прозорість води негативно впливають на проростання рослин.

Дистрофні водойми розташовані в основному в заболоченій місцевості, береги їх низькі, заболочені, з рідкісною рослинністю, часто складені з сфагнуму. Реакція середовища кисла, вода сильно забарвлена, прозорість її дуже низька. Значно розріджується прибережні зарості очерету і хвоща. Зникають рдесник і частково замінюються на зарості їжачої голівки. Для дистрофних водойм характерні уздовж урізу води різні види осок та водно-

болотної рослинності, на дні – сфагновий мох. Часто зустрічаються очерет звичайний, хвощ болотної, глечики жовті, їжача голівка споріднена.

Приклад складання завдання на картках для виконання лабораторної роботи

В ході літніх практик готуються гербарії, в яких макрофіти зазначені під номерами. Робиться опис всього матеріалу. У картці для лабораторної роботи «моделюється» водойма певної трофності. Студентам видаються гербарії 8–10 видів водних рослин, які вони самі ідентифікують за допомогою визначників. У картці для кожного гербарного матеріалу вказується приблизна у даному «водоймищі» частота зустрічальності цього рослини. Причому в гербаріях можуть бути представлені як індикатори трофності водоймища, так і водні рослини, які не є такими.

Контрольні питання

1. Дати визначення поняттю «трофність».
2. Як водойми поділяються за ступенем трофності?
3. Які види макрофітів характерні для ацидотрофних водойм?
4. Як розраховується сумарна трофність водойми?
5. Для яких водойм характерна наявність сфагнового моху?

Література: [1; 23]

Лабораторна робота № 6

Тема. Визначення якості води у прісній водоймі за видовою різноманітністю макрофітів

Мета: розрахувати загальний сумарний ступінь забруднення водойми.

Матеріали та обладнання: гербарій рослин з водойми, визначники, каталоги вищих рослин.

Навчальні елементи: макрофіти, частота трапляння

Короткі теоретичні відомості

Токсичні речовини (матеріали і продукти органічного синтезу) акумулюються в донних відкладеннях і розподіляються в різних середовищах: в товщі води, в органічній компоненті – абіотичній і біотичній.

В табл. 6.1 відображені властивості різних груп водної рослинності і показані переваги і недоліки використання їх в якості індикаторів забруднення непротічних поверхневих вод. Треба відзначити, що використання водної рослинності обмежено через сезонність розвитку цих організмів.

Вищі квіткові водні рослини і деякі види водоростей в тій чи іншій мірі відповідають вимогам інтегральної оцінки ступеня забруднення водного середовища поллютантами.

Таблиця 6.1 – Властивості різних груп водної рослинності, що використовуються в якості біоіндикаторів забруднення водою

Групи організмів	Переваги	Недоліки
Фітопланктон	Відіграє важливу роль в трофічних ланцюгах	Міграція у водоймі, сезонний розвиток
Перифітон	Дуже високий фактор накопичення забруднюючих речовин; зустрічається усюди	Високочутливий до токсичності; складний відбір кількісних проб; не мінералізується; сезонний розвиток
Макрофіти (<i>Potamogeton, Elodea, Nuphar, Phragmites</i>)	Легко ідентифікувати, зустрічається в певних частинах водойми протягом декількох років	Присутній в слабо забруднених середовищах; велика різниця в поглинанні забруднюючих речовин у різних видів
Макроскопічні водорості (<i>Cladophora, Lemanea, Enteromorpha</i>)	Легко ідентифікувати; зустрічаються усюди; висока толерантність до забруднюючих речовин; відбивають кількісний вміст у воді забруднюючих речовин	Сезонний розвиток; дуже чутливі до змін гідрологічних умов

Розроблено спеціальний ключ до визначення ступеня забруднення поверхневих вод.

Принцип методу полягає у виявленні в водному середовищі індикаторних видів рослин, адаптованих до певного ступеня забруднення (від слабого до сильного). Частоту їх трапляння враховують за дев'ятибальною

шестиступінчатою шкалою частот з наступними позначеннями: 1 – дуже рідко, 2 – рідко, 3 – нерідко, 5 – часто, 7 – дуже часто, 9 – маса.

За ступенем забруднення водойми поділяють на п'ять класів: дуже слабо, слабо, помірно, дуже, надмірно забруднені, відповідно позначаючи класи цифрами від 1 до 5 (табл. 6.2).

Часто у водоймі присутні декілька індикаторних видів, що ростуть в середовищі різного ступеню забруднення. Відповідно, необхідно визначити загальну сумарну ступінь забруднення. З цією метою підраховують суму всіх частот траплянь рослин-індикаторів. Знаходять добуток ступеня забруднення, на який вказує присутність рослини-індикатора і частоти його трапляння, і сумують ці добутки для всіх індикаторних видів, що виявлено в даній водоймі. Отриману суму добутків ділять на суму частот: цей коефіцієнт показує загальний сумарний ступінь забруднення.

Приклад розрахунку загального сумарного забруднення

Проба: _____. Дата _____. Спілка: рослинна

Вид	Ступінь забруднення (1)	Частота трапляння (2)	(1) x (2) = (3)
<i>Ultricularia minor</i>	1	1	2
<i>U. australis</i>	2	1	3
<i>Myriophyllum spicatum</i>	2	3	6
<i>M. verticillatum</i>	3	2	6
<i>Potamogeton perfoliatus</i>	3	2	28
<i>Elodea canadensis</i>	4	7	28
<i>P. crispus</i>	4	7	12
<i>P. pectinatus</i>	4	3	12
<i>Ranunculus circinatus</i>	4	3	12
<i>P. nodosus</i>	5	2	10
		$\sum (2) = 31$	$\sum (3) = 113$

Таблиця 6.2 Водні рослини-індикатори біологічного стану поверхневих вод

Ступінь забруднення води	Дуже слабо забруднена (1)	Слабко забруднена (2)	Помірно забруднена (3)	Дуже забруднена (4)	Надмірно забруднена (5)
Глибина прямої видимості при сонячному світлі	Більше 6 м	4–6 м	2–4 м	Менше 2 м	Менше 0,5 м
Харові водорості	Дно водойм поросло харовими водоростями (до глибини більше 10 м)	Великі зарослі, досягають в довжину 8 – 10 м	Ростуть лише в приповерхневому шарі	Відсутні	
Інші водорості			Місцями нитчасті водорості	Розповсюджені нитчасті водорості	Сильне цвітіння водоростей
	Хара терниста (<i>Chara aspera</i>)	Хара ламка (<i>Chara fragills</i>)	Нітелопсис дводомний (<i>Nitellopsis obtuse</i>)	Нитчасті водорості <i>Cladophora sp.</i>	
Квіткові рослини	Рідко		Велике різноманіття видів		Часто зарослі одного виду
	Пухирчатка охриста (<i>Ulricularia ochroleuca</i>)	Водопериця колосова (<i>Myriophyllum spicatum</i>)	Рдесник блискучий (<i>Potamogeton lucens</i>)	Елодея канадська (<i>Elodea canadensis</i>)	Кушир занурений (<i>Ceratophyllum demersum</i>)
		Пухирник південний (<i>Ulricularia australis</i>)	Рдесник пронизанолистий (<i>Potamogeton perfoliatus</i>)	Рдесник курчавий (<i>Potamogeton crispus</i>)	Стрілиця звичайна (<i>Sagittaria sagitifolia</i>)
			Водопериця мутовчата (<i>Myriophyllum verticillatum</i>)	Рдесник гребінчастий (<i>Potamogeton perinatus</i>)	Ряска/Багатокорінник (<i>Lemna/Spirodella</i>)

Загальний сумарний ступінь забруднення $\Sigma(3) : \Sigma(2) = 3,6$, що відповідає проміжному ступеню забруднення водойми між помірною і сильною.

Вираховують похибку. Інтервал точності для статистичної надійності 95 %. Зазвичай загальний сумарний ступінь забруднення вираховується з точністю до 0,1.

Хід роботи

1. Отримайте гербарні зразки макрофітів.
2. Визначте їх видову приналежність.

3. Враховуючи частоту трапляння наданих видів, за таблицею визначте клас забруднення водойми, де вони були зібрані.

4. Обрахуйте похибку.

5. Визначте статистичну достовірність отриманих результатів.

Контрольні питання

1. Скільки виділяють класів забруднення водойм? Які це класи?

2. Як обраховується показник «частота трапляння»?

3. Які переваги і недоліки різних груп рослин при використанні їх в якості індикаторів забруднення водойм?

4. В чому полягає принцип методики визначення ступеню забруднення водойми за допомогою макрофітів?

Література: [2; 22; 29].

Лабораторна робота № 7

Тема. Метод привитої сополімеризації з використанням в якості тест-об'єкта *Daphnia magna*

Мета: освоєння метода експрес-оцінки якості середовища проживання живих організмів по змінам інтенсивності ВР-реакцій у дафній, типових для ранніх стадій патологічних процесів.

Матеріали та обладнання: тест-об'єктами можуть служити різні гідробіонти (дафнії, ембріони амфібій та риб, морські безхребетні та ін.), чашки Петрі, мікродоза тор, мірні циліндри (на 10 мл та більші), піпетки, контейнери (з притертою пробкою) для зберігання розчину індикатора і збору відходів, кювета, ножниці, пінцети, ваги аналітичні, флакони для сцинтиляційного рахунку, термостат, сцинтиляційний лічильник для виміру радіоактивності, 70% спирт, 0,1% розчин індикатора акриламіда ^{14}C (з активністю 37 кБк/мл), концентрована HClO_4 , трис, сцинтиляційний розчин Брен, CuCl_2 .

Навчальні елементи: біотестування, тест-об'єкт

Короткі теоретичні відомості

В якості тесту використовується реакція привитої сополімеризації (ПС) міченого по вуглеводу індикатора акриламід¹⁴C.

Принцип методу в тому, що при введенні в живий організм індикатора-мономера в клітинах відбувається полімеризація цієї ненасиченої сполуки, ініційована метаболічними вільними радикалами, при цьому утворюються сополімери, у яких ланцюги міченого полімеру сполучаються з біополімерами (білками, фосфоліпідами). Невеликі молекули водорозчинного мономера легко проникають в живу клітину і досить швидко вимиваються із неї, тоді як сополімери вилучаються із нормального метаболізму і при довгій інкубації накопичуються в клітинах об'єкта. Це обумовлює високу чутливість методу. Мічені сополімери, концентрація яких в клітинах біологічного об'єкта пропорційна кількості утворених за час інкубації вільних радикалів, можуть бути потім виявлені методом радіометрії. Загальна чутливість методу суттєво підвищується при використанні сучасних рідких сцинтиляційних лічильників.

Концентрація вільних радикалів в клітинах і тканинах характеризує рівень окислювально-відновлювальних реакцій, так як вільні радикали (ВР) є проміжними продуктами цих реакцій. В клітинному метаболізмі у тварин розповсюджені ВР-реакції ц ферментативних ланцюгах окислення мітохондрій та мікросом, можливо, в процесі генерації АТФ, а також при не ферментативному окисленні (значна кількість ВР в живій клітині утворюється при перекисному окисленні мембранних ліпідів). В ряді робіт показано, що концентрація ВР в тканинах корелює з їх функціональною активністю і є досить чутливим показником різного роду пошкоджень клітин і тканин.

Тест-об'єктом для оцінки ступеня забруднення прісних водойм методом ПС може бути представник прісноводних біоценозів рачок *Daphnia magna*, шикоро розповсюджений в прибережній зоні стоячих або повільно текучих водойм. Вся процедура визначення займає не більше 2 діб (тому спосіб може рахуватися експресним) і проводиться в два етапи. Перший етап – відбір проб – проводиться в польових умовах з використанням звичайного лабораторного посуду і шприца для введення індикатора – розчину міченого акриламиду.

Концентрація та активність міченої речовини настільки мала (0,1 % у воді при активності робочого розчину 37 кБк/мл), що немає необхідності в створенні особливих умов безпечності для роботи. Неможна лише допускати потрапляння розчину в рот або на поверхню очей, а також слід ретельно збирати в контейнер залишки розчину і відходи досліду і своєчасно доставити їх для знищення в лабораторію. Проби відбираються в спеціальні флакони для сцинтиляційного рахунку. На другому етапі роботи потрібно рідинний сцинтиляційний лічильник, також дослід повинен закінчуватися в лабораторії.

Хід роботи

1. Приготувати необхідні розчини. В якості досліджуваних розчинів в даній задачі використовуються розчини CuCl_2 різної концентрації відносно гранично допустимих значень – від 0,1 до 100 (ПДК) (Табл. 1.1)

2. По 10 дафній помістити в сосуди з 20 мл інкубаційного середовища – проб, що тестуються, і чистої води (контроль).

3. В кожний стакан додати індикатор.

4. По закінченні 1,5 год відмити рачків трьома порціями чистої води і, висушивши на фільтрувальному папері, помістити по 5-6 штук у флакони для сцинтиляційного рахунку.

5. До кожної проби додати по 0,4 мл концентрованої HClO_4 і поставити в термостат до повного розчинення проби (на 10-15 год.) при 56 °С.

6. Потім до кожної проби додати по 1 мл 1,5М трису і по 10 мл сцинтиляційного розчину Брея.

7. Радіоактивність проб визначити методом рідинної сцинтиляції, враховуючи, що включення мітки пропорційна рівню радикальної полімеризації.

8. Для оцінки токсичності досліджуваних розчинів порівняти рівень радикальної полімеризації в дослідних і контрольних пробах. Це досягається зіставленням їх радіоактивності (в перерахунку на 1 дафнію).

9. Експеримент ставиться 3 рази. Достовірність різниці дослідних і контрольних вибірок оцінити стандартними статистичними методами.

Таблиця 1.1 – Гранично допустимі концентрації забруднюючих речовин для рибогосподарського значення

Забруднююча речовина	Гранично допустима концентрація, мг/л
Амоній сольовий (NH_4^+)	0,5
Нітрат-іон (NO_3^-)	40
Нітрат-іон (NO_2^-)	0,08
Нафта та нафтопродукти	0,05
Феноли	0,001
СПАВ аніонактивні	0,1
Залізо (Fe^{3+})	0,5
Мідь (Cu^{2+})	0,001
Цинк (Zn^{2+})	0,01
Хром (Cr^{2+})	0,5
Хром (Cr^{6+})	0,001
Нікель (Ni^{2+})	0,01
Кобальт (Co^{2+})	0,01
Свинець (Pb^{2+})	0,03
Миш'як (As^{3+})	0,055
Ртуть (Hg^{2+})	0,0005
Кадмій (Cd^{2+})	0,005
Марганець (Mn^{2+})	0,01
Фтор (F^-)	1,5
Ціаніди (CN^-)	0,05
Роданіди (CNS^-)	0,1
Метилмеркаптани	0,002
Бензол	0,5
Метанол	0,1
Формальдегід	0,01
Калій (катіон) (K^+)	50,0
Кальцій (катіон) (Ca^{2+})	180,0
Магній (катіон) (Mg^{2+})	40,0
Натрій (катіон) (Na^+)	120,0
Сульфати (аніон) (SO_4^{2-})	100,0
Хлориди (аніон) (Cl^-)	300,0

Контрольні питання

1. Пояснити принцип методики біотестування.
2. Як здійснюється відбір проб для біотестування?
3. Які організми використовуються в якості тест-об'єктів?
4. На основі чого робиться висновок про токсичну дію досліджуваних проб води?

Література: [3; 12; 15; 16; 33].

Лабораторна робота № 8

Тема. Біотестування з використанням зелених мікроводоростей

Мета: опанування методикою біотестування з використанням в якості тест-об'єкту культури зелених мікроводоростей.

Матеріали та обладнання: культура зелених мікроводоростей *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Vreb. або *Chlorella vulgaris* Beijer., мембранні фільтри №4 або фільтрувальний папір (синя стрічка), апарат Зейтца, чиста вода, прооби води, що піддається тестуванню, скляні колби об'ємом 250 мл, піпетки, штучне поживне середовище Успенського №1, камера Горяєва або Фукс – Розенталя з покривними скельцями, мікроскоп, люміностант.

Навчальні елементи: критерії токсичності, тест-об'єкт

Короткі теоретичні відомості

Принцип методики. Методика біотестування з використанням зелених мікроводоростей базується на визначення зміни інтенсивності їх розмноження при дії токсичних речовин, що містяться в тестованій воді в порівнянні з контролем. Показником інтенсивності розмноження є коефіцієнт приросту чисельності клітин водоростей.

Короткочасне біотестування – 96 год. – дозволяє визначати наявність гострої токсичної дії води, що піддається тестуванню, на водорості.

Критерієм токсичності є достовірне зниження коефіцієнту приросту чисельності клітин у тестованій воді в порівнянні з контролем.

В якості тест-об'єкту слугує культура зелених мікроводоростей *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Vreb. або *Chlorella vulgaris* Beijer.

Для біотестування готують окремо по 100 мл розчину кожної солі із поживного середовища Успенського №1. Поживне середовище, розчини окремих солей і мікроелементів стерилізують в автоклаві протягом 45 – 60 хв. при тиску 1 атм. Колби для культивування водоростей стерилізують сухим жаром протягом 1 год. при 180 °С.

Культуру водоростей вносять до стерильної колби з поживним

середовищем в кількості, яка дає світло-зелене забарвлення. Після посіву колбу закривають стерильним ватно-марлевым тампоном і ковпачком із пергаментного паперу. Культивують водорості при цілодобовому освітленні лампами денного світла, розміщеними на відстані 30 – 40 см від поверхні культури, освітлення 2000 – 3000 лк. Водорості можна вирощувати на вікні за умов природного освітлення, захищаючи їх від прямих сонячних променів. Культуру водоростей періодично перемішують, струшуючи 1 – 2 рази на добу. Оптимальна температура для вирощування водоростей 18 – 20°C.

Умови біотестування. Для посіву використовують 5 – 7 добову культуру водоростей, які знаходяться в стадії експоненціального росту. Перед біотестуванням її згущують фільтруванням через мембранний фільтр №4 або фільтрувальний папір (синя стрічка) за допомогою апарату Зейтца. Клітини можна також сконцентрувати відстоюванням культури з подальшим відсмоктуванням середовища із колби.

З фільтру водорості переносять до колб з 30 – 50 мл контрольної води. Перевіряють чисельність клітин в суспензії, яку використовують для посіву. Чисельність клітин в суспензії повинна складати 5 – 10 млн. кл/мл.

Для підрахунку чисельності клітин використовують камеру Горяєва або Фукс – Розенталя. Продивляються 16 квадратів по діагоналі або всі поля камери у випадку малої чисельності водоростей (при одному заповненні камери прораховують не менше 50 клітин). З кожної колби продивляються не менше трьох проб. Обчислюють за формулою кількість клітин водоростей в 1 мл суспензії:

$$M = \frac{m}{n \times V} \times 10^3,$$

де m – кількість підрахованих клітин; n – кількість прорахованих маленьких квадратів камери; V – об'єм частини камери, що має площу маленького квадрату.

Біотестування проводять за оптимальної температури і освітлення.

Об'єм проби стічної чи природної води для біотестування – 0,5 л.

Хід роботи

1. У колби об'ємом 250 мл налити по 100 мл контрольної чи тестованої води.

2. До кожної колби піпеткою додають по 0,5 мл згущеної культури мікроводоростей та по 0,1 мл розчину солей та мікроелементів.

3. Колби закрити ватно-марлевими тампонами, їх вміст ретельно перемішати і в кожній колбі визначити вихідну кількість клітин, яка повинна складати 25 – 50 тис. кл./мл.

4. Розмістити колби в люміностабі або добре освітлювальному місці, захищеному від прямих сонячних променів.

5. Через 96 год. припинити процедуру біотестування, підрахувавши чисельність клітин в кожній колбі.

6. Для визначення наявності гострої токсичної дії тестованої води на водорості розрахувати коефіцієнт приросту чисельності клітин водоростей в контролі і тестованій воді за формулою:

$$K = N_t/N_0,$$

де N_t – чисельність клітин в контролі або тестованій воді через обліковий проміжок часу t , кл/мл; N_0 – вихідна кількість клітин, кл/мл.

7. Застосовуючи прийоми статистичної обробки, встановити достовірність відмінностей між коефіцієнтом приросту чисельності клітин в контролі і тестованій воді. Достовірне зниження коефіцієнту приросту чисельності клітин в тестованій воді в порівнянні з контролем свідчить про наявність гострої токсичної дії тестованої води на водорості.

8. Результати біотестування оформити у вигляді таблиці 8.1:

Таблиця 8.1 Результати біотестування з використанням мікродоростей

Дата відбору проби	Місце відбору проби	Тестована вода	Час від початку біотестування, доб	Чисельність водоростей, тис. кл/мл		Коефіцієнт приросту чисельності			Оцінка води, що тестується (завдає чи не завдає гостру чи хронічну токсичну дію)	
				повторність		повторність		Середнє арифметичне		Критерій достовірності
				1	2	1	2			
	Контрольна	0								
		4								
		7								
		14								
	Стічна або природна	0								
		4								
		7								
		14								

Контрольні питання

1. Які водорості використовуються в якості тест-об'єкту в біотестуванні за даною методикою?
2. До яких систематичних груп належать ці водорості?
3. Як довго триває процедура біотестування з визначення наявності гострої токсичної дії?
4. Чому процедура біотестування проводиться у люміностаті чи добре освітлювальному приміщенні?
5. Що є критерієм токсичної дії води на тест-об'єкти?

Література: [6; 10; 14; 16; 21; 30].

Лабораторна робота № 9

Тема. Визначення забруднення середовища важкими металами за ростовими властивостями відрізків колеоптилей

Мета: визначення ступеня забруднення середовища важкими металами за приростом відрізків колеоптилей пшениці.

Матеріали та обладнання: окулярний мікромметр, термостат, пінцет, чашка Петрі, пробірки, фільтрувальний папір, лезо або спеціальні пристрої для нарізування колеоптилей, ваги, бюкси, мірні колби; 3-добові етиловані проростки ячменю чи пшениці, солі дво- і тривалентних важких металів, дистильована вода, ґрунт.

Навчальні елементи: колеоптилі, ростовий тест

Короткі теоретичні відомості

Відрізки колеоптилей злакових отримують з тридобових етилованих проростків, відсікаючи на відстані 3 – 5 мм нижче верхівки проростка за допомогою спеціального ножа (або леза) однакової довжини відрізки 4 мм. Відрізки поміщають в досліджуване середовище. У водному середовищі протягом кількох годин відбувається ріст відрізків колеоптиля завдяки розтягуванню – повздовжньому зміщенню целюлозних мікрофібрил під дією тиску в вакуолях клітин. Під час взаємного поздовжнього тиску мікрофібрил відбувається розрив поперечних полісахаридних зшивок між ними. Мікрофібрили знаходяться в зв'язку пектинових речовин в клітині, яка створює високу в'язкість, що перешкоджає вільному переміщенню мікрофібрил відносно один одного. Здатність їх до розриву проявляється в початковий період (кілька годин) перебування відрізків колеоптилей в випробуваній середовищі. Потім відбувається перебудова полісахаридних зв'язків за рахунок синтезу целюлози і нових полісахаридів. Передбачається, що швидкість росту відрізків колеоптилей пропорційна величині тургорного тиску E і відносного часу знаходження полісахаридних зшивок в розімкнутому стані. На існування такої залежності вказують експериментально-фундаментальні дані, які передбачають участь двовалентних катіонів в утворенні пектинового вмісту

рослинної клітини, що призводить до підвищення в'язкості речовини. В основному це проявляється при низьких концентраціях солей. При більш високих концентраціях солей двовалентних металів діє той же механізм, що і за участю солей одновалентних катіонів. Тип одновалентних аніонів не впливає на ростові властивості відрізків колеоптилей. Заміна одновалентного аніона на двовалентний призводить до зростання токсичності. Токсичність сульфатів зростає в ряду $K_2SO_4 - CoSO_4 - CuSO_4 - NiSO_4 - CdSO_4$ в співвідношенні 1: 11: 53: 54: 55. Для свинцю і цинку порівняння має проводитися щодо нітрату калію.

Принцип запропонованого в лабораторній роботі методу заснований на зміні швидкості росту відрізків колеоптилей розтягуванням за рахунок порушення відносного часу перебування полісахаридних зшивок в розімкненому стані при їх переміщенні в середовище з важким металом.

Хід роботи

1. Розрахувати навішування, відповідні 1, 50 і 100 ГДК важких металів (ТМ) для води.
2. Приготувати розчини солей важких металів відповідних концентрацій.
3. У чашках Петрі приготувати ґрунтові пластинки, насичені солями важких металів.
4. У чашки Петрі помістити по 10 відрізків колеоптилей злакових.
5. Помістити по 10 колеоптилей в пробірки з 5-8 мл розчинів солей важких металів.
6. Поставити чашки і пробірки в термостат на 24 год. при температурі 25°C.
7. Через добу виміряти довжину кожного відрізка за допомогою окулярного мікрометра з точністю до 0,1 мм.
8. Зробити висновок про вплив йонів металів на приріст відрізків колеоптилей пшениці.

Контрольні питання

1. Що таке колеоптиле?

2. Які види рослин використовуються при тестуванні за цією методикою?
3. Для чого потрібен контрольний дослід при біотестуванні?
4. Які фактори впливають на тургор ний тиск в колеоптилях?
5. За допомогою якого приладу вимірюється довжина відрізків колеоптилів? Яка при цьому досягається точність вимірювань?

Література: [3; 5; 7; 9; 10; 32].

Лабораторна робота № 10

Тема. Біотестування з використанням риб

Мета: оцінка токсичної дії води, що містить хлорорганічні пестициди.

Матеріали та обладнання: акваріуми об'ємом 200, 50 і 10 л, мікрокомпресори; риба – гуппі і даніо; сачок, корм для риби; 50 мл вихідного розчину пестициду (наприклад, гексохлоран, симазин, 2,4D) в концентрації 10^{-3} – 10^{-4} (0,001–0,0001 %) у 2%-ій сахарозі.

Навчальні елементи: короткочасне та довготривале біотестування, гостра та хронічна токсична дія

Короткі теоретичні відомості

Принцип методу заснований на порівнянні виживання риби у воді, що містить токсичні речовини, і у водопровідній воді.

Короткочасне біотестування (до 96 год) дозволяє виявляти гостру токсичну дію води на рибу за її виживанням. Показником виживання є середня кількість тест-об'єктів, що вижили у воді, яку тестують або контролюють за певний час. Критерієм токсичності є загибель 50 % і більше риб за період до 96 год у воді яку тестують порівняно з контролем.

Довготривале біотестування (до 30 діб) дозволяє виявити хронічну токсичну дію води на рибу за її виживанням.

В якості тест-об'єктів використовують рибу, що широко застосовується в міжнародних і національних стандартах по біотестуванню води, – гуппі (*Poecillia reticulata*) чи даніо (*Brachydanio rerlo*).

Систематичне положення гуппі як тест-об'єкта: тип *Chordata*, клас *Piscea*, відділ *Cyprinodontiformes*, родина *Poeciliidae*, рід *Poecilia*, вид *Poecilia reticulata* Peters.

Гуппі – один з найросповсюдженіших видів акваріумних риб. В природі мешкають в тропічних водоймах, де грають важливу екологічну роль, поїдаючи личинок москітів і комарів. Гуппі – мала риба, з яскраво вираженим статевим диморфізмом. Самці (3–4 см) зазвичай менші за самок і мають більш яскраве забарвлення. В їх забарвленні переважають сірувато-коричневі відтінки з дуже яскравими червоними, блакитними, зеленими і чорними точками. Самки досягають 6 см в довжину, зазвичай жовто-зелені.

Систематичне положення даніо як тест-об'єкта: тип *Chordata*, клас *Pisces*, відділ *Cyprinodontiformes*, родина *Ceprinidae*, рід *Brachydanio*, вид *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchnan).

Даніо – широко розповсюджена акваріумна риба. В природі мешкає у повільно текучих водоймах Південно-Східної Азії. Довжина тіла дорослої риби близько 4,5 см. Тіло має циліндричну форму, сріблясте, з 7–9 темно-синіми горизонтальними смугами. Ці смуги ведуть до хвостового і анального плавників. Спино оливково-зелена.

Для успішного проведення аналізу слід виконувати ряд потреб по утриманню тест-об'єктів і умовам біотестування.

– Використовувати термостатичні акваріуми, що забезпечують густину посадки риб з розрахунку 1–2 л води на 1 екз., відтворювачів – 4 л на 1 екз. (для гуппі) і не більше одного на 3,5 л (для даніо).

– Розміщувати акваріуми в приміщеннях, що не містять токсичних парів чи газів; заповнювати водопровідною водою ($T=24-27$ °C), відстояною три доби. Підтримувати початковий об'єм води. Міняти 1/3 води щотижнево.

– Утримувати в акваріумі дрібнолистові і плаваючі рослини. Акваріум освітлювати денним світлом не менше ніж 8 годин на добу для гуппі, для даніо достатньо природної зміни дня і ночі.

– Кормити тест-об'єкти 1–2 рази на добу, відтворювачів – 3–5 разів сухим (дафнії, циклопи) чи живим (мотиль, трубочник, дафнії, циклопи) кормом. Необхідний додатковий рослинний корм (водорості, листя акваріумних рослин, салат і т.д.).

– Використовують для біотестування гуппі у віці 1–3 тижні і статевозрілих данію.

– Біотестування проводити при природній зміні дня і ночі, концентрація кисню у воді має становити не менше 4 мг/л.

– В акваріум налити по 10 л води що тестується і контрольної. Повторюваність двократна. Проводити аерацію компресором, воду міняти через дві доби. Риб переносити за допомогою сачка. Щоденно підраховувати вижившу і видаляти померлу рибу. При короткочасному біотестуванні рибу не годувати.

Хід роботи

1. Приготувати розчини пестицидів у концентраціях 0,1; 1 і 10 ПДК.

2. В акваріуми налити по 10 л контрольної та води для тестування, що містить пестициди, й помістити по 10 риб. Воду аерувати за допомогою мікрокомпресора.

УВАГА! Так як речовина, що досліджується, погано розчинюється в воді, дозволено використання розчинників (спирту, ацетону та ін.) з метою отримання розчину або стійкої емульсії. У випадку використання етанолу його концентрація повинна бути не більше 10,0 мг/л для гострих дослідів та 1,0 мг/л для хронічних. При використанні розчинника слід ставити другий контроль з розчинником.

3. Основним показником токсичності середовища є виживаність риб. Спостереження за виживаністю проводять раз на добу протягом 96 год., підраховуючи живі особини та видаляючи померлі.

4. Час загибелі риб відмічають з наступом нерухомості (іммобілізації): риби не подають ознак життя протягом 5 хв. після доторкання до них склянню

паличкою. Дані виживаності риб за часом при різних концентраціях пестицидів записати в таблицю.

Форма запису результатів біотестування при визначення токсичної дії на групі (данію)

Час від початку дослідження, год.	Контрольна вода			Тестована вода з різною кількістю токсикантів				Оцінка води, що тестується
	Кількість риб, що вижили, шт.			Кількість риб, що вижили, шт.			Загиблі риби, %	
	повторність			повторність				
	1	2	3	1	2	3	Середнє арифметичне	

Якщо в будь-який період часу, що враховується, гине 50 % і більше риб, то біотестування припиняється. При короткотривалому біотестуванні риб не годувати.

5. При обробці результатів експерименту провести порівняння показників дослідних та контрольних риб. Визначення достовірності відхилення від контролю здійснити стандартними методами варіаційної статистики.

6. Можна зробити висновки про наявність хронічної дії води на основі достовірності відмінності виживаємості риб в контролі та воді, що тестують через 30 діб. Результати біотестування занести у таблицю.

7. При гибелі більше 50 % риб, як в гострому, так і в хронічному дослідженні вода вважається токсичною.

Контрольні питання

1. В чому полягають переваги використання в якості тест-об'єктів риб?
2. Які види риб традиційно використовуються в якості тест-об'єктів?
3. Скільки за часом триває процедура короткочасного біотестування?
4. Що визначається за допомогою довготривалого біотестування?
5. Для чого здійснюють аерацію води?

Література: [16; 19; 28]

2 КРИТЕРІЇ ОЦІНЮВАННЯ ЗНАНЬ СТУДЕНТІВ

A 90–100 відмінно

Відповідь чітка, структурована, логічна; включає у себе узагальнення та систематизовані поняття; побудована на основі матеріалів лекцій, кількох підручників; аргументоване посилання на додаткові наукові джерела (атласи, схеми), спеціальну літературу, власні наукові доробки, володіння латиною, наведення прикладів, порівняльний аналіз.

BC 75–89 добре

Відповідь логічна, чітка, структурована; глибоке розуміння матеріалу, що включає у себе узагальнення та систематизацію понять; побудована на основі лекцій і кількох підручників.

DE 60–79 задовільно

Відповідь послідовна, чітка, структурована; роз'яснення переважної більшості понять; глибоке пояснення позицій; використання лекційного матеріалу та одного підручника.

FX 35–59 незадовільно (з можливістю повторного складання)

Послідовне, але неповне відтворення матеріалу; відповідь недостатньо структурована; роз'яснювання більшості позицій; знання 1/3 латинських термінів латиною.

F 0–34 незадовільно (з обов'язковим повторним вивченням курсу)

Виступ поверхневий, базується на основі прочитаної лекції; відповідь хаотична, фрагментарна; відтворення заученого матеріалу без усвідомлення його суті. Відповідь непослідовна, безструктурна; розуміння і розкриття тільки окремих понять; без латинських термінів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Основна

1. Абакумов В.А. Методы распознавания образов в гидробиологическом анализе поверхностных вод / Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем / В.А. Абакумов [и др.]. – Т.8. – Гидрометеиздат, 1985.
2. Березина Н.А. Экология растений: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Наталья Александровна Березина, Наталья Борисовна Афанасьева. – М.: Академия, 2009. – 400 с.
3. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / О.П. Мелехова, Е.И. Сарапульцева, Т.И. Евсеева и др.; под ред. О.П. Мелеховой и Е.И. Сарапульцевой. – 2-е изд., испр. – М.: Академия, 2008. – 288 с.
4. Вайнерт Э., Вальтер Р., Ветцель Т. И. др. Биоиндикация загрязнений наземных экосистем: Пер. с нем. / Под ред. Р. Шуберта. – М. : Мир, 1998. – 350 с.
5. Веселова Т.В. Стресс у растений (Биофизический подход) / Татьяна Владимировна Веселова, Владимир Александрович Веселов, Дмитрий Сергеевич Чернавский. – М. : МГУ, 1993. – 144 с.
6. Водоросли. Справочник / Под ред. С.П. Вассера. – К.: Наук. думка, 1989. – 608 с.
7. Глухов О.З. Фітоіндикація метал-пресингу в антропогенно трансформованому середовищі / О.З. Глухов, А.І. Сазонов, Н.А. Хижняк. – Донецьк : Норд–Прес, 2006. – 360 с.
8. Голубовская Э.К. Биологические основы очистки воды. – М.: Высшая школа, 1978. – 268 с.
9. Гуральчук Ж.З. Фітотоксичність важких металів та стійкість рослин до їх дії: Монографія / Ж.З. Гуральчук. – К. : Логос, 2006. – 208 с.

10. Кассандрова О.Н. Обработка результатов наблюдений: Практическое руководство / Ольга Николаевна Кассандрова, Виктор Всеволодович Лебедев. – М.: Наука, 1970. – 109 с.
11. Кизель В.А. Физические причины диссимметрии живых систем: Проблемы современной физики / В.А. Кизель. – М.: Наука, 1985. – 120 с.
12. Козлов Ю.П. Привитая сополимеризация как метод исследования свободных радикалов в биологических системах. – М.: Изд-во МГУ, – 1970.
13. Константинов А.С. Загальна гідробіологія. – М.: Вища школа, 1972. – 472 с.
14. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для спец. вузов. – 4-е изд.; перераб. и доп./Георгий Филлипович Лакин.–М.: Высшая школа, 1990.–352 с.
15. Мелихова О.П. Экспресс-метод биотестирования качества воды по метаболическому критерию / О.П. Мелихова [и др.]. – М.: РГОТУПС, 2000. – 480 с.
16. Методическое руководство по биотестированию воды РД – 118 – 02 – 90. Под ред. Крайнюковой А.Н. – М.: Госкомприрода СССР, 1991.
17. Методы изучения состояния окружающей среды. – Вологда: Русь, 1996. – 96 с.
18. Небел Б. Наука об окружающей среде. – Т. 1. – Москва : Мир, 1995.
19. Пашков Е. В. Международные стандарты ИСО 14 000. Основы экологического управления / Е. В. Пашков [и др.]. – М.: Изд. Стандартов, 1997.
20. Последствия Чернобыльской катастрофы: Здоровье среды / под ред. В.М. Захарова, Е.Ю. Крысанова. – М.: Моск. отд. Международного фонда «Биотест», 1996.
21. Пшеничнов Р.А., Пашин Ю.В., Захаров И.А. Современные тест-системы выявления мутагенов окружающей среды. – Свердловск : РАО АН СССР, 1990. – 134 с.
22. Семеченко В.П. Принципы и системы биоиндикации текучих вод: Монография / В.П. Семеченко. – Минск: Орех, 2004. – 125 с.

23. Семин В.А., Фрейдлинг А.В. Макрофиты как индикаторы закисления и изменения трофности водоёмов // Биол. науки, 1983 – № 7.

24. Соловых Г.Н. Биотехнологическое направление в решении экологических проблем / Г.Н. Соловых [и др.]. – Екатеринбург: Ур. отд. РАН, 2003. – 178 с.

25. Стрельцов А.Б. Региональная система биологического мониторинга. – Калуга: Изд-во Калужского ЦНТИ, 2003. – 158 с.

26. Уильям Дж. Мэннинг, Уильям А. Федер. Биомониторинг загрязнения атмосферы с помощью растений / Пер. с англ. Т.А. Головиной, Л.Ф. Сальникова; Под ред. Л.М. Филипповой. – Л.: Гидрометеиздат, 1985. – 143 с.

27. Уніфіковані методи дослідження якості води. – М. : РЕВ, 1975. – 200 с.

28. Шитиков В.К. Количественная гидроэкология: Методы системной индикации: Монография / В.К. Шитиков, Г.С. Розенберг, Т.Д. Зинченко. – Тольятти: ИЭ ВБ РАН, 2003. – 463 с.

Додаткова

29. Николаевский В.С. Экологическая оценка загрязнения среды и состояния наземных экосистем методами фитоиндикации: Монография / Владимир Серафимович Николаевский. – Пушкино: ВНИИЛМ, 2002. – 220 с.

30. Патин С.А. Биотестирование как метод изучения и предотвращения загрязнения водоемов // Биотестирование природных и сточных вод: Сб. науч. тр. / ВНИИ мор. рыб. хоз-ва и океанографии; [Редкол.: С. А. Патин (отв. ред.) и др.]. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. – 108 с.

31. Рекомендации по проведению гидробиологического контроля на сооружениях биологической очистки с аэротенками. – Москва : ЦБНТИ Минводхоза СССР, 1987.

32. Руководство по оценке воздействия промышленности на окружающую среду и природоохранных критерии при размещении предприятий: Пер. с англ. / Программа Организации Объединенных Наций по

окружающей бред; Отд. Промышленности и окружающей среды. – Новосибирск: Издательство ГПНТБ СО АН СССР, 1989. – 193 с.

33. Чалова И.В. Оценка качества природных и сточных вод методами биотестирования с использованием ракообразных (*Cladocera*, *Crustacea*): Научно-методическое издание / Ирина Васильевна Чалова, Александр Витальевич Крылов. – Рыбинск: Рыбинский Дом печати, 2007. – 73 с.

34. Юрин В.М. Основы ксенобиологии: Учеб. пособие / Владимир Михайлович Юрин. – Минск: БГУ, 2001. – 234 с.

Методичні вказівки щодо лабораторних робіт з навчальної дисципліни «Основи біоіндикації та біотестування» для студентів денної форми навчання за напрямом 6.051401 – «Біотехнологія»

Укладачі: старш. викл. С. В. Дігтяр

Відповідальний за випуск заст. зав. кафедри к.х.н., доц. О. В. Новохатько

Підп. до др. _____ 2017 р. Формат 60x84 1/16. Папір тип. Друк ризографія.

Ум. друк. арк. 54. Наклад _____ прим. Зам. № _____. Безкоштовно.

Видавничий відділ
Кременчуцького національного університету
імені Михайла Остроградського
вул. Першотравнева 20, м. Кременчук, 39600