

Національний університет «Чернігівський колегіум» імені Т.Г.Шевченка  
Природничо-математичний факультет  
Кафедра біології

**Методичні рекомендації до лабораторних  
робіт з курсу «Біотестування»  
для студентів-магістрів  
спеціальності 091 Біологія**

**Чернігів 2021**

УДК 57(075.8)

M54

Методичні рекомендації до лабораторних робіт з курсу «Біотестування» для студентів-магістрів спеціальності 091 Біологія / Укладач Ткачук Н.В. Чернігів: НУЧК імені Т.Г.Шевченка, 2021. – 52 с.

У навчально-методичному посібнику наведено лабораторні роботи до курсу «Біотестування» для студентів-магістрів спеціальності «091 Біологія». До кожної лабораторної роботи зазначено тему, мету, матеріали та обладнання, теоретичні відомості, методику дослідження, завдання та контрольні питання. Посібник розрахований на студентів природничих факультетів закладів вищої освіти, викладачів та науковців.

**Рецензент:**

*Федун О.М.* - к.б.н., доцент кафедри біології Національного університету «Чернігівський колегіум» імені Т.Г.Шевченка, м.Чернігів

Рекомендовано на засіданні кафедри біології  
Національного університету «Чернігівський колегіум» імені Т.Г.Шевченка  
(Протокол № 1 від 31 серпня 2021 року)

© Ткачук Н.В., 2021

## Зміст

<b>Вступ</b> .....	4
<b>Лабораторна робота № 1.</b> Основи біодіагностики природних систем....	5
<b>Лабораторна робота № 2.</b> Біологічні індекси у біодіагностиці.....	7
<b>Лабораторна робота № 3.</b> Вплив солей важких металів на коагуляцію рослинних і тваринних білків.....	8
<b>Лабораторна робота № 4.</b> Аберації хромосом в клітинах кореневої меристеми рослин під дією мутагенів.....	9
<b>Лабораторна робота № 5.</b> Біотестування забруднення води за допомогою ряски малої ( <i>Lemma minor</i> L.).....	16
<b>Лабораторна робота № 6.</b> Вплив солей важких металів на плазмоліз протоплазми рослинної клітини.....	27
<b>Лабораторна робота № 7.</b> Визначення токсичності органічних сполук за ростовими властивостями крес-салату.....	29
<b>Лабораторна робота № 8.</b> Мітотичний індекс та тривалість фаз мітозу як тест-показники дії токсикантів.....	32
<b>Лабораторна робота № 9.</b> Хлорофіл у листках тест-рослин як показник несприятливих умов середовища.....	34
<b>Лабораторна робота № 10.</b> Біотестування токсикантів з використанням дафній.....	37
<b>Лабораторна робота № 11.</b> Дослідження параметрів вродженого імунітету риб у відповідь на несприятливий вплив за реакцією гемаглютинації.....	43
<b>Лабораторна робота № 12.</b> Визначення токсичності органічних сполук за розмноженням бактерій диско-дифузійним методом.....	48
<b>Рекомендована та використана література</b> .....	51
<b>Додаток</b> .....	52

## Вступ

Біологічні об'єкти широко використовуються у контролі якості довкілля. Наразі біологічний контроль якості довкілля включає біотестування (здійснюється у лабораторних умовах) та біоіндикацію (здійснюється у польових умовах). Метою викладання навчальної дисципліни «Біотестування» є набуття студентами-магістрами спеціальності «091 Біологія» компетенцій і компетентностей про біологічну індикацію, її організацію та проведення у сучасних умовах, основні методологічні критерії та підходи, що застосовуються при розв'язанні біоіндикаційних задач на різних рівнях. Навчальна дисципліна складається з таких змістових модулів:

1. Теоретичні основи біодіагностики природних систем.
2. Біодіагностика як властивість живого.

У пропонованому посібнику наведено методичні рекомендації до лабораторних робіт з курсу «Біотестування». До кожної лабораторної роботи зазначено тему, мету, матеріали та обладнання, теоретичні відомості, методику дослідження, завдання та контрольні питання. Посібник розрахований на студентів-магістрів спеціальності «091 Біологія» природничих факультетів закладів вищої освіти, викладачів та науковців.

## Лабораторна робота № 1

**Тема:** Основи біодіагностики природних систем

**Мета:** Навчитися характеризувати теоретичні основи біодіагностики природних систем

### Теоретичні відомості

У біологічному контролі природних систем застосовують дві групи методів: біоіндикацію та біотестування. І біоіндикаторами, і тест-організмами можуть бути рослини, тварини, мікроорганізми, які за своїми генетичними, фізіологічними, анатомічними, поведінковими особливостями здатні реагувати на фактори середовища, зміни, що відбуваються у середовищі. При біотестуванні тест-об'єктами можуть бути організми, органи, тканини, клітини, молекули, отже біотестування характеризує можливі наслідки забруднення для біоти. Біоіндикація здійснюється на рівні організму, популяції та угруповання та характеризує, як правило, результат забруднення.

### Хід роботи:

1. Навести переваги біоіндикації та біотестування.
2. Порівняти переваги використання рослин, тварин, мікроорганізмів у біоіндикації.
3. Назвати перших вчених в області біоіндикації та їх спостереження.
4. Охарактеризувати перший період розвитку біоіндикаційних досліджень.
5. Охарактеризувати другий період розвитку біоіндикаційних досліджень.
6. Охарактеризувати третій період розвитку біоіндикаційних досліджень.
7. Дати характеристику першим індикаційним визначникам.
8. Перерахувати абсолютні стандарти порівняння.
9. Перерахувати відносні стандарти порівняння.
10. Навести вимоги до біоіндикаторів та тест-організмів.
11. Охарактеризувати типи реакцій при біоіндикації.
12. Дати характеристику типам чутливості біоіндикаторів.
13. Пояснити хід адаптації до тривало діючого екстремального фактору довкілля.
14. Дати характеристику рівням біоіндикації.
15. Дати визначення поняттям та термінам:  
Біоіндикатор, аутбіоіндикація, синбіоіндикація, біодіагностика, біоіндикація, біотестування, тест-організм, тест-показник, тест-функція, мікротокс, агроіндикація, індикаційні дослідження в лісах, біогеохімічна індикація, адаптовані форми рослин, неадаптовані форми рослин, галоіндикація, гідроіндикація, геоіндикація, інженерна геоіндикація, меліоративна індикація, індикація болотних процесів, дистанційна індикація, індикація ландшафтознавства, біоіндикація кліматичних параметрів, дендроіндикація,

природоохоронна індикація, соціологічна індикація, фізіологічний песимум, фізіологічний оптимум, еврибіонти, стенобіонти, екологічна потенція, фізіологічна толерантність, індикат, індикатор, індикаційна ознака, абсолютні стандарти порівняння, відносні стандарти порівняння, достовірність біоіндикатора, значимість біоіндикатора, неспецифічна біоіндикація, специфічна біоіндикація, акумулятивні біоіндикатори, пряма біоіндикація, опосередкована біоіндикація, опосередкований біоіндикатор, первинна біоіндикація, вторинна біоіндикація, рання біоіндикація, біоіндикаційна реакція, стрес, дистрес, еустрес, стресор, адаптація, пружне навантаження, пластичне навантаження, пасивний моніторинг, активний моніторинг

16.Зробити висновок до роботи.

### **Контрольні питання**

1. Організми, присутність, кількість або особливості ..... яких є показниками ..... процесів, ....., ..... змін середовища.
2. Біодіагностика включає: 1. ....; 2. ....
3. Оцінка якості довкілля, його окремих характеристик з використанням живих організмів переважно в лабораторних умовах називається .....
4. Оцінка якості довкілля, його окремих характеристик за станом біоти в природних умовах називається .....
5. Визначення природних умов землеробства, садівництва чи виноградарства називається .....
6. Оцінка ступеня і засолення ґрунтів називається .....
7. Індикаційна цінність організму визначається його фізіологічною ..... та екологічною .....
8. Практична цінність біоіндикатора визначається його .....
9. Частота, з якою індикатор зустрічається з об'єктом індикації називають .....
10. Дайте відповідь: так чи ні. "Екосистеми реагують на стресові впливи з запізнюванням та в сильно зміненій формі".
11. Дайте відповідь: так чи ні. "На нижчих рівнях організації біологічних систем переважають прямі і частіше специфічні види біоіндикації".

## Лабораторна робота № 2

**Тема:** Біологічні індекси у біодіагностиці

**Мета:** Навчитися розраховувати деякі біологічні індекси, що використовуються у біодіагностиці

### Теоретичні відомості

Коефіцієнти достовірності та значимості є важливими характеристиками індикаторних властивостей рослин. Якщо вони достатньо високі, можна починати фітоіндикацію.

При оцінці рівня забруднення біогеоценозів зазвичай використовують різні критерії, найрозповсюдженішими з яких є характеристика видового складу, рясності видів та життєвий стан особин, які входять до складу угруповання. Перші два критерії тісно пов'язані між собою, оскільки порівняння угруповань лише за складом видів, що є, без укавання на їх рясність являє приблизну оцінку. Для об'єктивного порівняння двох досліджуваних майданчиків у одному біотопі використовують різні індекси.

### Хід роботи

1. Охарактеризувати використання коефіцієнта Жаккара, індекса біотичної дисперсії Коха, відсоткової подібності. Розрахувати їх за даними, наданими викладачем.
2. Охарактеризувати використання індекса полеотолерантності виду та індекса чистоти атмосфери. Розрахувати їх за даними, наданими викладачем.
3. Охарактеризувати використання індекса Шеннона-Вінера. Розрахувати його за даними, наданими викладачем.
4. Охарактеризувати використання індекса видового різноманіття Маргалефа, біотичного індекса, узагальненого індекса біологічної якості, індекса потенційної біологічної якості, біологічного індекса загальної якості, індекса сапробності Пантле і Букка, індекса неоднорідності Сімпсона, олігохетного індекса (індекс Гуднайта та Уітлея), індекса К. Розрахувати їх за даними, наданими викладачем.
5. Зробити висновок до роботи.

### Контрольні питання

1. Наведіть формули для розрахунків коефіцієнта Жаккара, індекса біотичної дисперсії Коха, відсоткової подібності. З якою метою використовують зазначені коефіцієнти та індекси?
2. Вкажіть індекси, які використовуються у біоіндикації забруднення атмосфери.
3. Вкажіть індекси, які використовуються для оцінки біологічного різноманіття.
4. Вкажіть індекси, які використовуються у гідробіоіндикації.

### Лабораторна робота № 3

**Тема:** Вплив солей важких металів на коагуляцію рослинних і тваринних білків

**Мета:** Дослідити дію важких металів на тваринні і рослинні білки

#### Обладнання та матеріали

1) пробірки – 16 шт.; 2) флакони з-під пеніциліну – 8 шт.; 3) стаканчик – 1 шт.; 4) піпетка на 1 мл – 2 шт.; 5) піпетка медична – 2 шт.; 6) олівець по склу; 7) фільтрувальний папір; 8) 5%-ний розчин  $\text{CuSO}_4$ ; 9) 5%-ний розчин  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ; 10) дистильована вода; 11) тваринний білок (курячого яйця); 12) рослинний білок (зернового гороху); 13) штатив для пробірок.

#### Теоретичні відомості

Робота наочно показує дію біогенних і небіогенних важких металів на тваринні і рослинні білки, виявляє різницю в реакції тих та інших. Білки з важкими металами утворюють комплекси, нерозчинні у воді.

Приготування розчинів білків здійснюють наступним чином:

**Тваринний білок.** У курячого яйця відокремити білок у мірний стаканчик, розмішати його скляною паличкою в дистильованій воді у співвідношенні 1:10. Потім профільтрувати.

**Рослинний білок.** Зерновий горох, що визрів, перемолоти у борошно в кавомолці, розвести в співвідношенні: 10 г горохового борошна на 50 мл 10%-ного розчину  $\text{NaCl}$  або  $\text{KCl}$ . Профільтрувати.

#### Хід роботи

1. Приготувати у флакончиках від пеніциліну серію розчинів купрум (II) сульфату і пльомбум (II) нітрату з вихідного 5%-ного розчину (2,5%, 1,25%, 0,62%).
2. У 8 пробірок піпеткою внести по 1 мл тваринного білка (для обох солей всього 8 розчинів). У кожену пробірку додати по 2 краплі одного з вказаних розчинів досліджуваної солі. Всі пробірки помітити олівцем по склу.
3. Розглянути характер коагуляції на темному фоні (шматочок чорного паперу, дошка та ін.). Спостереження записати до таблиці 1.
4. У 8 пробірок піпеткою внести по 1 мл рослинного білка (для обох солей всього 8 розчинів). У кожену пробірку додати по 2 краплі одного з вказаних розчинів досліджуваної солі. Всі пробірки помітити олівцем по склу.
5. Розглянути характер коагуляції на темному фоні (шматочок чорного паперу, дошка та ін.). Спостереження записати до таблиці 1.
6. Визначити концентрацію розчину солі, при якій відбувається коагуляція білка (для різних солей та для різних білків).



Таблиця 1

Дія важких металів на рослинний та тваринний білок

Сіль	Концентрація розчину			
	5,0%	2,5%	1,25%	0,62%
Тваринний білок				
CuSO <sub>4</sub>				
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>				
Рослинний білок				
CuSO <sub>4</sub>				
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>				

7. Зробити висновок до роботи.

#### Контрольні питання

1. На чому базується візуальна оцінка впливу важких металів на рослинні та тваринні білки?
2. Наведіть методику дослідження впливу важких металів на рослинні та тваринні білки.
3. Як у біотестуванні можна використати методику, що представлена у роботі?

## Лабораторна робота № 4

**Тема:** Аберації хромосом в клітинах кореневої меристеми рослин під дією мутагенів

**Мета:** Навчитись проводити облік хромосомних аберацій ана-телофазним методом.

### Обладнання та матеріали

1) ацетофуксин; 2) бюкси, що добре закриваються; 3) 30%-и та 45%-а оцтова кислота; 4) лід; 5) водяна баня; 6) термометр до 100°C; 7) 1 н HCl; 8) пінцет; 9) чашки Петрі – 5 шт.; 10) фіксатор оцтовий алкоголь (3:1); 11) скляні трубочки; 12) бинт; 13) нитки; 14) ножиці; 15) 96%-ний етиловий спирт; 16) лезо; 17) предметні скельця; 18) накривні скельця; 19) парафін; 20) спиртівка; 21) сірники; 22) скальпель; 23) розчин ксенобіотика; 24) фільтрувальний папір; 25) стерильні піпетки на 1 мл – 5 шт.; 26) дистильована вода; 27) сірники із загостреним кінцем; 28) насіння цибулі ріпчастої (по 30 насінин на 1 чашку); 29) термостат (24-25°C).

### Теоретичні відомості

Аберації хромосом, які виникають в соматичних клітинах, є результатом пошкодження хромосом на різних стадіях клітинного циклу.

Всі аберації хромосом можна поділити на перебудови хромосомного і хроматидного типу. Класифікація типів хромосомних и хроматидних абераций представлена на рис. 1.

**Фрагменти** – ділянки хромосом або хроматид, які відокремились. В кожному випадку виникає два типи фрагментів: центричні і ацентричні (ділянка хромосоми, що не має центромери). Центричні фрагменти по суті є делетованою хромосомою (або хроматидою) і тому при обліку хромосомних абераций приймають до уваги тільки ацентричні фрагменти.

**Обмінні перебудови** – це аберації, які виникають в результаті обміну матеріалом між різними хромосомами або при перерозподілі матеріалу всередині однієї хромосоми. В зв'язку з цим обмінні перебудови поділяють на міжхромосомні та внутрішньохромосомні.

Міжхромосомні обміни бувають двох типів:

- симетричні, після утворення яких хромосоми (або хроматиди) залишаються моноцентричними;

- асиметричні, в результаті яких з'являються ди-, три- або поліцентричні хромосоми і ацентричні фрагменти.

### Класифікація хромосомних аберацій



Рис. 1. Класифікація аберацій хромосом (Захаров А.Ф. та ін., 1982)

Будь-який обмін (між- або внутрішньохромосомний, симетричний або асиметричний, хромосомний або хроматидний) може бути реципрокним (повним), коли відбувається з'єднання всіх пошкоджених ділянок один з одним, або нереципрокним (неповним), при якому частина ділянок з'єднується, а частина залишається не з'єднаною з відкритими пошкодженими ділянками. Наприклад, при пошкодженні двох хромосом у випадку асиметричного повного обміну утворюється хромосомний дицентрик і один парний фрагмент, а у випадку неповного обміну буде одна з двох комбінацій: або дицентрик і два парних фрагменти, або один парний фрагмент і дві вкорочені хромосоми.

Облік хромосомних аберацій проводять або на стадії метафази, або на стадії анафази-телофази.

На стадії метафази найбільш повно вдається провести кількісний і якісний облік аберацій. Тому метафазний аналіз є універсальним аналізом, який слід використовувати у всіх випадках, коли можливо одержання метафазних пластинок відповідної якості.

Вивчення порушень спадкового матеріалу на стадії анафази-телофази проводять, як правило, або у об'єктів, у яких за рядом причин неможливий метафазний облік, або у випадках, коли потрібна лише приблизна кількісна оцінка структурних мутацій і відставань хромосом. Точність цього методу менша, ніж метафазного, тому він застосовується рідше. Перевагою методу можна вважати його універсальність (він прийнятливий практично у всіх випадках, коли є мітози) і простоту виготовлення препаратів. Останнє має

особливо важливе значення при роботі з клітинами тварин. Аналіз структурних мутацій на стадії анафази-телофази можна рекомендувати в якості експрес-методу при попередній оцінці мутагенного ефекту будь-якого агента.

Придатними для обліку хромосомних аберацій є не дуже ранні анафази і ранні телофази. Оскільки клітина, що ділиться, не завжди розпластовується на препараті по поздовжній вісі поділу, то при відборі клітин, придатних для підрахунку хромосомних аберацій, слід приймати до уваги відстань між дочірніми ядрами – воно повинно бути не менше розміру одного з них.

При обліку аберацій на стадії анафази можна розрізнити тільки хромосомний матеріал, що відстав від полюсів (ацентричні фрагменти і кільця, хромосоми, що відстали) і мости.

1. Ацентричні фрагменти і кільця можуть бути одиночними і парними. Вони розташовуються між дочірніми зірками або збоку від них. Основна задача зводиться до розпізнання одиничності або парності і до відрізнення їх від хромосом, що відстали.

Як і при обліку аберацій на стадії метафази, одиничні фрагменти являють собою фрагменти хроматидного походження. Втрата одного фрагмента з пари (хромосомного походження) – явище, вочевидь, рідкісне, оскільки притягіння між сестринськими хроматидами зберігається і на стадії анафази. За цією ж причиною малоймовірно припущення, що одиничний фрагмент може походити за рахунок злиття сестринських хроматид парного фрагменту і розгортання їх по довжині.

Парні фрагменти – це фрагменти ізохроматидного або хромосомного походження. Про з'єднання пошкоджених кінців сестринських хроматид, а не про хромосому, що відстала, можна говорити лише за умови, якщо парний фрагмент має дугоподібний вигляд. Слід відмітити, що оцінка цієї ознаки дуже ускладнена і тому не може проводитись у всіх випадках.

2. Мости інколи поділяють на хромосомні і хроматидні. Під хромосомним мостом розуміють дицентричну хромосому: він складається з двох хроматид, найчастіше перехрещених. Хроматидний міст – дицентрична хроматида, тому його видно як одиничний. **За «товщиною» моста неможна робити висновок про його хромосомний або хроматидний характер.** На жаль, не завжди можна диференціювати характер моста і тому навряд чи доцільно проводити таке розділення при використанні тотального методу забарвлення хромосом, який не дозволяє ідентифікувати окремі хроматиди.

3. Хромосоми або хроматиди, що відстали, найчастіше розпізнаються легко, оскільки в них можна бачити центромеру або неоднорідність структури, що невластиве для фрагментів. Найбільші складності виникають при необхідності відрізнити метацентричну хроматиду, що відстала, від акроцентричної хромосоми. Разом з тим, відповідь на це питання дуже важлива, оскільки в результаті відставання хромосоми утворюються дві гаплоїдні клітини, а в результаті відставання хроматиди – одна гаплоїдна і одна нормальна клітина.

Абсолютного стандарту для обліку аберацій і для представлення одержаних результатів бути не може. На практиці зустрічаються поєднання різних типів аберацій в одній і тій же клітині. Теоретично можна очікувати бідь-які поєднання аберацій. Основою для цього є асинхронність редуплікації спадкового матеріалу.

Для більшості досліджень рекомендують наступне:

- 1) важливою умовою при оцінці типів (спектру і частоти хромосомних аберацій) є проведення їх обліку в першому після дії мутагену клітинному поділі. Це пов'язано з тим, що значна частина аберацій і аберантних клітин елімуються вже після першого поділу або набуває інший вигляд, хоча деякі хромосомні аберації, які спостерігаються на стадії анафази-телофази у вигляді мостів, можуть зберігатись протягом 12-15 мітотичних циклів;
- 2) не проводити аналіз перебудов при накладанні клітин і при порушенні цілісності їх оболонки;
- 3) приймати до уваги всі типи морфологічних змін, облік яких можливий за даної методики;
- 4) аналізувати зміни поклітинно, тобто реєструвати в протоколі дослідів поєднання аберацій, які зустрілись в кожній клітині;
- 5) клітини, в яких не вдається визначити тип аберації, слід відносити до класу клітин з нерозібраними абераціями; їх враховують тільки при підрахунку загального числа аберантних клітин;
- 6) бути дуже обережними при об'єднанні будь-якого роду (наприклад, даних по окремих повторностях і даних аналогічних дослідів, за точковими фрагментами і кільцями, за дицентриками і супутніми ацентриками і т.д.). Якщо правомочність якогось об'єднання доведена для деякого об'єкта або певних умовах, то для інших об'єктів і умов вона повинна спеціально перевірятись;
- 7) при представленні даних в статті слід вказувати число досліджених особин (або повторностей досліду), число проаналізованих клітин, число кожного з типів аберацій, типи аберантних клітин і їх частоту, число анеуплоїдних клітин, що враховували.

Для точної ідентифікації хромосомних аберацій виду рослин або тварин, що вивчається, необхідно знати структуру каріотипу в нормі.

#### **Хід роботи**

1. Вивчити каріотип цибулі ріпчастої в нормі (рис.2).
2. Покласти у 2 чашки Петрі фільтрувальний папір та змочити його розчином ксенобіотика (дослід) та дистильованою водою (контроль).
3. Розкласти на папері в кожній чашці по 30 насінин цибулі.
4. Поставити чашки в термостат при 24-25°C на 1-2 доби.
5. Зафіксувати корінці в ацетоалкоголі 1 годину, промити у 96%-ному етиловому спирті і зберігати у холодильнику (2°C) у 70%-ному спирті до процесу фарбування.



Рис. 2. Хромосоми цибулі (*Allium cepa* L.) (Паушева та ін., 1988)

6. Зафарбувати корінці. Для цього зафіксовані корінці обробити 45%-ним розчином оцтової кислоти 10-30 хв при 15°C.
7. Розмістити їх у гарячому 1 н розчині HCl на 15-30 секунд при 60°C і перенести у ацетофуксин, налитий у закриті бюкси, на 1-3 год.
8. Відмити від зайвого фарбника 30%-ним розчином оцтової кислоти.
9. Виготовити давлені препарати. Для цього об'єкт покласти на предметне скло в краплю 30%-ного розчину оцтової кислоти, відокремити конус наростання, видалити зайві тканини, накрити накривним скельцем і фільтрувальним папером і постукати зверху загостреним сірником, щоби вкласти клітини конусу наростання у вигляді моношару.
10. Готові препарати окантувати розплавленим парафіном.
11. Проаналізувати готові мікропрепарати на мікроскопі, враховуючи на кожному препараті не менше 200 клітин на стадії анафази-телофази, з них – число клітин з мостами і фрагментами.
12. Після аналізу препаратів провести підрахунок загальної кількості проаналізованих клітин і визначити:
  - Процент клітин з абераціями (відношення числа клітин з абераціями до загального числа проаналізованих клітин, помножене на 100).
  - Кількість аберацій в перерахунку на 1 клітину (відношення загального числа аберацій до загального числа проаналізованих клітин).
  - Для аналізу спектру аберацій визначають частку аберацій кожного типу від загального числа виявлених аберацій.
13. Зробити висновок про вплив досліджуваного ксенобіотика на частоту і спектр хромосомних аберацій, що виникають в клітинах кореневої меристеми насіння цибулі ріпчастої.

### Контрольні питання

1. Дайте визначення поняттю аберації хромосом.

2. Які аберації хромосом вам відомі?
3. Яким чином аберації хромосом використовують у біотестуванні?
4. Що являє собою ана-телофазний метод оцінки хромосомних аберацій?
5. Наведіть методику оцінки хромосомних аберацій.

## Лабораторна робота № 5

**Тема:** Біотестування забруднення води за допомогою ряски малої (*Lemma minor* L.)

**Мета:** Навчитися здійснювати біотестування забруднення води за допомогою ряски малої (*Lemma minor* L.)

### Обладнання та матеріали

1) флуоресцентне світло або світло денної лампи для росту ряски (повне освітлення протягом 16 год); 2) стерильна культура рослин ряски; 3) 21 чистий пластиковий контейнер; 4) середовище для культивування – ростовий розчин (табл. 2); 5) піпетка для додавання ростового розчину; 6) пінцет для відлову ряски; 7) чиста пластикова плівка або пластикова пластинка; 8) 100 мл розчину для тестування за концентрації 4 ГДК (табл. 3); 9) дистильована вода для контрольного варіанта; 10) маркер

### Теоретичні відомості

Представники родини ряскових є найменшими квітковими рослинами в світі. У них спостерігається найбільша редукція всіх органів, що є результатом гідрофільної еволюції. За простотою будови вони займають перше місце серед квіткових рослин. До ряскових належать водні, вільно плаваючі, багаторічні трав'янисті рослини.

Веgetативне тіло ряскових називається листець. Листеці поодинокі або зібрані у невеликі групи за допомогою гіалінової нитки – тонкого виросту мембрани. Листець складається з паренхімних клітин хлоренхіми, які розділені великими міжклітинними порожнинами, які заповнені повітрям. Провідна система нерозвинена. Коріння розвинуте слабо і не досягає ґрунту, за будовою просте, одинарне (у спіродели багатокореневої їх число становить від 3 до 10), відходять від черевної поверхні листеця, зелені, оскільки містять хлорофіл. Ряскові належать до рослин-космополітів, оскільки розповсюджені по всьому світу. Веgetативне тіло за виглядом нагадує крихітне плаваюче листя або слань нижчих рослин, тому тривалий час ряскових відносили до водоростей.

Форма листеців ряскових або брунькоподібна, або кулеподібна. Їх цвітіння є рідкісним явищем. Плоди за розміром дещо більші за насіння маку.

Ряску називають «екологічною дрозофілою», оскільки є зручним об'єктом для біологічного тестування. Зручність використання ряски визначається особливостями її морфології, високою швидкістю розмноження, чутливістю до середовища існування.

Ряска мала (*Lemma minor* L.) є рослиною, яка мешкає у воді. Розмір листеців 2-4 мм. Має 3 жилки. Листеці плоскі, утворюють групи з 3-6 рослин (рис. 3). Найчастіше ця рослина зустрічається у стоячих водоймах. Коріння довге, але не досягає ґрунту, а виконує функцію якоря, попереджаючи перевертання рослин. Розмноження переважно вегетативним способом. При цьому окремих листок може здійснити 10 поділів за 7-10 діб. За оптимальної



температури, освітленні та живленні подвоєння маси ряскових може відбуватися від 10 годин до 2 діб.

Метод біотестування за допомогою ряски малої, який запропоновано у даній лабораторній роботі, базується на визначенні загибелі, змінах в темпах росту рослини та визначенні морфологічних змін (хлорозу, некрозу поверхні листеця, розшаруванні листеців). Зазначені тест-показники досліджують за впливу токсичних сполук та порівнюють їх з контролем.

Гострий токсичний вплив досліджуваної води на ряску визначають за загибеллю її за певний період часу. Критерієм гострої токсичності є загибель  $\geq 50\%$  рослин за 96 годин у досліджуваній воді за умови, що у контролі загинуло не менше 10%.

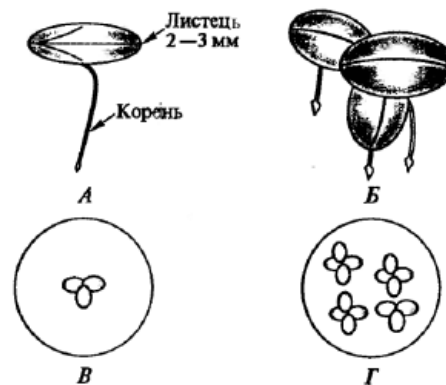


Рис. 3. Будова ряски малої: А – загальний вигляд; Б – група листеців (один материнський та два дочірні); В – рослина ряски на початку експерименту; Г – рослина ряски в кінці експерименту (Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование, 2007)

В експериментах з визначення гострої токсичної дії визначають: середню летальну концентрацію окремих сполук (кратність розбавлення води, яка містить суміш сполук), що викликає загибель  $\geq 50\%$  тест-організмів; нешкідливу (таку, що не викликає ефекту гострої токсичності) концентрацію окремих сполук (кратність розбавлення води, яка містить суміш сполук), що викликає загибель не більше 10% тест-організмів.

За смертністю та швидкістю росту за період до 24 діб у досліджуваній воді порівняно з контролем оцінюють хронічну токсичну дію. Критерієм хронічної токсичності є загибель  $\geq 20\%$  та/або достовірне відхилення в швидкості росту з числа рослин, що вижили, порівняно з контролем.

Біотестування токсичності з використанням ряски проводять у лабораторних умовах. У приміщенні не повинно бути токсичних парів та газів. Температура повітря має бути від +18 до +25 °С, атмосферний тиск 630-800 мм рт.ст. Освітлення у приміщенні має бути природним або штучним, 2500-3500 лк. Інтенсивність світла порівняно з денним освітленням повинна бути більше на 15%.

Попередня підготовка до відбору проб та виконання біотестування включає підготовку посуду, пробовідбірників, місць зберігання відібраних проб, підготовку робочого місця для обробки проб, які доставлено до

лабораторії, а також дослідження їх на токсичність. Необхідно попереджувати попадання токсичних, органічних та інших сполук у досліджувану воду при процедурах попередньої підготовки.

Посуд для відбору проб та біотестування повинний бути чистим, не містити хімічні сполуки. Попередньо його обробляють сумішшю калій біхромату та сульфатної кислоти (хромовою сумішшю). Стінки посуду обережно змочують хромовою сумішшю і через 2-3 години ретельно промивають водопровідною водою, нейтралізують розчином харчової соди та промивають 3-4 рази дистильованою водою. Для миття посуду не слід використовувати синтетичні поверхнево-активні сполуки та органічні розчинники. Посуд для відбору проб сушать на повітрі, а той, що використовують для біотестування (за виключенням мірного) у сушильній шафі (1 годину при 160 °C).

Для захисту від пилу хімічно чистий посуд для біотестування повинен зберігатися із закритими скляними притертими пробками або кришками, що закручуються, у ящиках лабораторного столу або на закритих полицях тощо. Весь брудний посуд після проведення аналізів повинен стерилізуватися кип'ятінням протягом 1 години.

В ході експерименту використовують так звану культиваційну воду, яка застосовується для розведення маточної культури, як контроль з додаванням поживного розчину для культивування, для розбавлення досліджуваних вод. Готують культиваційну воду таким чином: питну воду відстоюють у скляній пляшці із безбарвного скла протягом 3-7 діб (до повного дехлорування). Якщо питної води немає, використовують поверхневі прісні або ґрунтові води, які відбирають поза зоною впливу джерел забруднення. Таку воду фільтрують крізь фільтр з розміром пор 3,5 мкм.

Серед вимог до культиваційної води – відсутність органічних забруднюючих сполук, хлору, токсичних речовин та організмів-антагоністів ряски (синьо-зелених водоростей, найпростіших, багатоклітинних); рН 4,5-7,0; температура 20±5 °C.

#### **Перелік основних термінів та понять**

**Колонія** – угруповання материнських та дочірніх листеців, з'єднаних один з одним.

**Листець** – одинична рослина в колонії рясок. Це маленька пластинка, яка поєднала у собі листя та стебло, яка здатна до розмноження.

**Маточна культура** – рослини одного виду рясок.

**Поживний розчин** – розчин, який містить поживні сполуки та мікроелементи для росту ряски.

**Посівна культура** – число листеців, які добавлено у середовище, що тестують, на початку біотестування.

**Попередня культура** – культура рясок, яка використовується для акліматизації тест-рослин в умовах експерименту.

**Приріст** – збільшення біомаси за певний проміжок часу; оцінюється підрахунком чисельності листеців.

**Середовище для культивування** – розчин поживних сполук у відстояній водопровідній воді для забезпечення росту ряски, а також для розбавлення досліджуваних вод.

**Зразок для тестування** – отримують з природної, стічної води, розчинів забруднюючих речовин, які аналізують, шляхом різних приготувань, зокрема, розбавленням, фільтруванням, нейтралізацією.

**Розчин для тестування** – комбінація із зразка для тестування, дистильованої води та поживного розчину.

**Хлороз листеця** – пожовтіння або повне знебарвлення листеця в результаті втрати пігменту.

**Чиста культура** - культура рослин ряски, вільна від інших організмів (інших видів рясок, водоростей або водних тварин).

### Хід роботи

У тестуванні рекомендовано використовувати 5-денний цикл розвитку рослин.

1. Підготувати посуд для контролю та досліду. Підписати.
2. Підготувати середовище для культивування ряски (табл.2) та досліджувані розчини важких металів (табл.3 та Додаток).
3. Налити 30 мл досліджуваного розчину у кожний контейнер (у контроль наливають струмкову або відстояну водопровідну воду). У кожний контейнер додати одну краплю розчину для культивування.
4. Перенести до кожного контейнеру по 5 рослин рясок, використовуючи для цього пінцет. Слід відбирати лише зелені, здорові рослини з 2 дочірніми листецями, приблизно однакових розмірів.
5. Контейнери закрити, використовуючи плівку, та розмістити на 24 год під лампою денного світла. Щоб попередити перегрів та підсихання листеців (вони стискаються та втрачають тургор) не слід розміщувати контейнери під прямими сонячними променями біля вікна.
6. Контейнери з відібраними рослинами залишити ще на 5 днів. Їх слід прикрити лише пластиковою пластиною для запобігання потрапляння води протягом всього періоду тестування.
7. В кінці 5-го дня підрахувати кількість листеців у кожному контейнері. Слід користуватися лупою для підрахунку листеців малих розмірів. Відмітити зміну кольору рослин, наявність або відсутність коренів, загальний вигляд рослин. Записати результати у таблицю 4.
8. Здійснити стандартну статистичну обробку та аналіз отриманих результатів. Перш за все перевірити контрольний варіант з метою виявлення фонового росту ряски в незабруднених умовах. Якщо у контрольному варіанті рослини не вирости або виглядають не зовсім здоровими – результати експерименту анулюють. Причиною цього може бути або надто сильний поживний розчин, або хвороба рослин на початку експерименту, або проблеми з навколишнім середовищем під час тестування.

9. Для оцінки впливу забруднювача використати показник миттєвого відгуку популяції – коефіцієнт росту ( $r$ ). Його зміна відбиває спротив середовища, тобто характеризує суму всіх лімітуючих факторів середовища, які перешкоджають реалізації репродуктивного потенціалу ( $r_{max}$ ), який розраховується за контролем. Після закінчення часу експозиції в контролі та у кожній концентрації підрахувати загальну кількість листеців, включаючи материнські рослини та листеці, які відокремилися від них.

У контролі та у кожній концентрації на основі отриманих результатів розрахувати коефіцієнт росту популяції ( $r$ ):  $r = (N_t - N_0) / t$ , де  $N_0$  – початкова чисельність листеців;  $N_t$  – кінцева чисельність листеців;  $t$  – час експозиції (добі). Дані записати у таблицю обліку росту тест-рослини.

**Увага!** Дуже важливо описувати всі можливі зміни, що відбуваються з тест-рослинами. Корисно дивитися на окремі рослини аби зрозуміти особливості реакції організму. Важливо відмічати, як рослини реагують на початку експерименту, що з ними відбувається потім, чи реакція спостерігається лише у окремих рослин, чи реагує вся група. Всі ці особливості записати у табл.4. В табл.5 представлено деякі форми реакції ряски малої на присутність у воді солей важких металів.

10. Здійснити оцінку токсичності середовища за наступними критеріями:  $LC_{50}$  – летальна концентрація, яка вбиває 50% тест-рослин;  $TC_{50}$  (threshold concentration) – мінімальна, або порогова концентрація, яка забезпечує ріст не більше 50% організмів. У біотестуванні за рясковим тестом рослини продовжують рости, тому найчастіше використовують показник  $TC_{50}$ .

11. Результати роботи узагальнити у висновку.

Таблиця 2

Склад середовища для культивування ряски (за Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование, 2007)

Макроелементи, мг/л	
$KNO_3$	350,00
$Ca(NO_3)_2$	295,00
$KH_2PO_4$	90,00
$K_2HPO_4$	12,60
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	100,00
Мікроелементи, мкг/л	
$H_3BO_3$	120,00
$ZnSO_4$	180,00
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,00
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,00
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
Трілон Б	1500,00

Таблиця 4

Результати дослідження токсичності розчинів важких металів за допомогою  
*L. minor* L.

Метал	Концентрація, мг/мл	Тестові реакції			Коефіцієнт росту ( <i>r</i> )
		Забарвлення листеців	Роз'єднання листеців	Реакція листеців	

### Контрольні питання

1. Чому ряску називають «екологічною дрозофілою»?
2. Які особливості будови має ряска?
3. Які тест-показники досліджуються у ряски малої?
4. Які вимоги висуваються при підготовці посуду для дослідження?
5. Поясніть, що являє собою культивацийна вода. Для чого вона застосовується?
6. Скільки часу триває біотестування з ряскою малою?
7. Яка кількість загіблх тест-рослин допускається у контролі?

Таблиця 3

Варіанти розчинів солей важких металів, які можуть бути застосовані у лабораторній роботі (за Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование, 2007)

Концентрація, мг/л	Метал				
	PbCl <sub>2</sub> (Pb <sup>2+</sup> )	NiCl <sub>2</sub> (Ni <sup>2+</sup> )	ZnCl <sub>2</sub> (Zn <sup>2+</sup> )	CuCl <sub>2</sub> (Cu <sup>2+</sup> )	CdCl <sub>2</sub> (Cd <sup>2+</sup> )
0,0075 (0,25 ГДК)	+				
0,0150 (0,5 ГДК)	+				
0,030 (1 ГДК)	+				
0,060 (2 ГДК)	+				
0,120 (4 ГДК)	+				
0,25 (0,25 ГДК)		+	+	+	
0,5 (0,5 ГДК)		+	+	+	
1,0 (1 ГДК)		+	+	+	
2,0 (2 ГДК)		+	+	+	
4,0 (4 ГДК)		+	+	+	
1x10 <sup>-3</sup> (0,25 ГДК)					+
2x10 <sup>-3</sup> (0,5 ГДК)					+
2,5x10 <sup>-3</sup> (1 ГДК)					+
4x10 <sup>-3</sup> (2 ГДК)					+
5x10 <sup>-3</sup> (4 ГДК)					+

Таблиця 5

Реакція ряски малої (*Lemna minor* L.) на солі важких металів (за Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование, 2007)

Метал	Концентрація, мг/мл	Тестові реакції			Коефіцієнт росту ( <i>r</i> )
		Забарвлення листеців	Роз'єднання листеців	Реакція листеців	
Контроль	0	Інтесивно-зелене	Нема	Нема	3,55
Cd	0,25	Коричневе	Є	Сильне всихання	2,17
Pb	0,25	Світло-буре	Є	Сильне всихання	0,33
Zn	0,25	Світло-зелене, коричневе	Є	Сильне в'янення	0
Ti	0,25	Світло-зелене	Є	Сильне всихання, відпадиння коренів	2,84
Co	0,25	Світло-зелене	Є	Сильне всихання	1,55
Ni	0,25	Темно-коричневе	Є	Сильне всихання	0,60
Mo	0,25	Біле	Нема	Сильне всихання	5,84
Cu	0,25	Біле	Є	Відмирання коренів	0,17
Cr	0,25	Жовто-біле	Нема	Відпадиння коренів, всихання	4,17
B	0,25	Світло-зелене	Нема	Всихання	0,17
V	0,25	Коричневе	Нема	Всихання	0,83
Mn	0,25	Світло-зелене, буре	Нема	Сильне всихання	1,00

Продовження табл. 5

Метал	Концентрація, мг/мл	Тестові реакції			Коефіцієнт росту (r)
		Забарвлення листеців	Роз'єднання листеців	Реакція листеців	
Cd	0,1	Коричневе	Є	Сильне всихання	2,17
Pb	0,1	Жовтувато-зелене	Є	Підсихання зони росту	0,50
Zn	0,1	Темно-буре	Є	Всихання	0,17
Ti	0,1	Зелене	Є	Малопомітне в'янення	4,17
Co	0,1	Світло-зелене	Є	Сильне всихання	1,55
Ni	0,1	Темно-коричневе	Є	Сильне всихання	0,60
Mo	0,1	Біле	Нема	Сильне всихання	5,84
Cu	0,1	Біле	Є	Відмирання коренів	0,17
Cr	0,1	Жовто-біле	Нема	Відпадіння коренів, всихання	4,17
B	0,1	Світло-зелене	Нема	Всихання	0,17
V	0,1	Коричневе	Нема	Всихання	0,83
Mn	0,1	Зелене	Нема	Всихання країв	1,67
Cd	0,025	Світло-зелене	Є	Підсихання	3,33
Pb	0,025	Темно-зелене	Є	Підсихання	1,33



Продовження табл. 5

Метал	Концентрація, мг/мл	Тестові реакції			Коефіцієнт росту (r)
		Забарвлення листеців	Роз'єднання листеців	Реакція листеців	
Zn	0,025	Світло-зелене, крапчасте	Нема	Всихання	0,17
Ti	0,025	Сизо-буре	Нема	Підсихання країв	4,00
Co	0,025	Буре	Є	Всихання	2,34
Ni	0,025	Яскраво-зелене	Є	В'янення	1,17
Mo	0,025	Сизо-біле	Нема	Всихання	2,52
Cu	0,025	Біле	Є	Відмирання коренів	0,17
Cr	0,025	Яскраво-зелене	Нема	Відпадіння коренів, всихання	6,25
B	0,025	Світло-жовте	Нема	В'янення	0,66
V	0,025	Коричневе	Нема	Всихання	0,83
Mn	0,025	Світло-зелене	Нема	В'янення	2,00
Cd	0,001	Біле, крапчасте	Є	В'янення	2,67
Pb	0,001	Коричневе	Нема	В'янення	2,83
Zn	0,001	Світло-коричневе	Нема	В'янення	1,17
Ti	0,001	Зелене, світло- коричневі краї	Нема	В'янення, відпадіння коренів	3,83
Co	0,001	Зелене	Є	В'янення	1,54
Ni	0,001	Світло-зелене	Нема	В'янення, відпадіння коренів	3,00
Mo	0,001	Жовто-зелене	Нема	Підсихання країв	6,03
Cu	0,001	Біле із сизуватим відтінком	Є	Сильне всихання	0,73

Продовження табл. 5

Метал	Концентрація, мг/мл	Тестові реакції			Коефіцієнт росту (r)
		Забарвлення листеців	Роз'єднання листеців	Реакція листеців	
Cr	0,001	Яскраво-зелене	Нема	Підсихання коренів	6,25
B	0,001	Світло-жовте	Нема	В'янення	0,66
V	0,001	Зеленувато-буре	Нема	В'янення	2,00
Mn	0,001	Жовто-зелене	Нема	В'янення незначне	1,87
Cd	0,0001	Блідо-зелене	Нема	Підсихання середини	1,50
Pb	0,0001	Зелене, крапчасте	Нема	В'янення	2,00
Zn	0,0001	Коричнево-зелене	Нема	Листеці зморщені	1,17
Ti	0,0001	Яскраво-зелене	Нема	Легке в'янення	2,83
Co	0,0001	Світло-зелене	Нема	Легке в'янення	2,53
Ni	0,0001	Жовто-зелене	Нема	Всихання країв	1,67
Mo	0,0001	Зелене	Є	Легке в'янення	5,84
Cu	0,0001	Біле із сизуватим відтінком	Є	Сильне всихання	0,73
Cr		Зелене	Нема	В'янення	4,83
B	0,0001	Зелене	Нема	В'янення	1,84
V	0,0001	Світло-зелене	Нема	В'янення	1,33
Mn	0,0001	Жовто-зелене	Нема	Незначне в'янення	1,87

## Лабораторна робота № 6

**Тема:** Вплив солей важких металів на плазмоліз протоплазми рослинної клітини

**Мета:** Дослідити плазмоліз рослинної клітини під дією солей біогенних та небіогенних металів

### Обладнання та матеріали:

1) мікроскоп; 2) предметні та покривні скельця; 3) препарувальні голки; 4) бритви; 5) піпетки на 1-2 мл; 6) стакани з дистильованою водою; 7) фільтрувальний папір; 8) 5%-ні розчини солей  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{HgNO}_3$  та ін.; 9) цибулина синьої цибулі або фіолетові листки традесканції.

Солі важких металів у водному середовищі розпадаються на іони. Всі іони металів можуть бути поділені на дві групи: біогенні ( $\text{Cu}$ ,  $\text{Zn}$ ,  $\text{Co}$ ,  $\text{Mn}$ ,  $\text{Fe}$  та ін.) та небіогенні ( $\text{Pb}$ ,  $\text{Hg}$ ,  $\text{Sn}$ ,  $\text{Ni}$ ,  $\text{Al}$ ,  $\text{Cd}$ ,  $\text{Sr}$ ,  $\text{Cs}$  та ін.). Серед останньої групи іони стронцію та цезію діють як біогенні при заміні у органічних сполуках кальцію на стронцій і калію на цезій. Біогенні іони входять до складу ферментних систем, які забезпечують регуляцію всіх процесів у клітині та організмі. Тому їх ГДК значно вище, ніж у небіогенних. При надходженні у рослини повітряним (крізь продихи) або крапельним (роса, туман, слабкі осаді) шляхами певна доза біогенних важких металів включається до складу ферментних систем, що стимулює метаболічні процеси. Так, купрум входить до складу ферментів, що беруть участь у процесах темнових реакцій фотосинтезу, сприяє поглинанню інших елементів; цинк входить до складу ферментів, що розщеплюють білки, збільшує стійкість рослин до жару, посухи, хворобам. Лише при більш високих концентраціях вони діють як токсиканти.

### Хід роботи

1. З поверхні сильнозабарвленої синьої цибулини зробити декілька зрізів епідемісу, що складається з 1-2 шарів забарвлених клітин, які містять антоціан.
2. Розмістити зрізи окремо в краплі води на предметні скельця, накрити покривними скельцями та розглянути під мікроскопом. Клітини із забарвленим клітинним соком замальовати; знайти та розглянути продихи.
3. Визначити початок і характер плазмолізу клітини під дією однакових концентрацій солей біогенних та небіогенних металів. Для цього воду в препаратах замінити 5%-ним розчином  $\text{CuSO}_4$  (на першому з предметних скелець) та 5%-ним розчином  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  (на другому). Цю заміну здійснити шляхом 4-5-кратного накрапування розчину солі з одного боку покривного скла та відсмоктування шматочком фільтрувального паперу з іншого до повної заміни води розчином солі.

Залишити клітини у розчині солей на 15 хв, коли плазмоліз буде добре помітний, розглянути під мікроскопом. Замалювати.

4. Виявити комплексну дію підвищеної температури та однієї з найбільш токсичних солей. Для цього препарати, у яких вода замінена на розчин солі, витримати 10 хв на водяній бані при температурі 40 °С, а потім розглянути під мікроскопом та замалювати. При цьому часто спостерігається посилення плазмолізу та почорніння вмісту деяких клітин. Ймовірно, солі плюмбуму при реакції із сірководневими групами білків дають цей чорний колір.
5. Узагальнити результати щодо дії солей біогенних та небіогенних металів на характер плазмолізу клітини у висновку.

#### **Контрольні питання**

1. Дайте визначення плазмолізу.
2. Як плазмоліз може бути використаний у біотестуванні?
3. Наведіть методику дослідження плазмолізу за впливу токсикантів.

## Лабораторна робота № 7

**Тема:** Визначення токсичності органічних сполук за ростовими властивостями крес-салату

**Мета:** Навчитись досліджувати токсичність органічних сполук за ростовими властивостями крес-салату

### Обладнання та матеріали

1) стерильні чашки Петрі – 6 шт.; 2) стерильні піпетки – 6 шт.; 3) насіння крес-салату (по 50 насінин на кожен чашку); 4) розчин досліджуваної органічної сполуки; 5) пінцет; 6) лінійка; 7) лезо; 8) аналітичні терези; 9) фільтрувальний папір

### Теоретичні відомості

Крес-салат відрізняється швидким проростанням насіння, майже стовідсотковою схожістю, яка значно зменшується в присутності стресорів, а отже використовується як тест-рослина. Крім того, стебло та корінь цієї рослини під дією стресорів піддаються морфологічним змінам (затримка росту та викривлення стебла, зменшення довжини та маси). Крес-салат для біотестування зручний ще й тим, що дію стресорів можна вивчити одночасно на великій кількості рослин при невеликій площі робочої поверхні, за відносно короткі строки експерименту. Насіння крес-салату проростає вже на 3–4 день. На 3-ю добу визначають енергію проростання насіння, а на 5-у добу – схожість насіння та біометрико-морфометричні показники (довжину та масу надземної частини та корінців).

### Хід роботи

1. Підготувати насіння крес-салату для дослідження. Для цього підрахувати 6 разів по 50 насінин.
2. Розмістити насіння крес-салату в 6-х чашках Петрі на фільтрувальному папері по 50 насінин.
3. Змочити фільтрувальний папір дистильованою водою з додаванням етилового спирту (контроль) та водно-спиртовим розчином відповідної сполуки з концентрацією \_\_\_\_\_ /мл (дослід).
4. Розмістити чашки з насінням в термостаті при температурі 24-25°C. Щодобово насіння зволожувати однаковою кількістю розчинів (за необхідності).
5. Визначити енергію проростання насіння (кількість пророслого насіння на 3-ю добу) та схожість насіння (кількість пророслого насіння на 5-ту добу). Дані занести до таблиці, представляючи їх як середнє арифметичне.
6. Визначити біометричні показники 5-добових проростків крес-салату, у яких виміряти довжину надземної частини і коріння, а також масу 100 проростків. Дані занести до таблиці, представляючи їх як середнє арифметичне.
7. Розрахувати фітотоксичний ефект (ФЕ) за формулою:

$$\Phi E = (L_{\text{контр.}} - L_{\text{досл.}}) \times 100\% / L_{\text{контр.}}$$

де  $L_{\text{контр.}}$  – довжина корінців у контролі,  $L_{\text{досл.}}$  – довжина корінців у досліді. Отримані результати записати у таблицю 6.

8. Для отримання порівнянних результатів за результатами тестування розрахувати індекс токсичності розчину (сполуки, ґрунту, водної витяжки ґрунту тощо) для кожної тест-функції за формулою:  $\text{ІТФ} = (\text{ТФ}_0 / \text{ТФ}_x)$ , де  $\text{ТФ}_0$  – значення зареєстрованого тест-відгуку у досліді;  $\text{ТФ}_x$  – у контролі. Величина ІТФ змінюється від 0 до М, де М – будь яка позитивна величина. Отримані результати записати у таблицю 7.
9. Розрахувати значення індексу токсичності розчину (ґрунту, водної витяжки ґрунту) за формулою:  $\text{ІТФ}_{\text{СЕР}} = (\text{ІТФ}_1 + \text{ІТФ}_2 + \text{ІТФ}_3 + \dots) / n$ , де  $\text{ІТФ}_1, \text{ІТФ}_2, \text{ІТФ}_3$  – індекси токсичності, розраховані для кожної тест-функції;  $n$  – кількість тест-відгуків, задіяних в експерименті для конкретного розчину. Отримані результати записати у таблицю 6.

Таблиця 6

Ростові показники крес-салату як тест-рослини при визначенні токсичності сполуки (розчину, витяжки тощо)

Сполука (розчин)	Енергія проростання			Схожість, %			Довжина надземної частини			Довжин а коріння			Маса 100 проростків			ІТФ <sub>СЕР</sub>
	%	ФЕ, %	ІТФ	%	ФЕ, %	ІТФ	мм	ФЕ, %	ІТФ	мм	ФЕ, %	ІТФ	мг	ФЕ, %	ІТФ	
Контроль																

10. Розрахувати індекс схожості насіння (SGI) та індекс довжини коренів (RLI) за формулами  $SGI = \frac{N_T(i) - N_C}{N_C}$  та  $RLI = \frac{L_T(i) - L_C}{L_C}$ , відповідно, де  $N_T(i)$  та  $N_C$  представляють кількість насіння, що зійшло, у тесті (i) та у контролі, а  $L_T(i)$  та  $L_C$  відносяться до середньої довжини коренів у тесті (i) та у контролі відповідно. Оцінити фітотоксичність за шкалою:

(1) незначна ( $-0,25 \leq SGI$  або  $RLI < 0$ ),  
 (2) помірна ( $-0,5 \leq SGI$  або  $RLI < -0,25$ ),  
 (3) висока ( $-0,75 \leq SGI$  або  $RLI < -0,5$ ) та  
 (4) надзвичайно висока ( $-1 \leq SGI$  або  $RLI < -0,75$ ).

Результати записати у таблицю 7.

Фітотоксичність досліджуваних розчинів (сполук)

Сполука (розчин)	SGI	RLI	Інтерпретація результатів фітотесту	Коментарі

11. Результати узагальнити у висновку щодо токсичності досліджуваних розчинів за ростовими властивостями крес-салату та розрахованими індексами.

#### Контрольні питання

1. Вкажіть переваги крес-салату при його використанні як тест-рослини.
2. Які тест-показники крес-салату використовують у біотестуванні?
3. Як і коли оцінюють енергію проростання та схожість насіння крес-салату?
4. Як визначити фітотоксичний ефект?
5. Як визначити індекс токсичності розчину?
6. Охарактеризуйте токсичність досліджуваних у цій лабораторній роботі розчинів.

## Лабораторна робота №8

**Тема:** Мітотичний індекс та тривалість фаз мітозу як тест-показники дії токсикантів

**Мета:** Навчитись досліджувати мітотичну активність клітин апікальної меристеми цибулі ріпчастої за дії токсикантів.

### Обладнання та матеріали

1) зафіксовані корінці цибулі ріпчастої; 2) ацетофуксин; 3) бюкси, що добре закриваються; 4) 30%-ти та 45%-на оцтова кислота (свіжовиготовлені розчини!!); 5) лід; 6) водяна баня; 6) термометр до 100°C; 7) 1 н HCl; 8) пінцет; 9) чашки Петрі – 5 шт.; 10) 96%-ний етиловий спирт; 11) лезо; 12) предметні скельця; 13) накривні скельця; 14) парафін; 15) спиртівка; 16) сірники; 17) скальпель; 18) фільтрувальний папір; 19) стерильні піпетки на 1 мл – 5 шт.; 20) дистильована вода; 21) сірники із загостреним кінцем

Під мітотичним циклом розуміють сукупність взаємопов'язаних і хронологічно детермінованих подій, що відбуваються у клітині у період підготовки до поділу, а також протягом самого мітозу.

Зараз запропоновано мітотичний цикл розбивати на 4 періоди: власне мітоз (профаза, метафаза, анафаза, телофаза), пресинтетичний період – G1; синтетичний період (синтез ДНК) – S; постсинтетичний період – G2. Три останніх періоди припадають на інтерфазу.

Для того, щоб розрахувати рівень мітотичної активності тканини, розраховують співвідношення числа клітин, що знаходяться у мітозі до загального числа клітин досліджуваної тканини, тобто визначають мітотичний індекс (МІ). МІ виражається в проміллях (‰) – тисячних частках цілого.

При підрахунку кількості клітин, що знаходяться на кожній стадії мітозу, визначається відносна тривалість профазы, метафазы, анафазы, телофазы (у %) до загальної кількості клітин, що діляться.

### Хід роботи

1. Визначити число клітин на різних стадіях мітозу. Підрахунок клітин на різних фазах мітотичного циклу провести у декількох полях зору. Для запобігання потрапляння на одне й те ж поле препарат пересувати послідовно через одне поле зору до іншого, спочатку – зверху вниз до кінця препарату, потім – через одне поле вбік знизу угору і т.д. Дані з підрахунку клітин за полями занести у таблиці 8 та скласти.
2. Визначити мітотичний індекс у контролі та досліді (за дії токсиканта). Мітотичний індекс визначають при підрахунку 1000 клітин.  
$$MI = (P + M + A + T) \times 1000 / \text{всього проглянутих клітин} = \text{‰}$$
Результати занести до таблиці 8.



Визначення мітотичного індексу в меристемі корінця цибулі

Варіант досліджу	Поле зору	Стадія									МІ, %						
		П			М			А				Т			І		
		Число клітин	%		Число клітин	%		Число клітин	%			Число клітин	%			Число клітин	

*Примітка:* І – інтерфаза, П – профаза, М – метафаза, А – анафаза, Т – телофаза.

2. Визначити відносну тривалість фаз мітозу у контролі та досліді:

$$П = П \times 100 / П + М + А + Т = \%$$

$$М = М \times 100 / П + М + А + Т = \%$$

і т.д. Результати занести до таблиці 8.

3. Зробити висновок до роботи, порівнюючи мітотичний індекс та тривалість фаз мітозу у контролі та досліді.

#### Контрольні питання

1. Поясніть принцип використання мітотичної активності клітин апікальної меристеми цибулі ріпчастої у біотестуванні.
2. Як визначити мітотичний індекс?
3. Як визначити тривалість фаз мітозу?
4. Охарактеризуйте токсичність досліджуваних у лабораторній роботі розчинів.

## Лабораторна робота № 9

**Тема:** Хлорофіл у листках тест-рослин як показник несприятливих умов середовища

**Мета:** Навчитись визначати хлорофіл у листках тест-рослин

### Обладнання та матеріали

1) ваги; 2) фотоелектроколориметр - ФЕК; 3) насос Камовського або електричний; 4) колба Бунзена з пробкою і скляним фільтром № 2, № 3; 5) ступки малі з маточками; 6) скляні палички; 7) ножиці; 8) товчене і просіяне скло; 9) мірні колби на 100 і 50 мл; 10) калька; 11) вазелін; 12) фільтрувальний папір; 13) мідний купорос  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ; 14) біхромат калію  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ; 15) 7% -ний розчин аміаку; 16) листя рослин-індикаторів, зібрані в «забрудненій» і «чистій» зонах.

### Теоретичні відомості

Використання кількості хлорофілу (та інших пігментів) як біоіндикаційних ознак в сучасній літературі дискутується. Дехто вважає цю ознаку недостатньо інформативною і специфічною (Биоиндикация загрязнений... 1988), хоча руйнування хлорофілу під впливом несприятливих факторів є першою стадією видимих хлорозів листків. Інші дослідники показали, що досить надійною неспецифічною біоіндикаційною ознакою у чутливих до забруднення видів (липи, клена) є зниження вмісту хлорофілу ще до появи видимих змін.

Неспецифічність цього індикатора полягає в тому, що нестача в ґрунті Нітрогену, а також Феруму та інших елементів, швидко позначається на забарвленні листя в результаті руйнування хлорофілу в ньому. Отже, цю ознаку часто використовують для оцінки низької родючості ґрунтів. При біоіндикації його слід враховувати і використовувати в поєднанні з іншими ознаками.

Для оцінки ступеня забруднення наземних екосистем або їх складових листя слід збирати з середньої частини крони в першій половині вегетації, враховуючи умови зростання (освітленість, мінеральне живлення, обводненість та ін.). Як біоіндикатори міського середовища рекомендують використовувати липу дрібнолисту, клен платанолістий, каштан кінський, ялину звичайну, сосну звичайну (газочутливі види).

Для навчальної роботи можна використовувати і кімнатні рослини, які спеціально вирощують в посудинах на гумусному ґрунті з поливом водою (контроль) і на малородючому ґрунті з поливом розчином солі будь-якого важкого металу (дослід).

Метод заснований на вилученні хлорофілу з листя розчинниками (спирт, ацетон) і визначенні його кількості на фотоелектроколориметрі або спектрофотометрі. Якщо колба Бунзена, скляні фільтри і насос відсутні, витяжку хлорофіла можна центрифугувати.

Визначення хлорофілу в листках проводять на свіжому або фіксованому матеріалі. Фіксацію здійснюють текучою парою (5 хв) або сухим жаром (при 105 °С протягом 5-10 хв).

Для збереження хлорофілу Годнев Т.Н. у 1963 році запропонував наступний спосіб фіксації: листя нарізають дрібними шматочками, загортають в марлю і занурюють у киплячий насичений розчин кухонної солі на 1-2 хвилини для зневоднення матеріалу та втрати ферментами активності. Потім матеріал промивають під протоком води протягом 0,5 хвилини, струшують для видалення вологи. Далі висушують у затінку не менше 2-х діб або в термостаті при температурі не вище 40 °С. Шлик Н.А. (1971) вважав, що найкращі результати дає поєднання фіксації матеріалу гарячою парою (2 хв) з проведенням можливо швидкої екстракції на холоді.

### Хід роботи

1. Підготувати наважку матеріалу для дослідження. При роботі з сухим матеріалом беруть наважку 0,5-1 г, зі свіжим - 1-2 г. Попередньо визначити вологість листя.
2. Наважку рослинного матеріалу (виключаючи жилки) ретельно подрібнити у фарфоровій ступці з битим склом, додаючи крейду або вуглекислий магній.
3. Вилучити хлорофіл: із сухого матеріалу 90%-ним спиртом або 80-85%-ним ацетоном, а зі свіжого - 96-98%-ним спиртом або абсолютним ацетоном. Для початку цього процесу до розтертого рослинного матеріалу додати трохи розчинника і матеріал продовжити розтирати разом з розчинником.
4. Укріпити скляний фільтр № 2 або № 3 у колбі Бунзена в отворі пробки (діаметр фільтра повинен відповідати кількості досліджуваного матеріалу). Колбу з'єднати з насосом і здійснити відсмоктування рідини. Рідину зі ступки злити по скляній паличці у воронку-фільтр, попередньо змастивши вазеліном зовні носик ступки. У ступку долити 4-5 мл розчинника і знову розтирати протягом хвилини, потім знову злити у воронку. Цю маніпуляцію повторити 2-3 рази, потім перенести на фільтр всю розтерту масу, ущільнити її паличкою і відсмоктати. Ступку ополіснути кілька разів розчинником, виливаючи його на ущільнений матеріал у воронку, де дати йому постояти 2-3 хвилини, після чого відсмоктати. Промивання здійснювати до тих пір, поки розчин, що стікає, не стане безбарвним. Потім екстракт перенести в мірну колбу на 50 мл, споліскуючи кілька разів бунзенівську колбу і виливаючи в мірну. Витяжку довести до риски розчинником.
5. Здійснити колориметрування розчину на фотоелектроколориметрі з червоним світлофільтром. Якщо рідина забарвлена в інтенсивно зелений колір, її розбавити, оскільки при великих концентраціях величини на ФЕК можуть виходити за межі роздільної здатності приладу.
6. Для перерахунку хлорофілу на стандартні величини скоритатися розчином Гетрі, який готується наступним чином: 1) 1%-ний розчин  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  (беруть тільки сині кристали), 2) 2%-ний розчин  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , 3) 7%-ний розчин аміаку (на 7 мл 18%-ного аміаку треба взяти 11 мл води). Для виготовлення стандарту в мірну колбу ємністю 100 мл точно відміряти розчини ( $\text{CuSO}_4 \times$

5H<sub>2</sub>O - 28,5 мл, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> - 50 мл, NH<sub>4</sub>OH - 19 мл), довести дистильованою водою до мітки і перемішати. Розчин Гетрі за забарвленням колориметрично еквівалентний розчину кристалічного хлорофілу за вмісту останнього 85 г в літрі.

7. Приготувати розведення стандартного розчину (від 0,085 до 7,65 мг/л) та побудувати калібрувальну криву: по вісі абсцис відкласти вміст хлорофілу (мг/л), а по вісі ординат - оптичну щільність. Калібрувальну криву побудувати від концентрації 0,085 мг/л (1 мл вихідного розчину і 99 мл води) до 7,65 мг/л (90 мл вихідного розчину і 10 мл води).

8. Виміряти на ФЕК оптичну щільність досліджуваних розчинів декілька разів та обчислити середнє. За отриманими даними визначити концентрацію хлорофілу у дослідних зразках за калібрувальною кривою.

9. Розрахувати кількість хлорофілу в мг/г листків (за сирою чи сухою масою). У насадженнях сосни воно коливається від 0,08 до 0,14 мг/г. Можна також виразити кількість хлорофілу у відсотках (0,3-1,3% абсолютно сухої маси листка). Результати занести до таблиці 9.

Таблиця 9

Вміст хлорофілу у листі рослин-індикаторів

Дослід	Наважка, мг	Об'єм витяжки, мл	Показання ФЕК	Кількість хлорофілу за калібрувальною кривою, мг/50 мл	Вміст хлорофіл у у листі	
					мг/г	%

10. Зробити висновок до роботи.

#### Контрольні питання

1. Охарактеризуйте вміст хлорофілу як показника несприятливих умов середовища.
2. Наведіть процес вилучення хлорофілу з листя.
3. Поясніть, що являє собою розчин Гетрі.
4. Поясніть з якою метою розчин Гетрі може бути використаний у біотестуванні.
5. Поясніть, чи вміст хлорофілу виявився індикатором забруднення у проведеному вами дослідженні.

## Лабораторна робота №10

**Тема:** Біотестування токсикантів з використанням дафній

**Мета:** Навчитись здійснювати біотестування токсикантів з використанням дафній

### Матеріали та обладнання

- 1) мікроскоп МБС-10;
- 2) колба з культурою водоростей;
- 3) мікрокомпресор (для продування повітря в колбі з культурою водоростей);
- 4) 12 стаканів хімічних на 0,2 л;
- 5) кристалізатор на 2-5,0 л для культивування дафній;
- 6) піпетка автоматична на 1, 10 мл;
- 7) розчин  $\text{CuCl}_2$ .

### Теоретичні відомості

Метод біотестування з використанням дафній широко застосовується для визначення токсичності хімічних сполук, стічних вод, а також стану природних вод. Дафнії як обов'язковий тест-об'єкт включено в схему встановлення ГДК речовин-забруднювачів та стічних вод.

Рід *Daphnia* (клас *Crustacea*, ряд *Cladocera*) широко поширений і включає 50 видів. У прісноводних водоймах поширеними видами є *Daphnia magna straus*, *D. pulex* De Oeer, *D. longispina* O.F. Müller.

Застосуванню в токсикологічних експериментах надається перевага рачкам виду *D. magna*, які мають більші розміри (рис. 4). Цей вид є типовим бета-мезосапробом і переносить засолення до 6%.

Оскільки тварини мають короткий біологічний цикл розвитку, це дозволяє простежити ріст і розвиток дафній на всіх життєвих стадіях.

Розмір новонародженої молоді 0,7-0,9 мм в довжину. До моменту статевої зрілості самки досягають розмірів 2,2-2,4 мм (максимальна довжина тіла може сягати до 6,0 мм), а самці 2,0-2,1 мм.

В лабораторії за сприятливих умов дафнії більшу частину року розмножуються партеногенетично (без запліднення), народжуючи потомство, що складається із самок.

При температурі  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  і гарному харчуванні період дозрівання рачків становить 5-8 днів. Ембріональний розвиток триває зазвичай 3-4 дні, а при підвищенні температури до  $25^\circ\text{C}$  - 46 год. Після закінчення цього часу відбувається вимет молоді. Партеногенетичні покоління слідує одне за іншим кожні 3-4 дні. Число яєць в кладці спочатку 10-15, потім до 30-40 і більше. Формування яєць припиняється за 2-3 дня до смерті.

У природі дафнії живуть в середньому 20-25 днів, а в лабораторії при оптимальному режимі - 3-4 місяці і більше. При температурах понад  $25^\circ\text{C}$  тривалість життя дафнії може скоротитися до 25 днів.

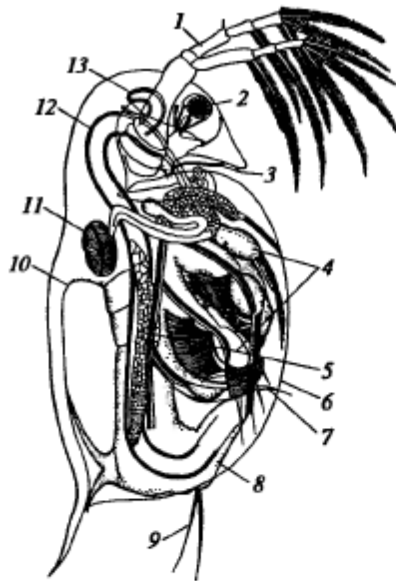


Рис.4. Будова *D. magna straus* (самка) (за Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование, 2007): 1 - антена; 2 - складне око; 3 - антенула; 4 - грудні ніжки; 5 - яєчник; 6 - стулки панцира; 7 - каудальні кігті; 8 - постабдомен; 9 - хвостові щетинки; 10 - вивідкова камера; 11 - серце; 12 - кишківник; 13 - печінкові вирости

У якості їжі для розвитку дафній оптимальною є концентрація водоростей 0,7-1 млн кл/л.

Дафнії стійкі до зміни кисневого режиму (до 2 мг O<sub>2</sub> на літр), оскільки здатні синтезувати гемоглобін. За зниженої концентрації розчиненого кисню дафнії набувають червонуватого кольору, в той час як у сприятливих умовах вони рожево-жовті.

Не дозволяється проводити роботу з дафніями в приміщенні, де використовуються хімічні леткі речовини. Навіть обробка приміщення хлор- і фосфорорганічними пестицидами для боротьби з комахами неприпустима.

Стійкі умови культивування можна забезпечити в заklenій шафі-термолінійності з розсувними передніми скельцями та рядом полиць для посудин. У шафі монтується лампа денного світла, що забезпечують освітленість близько 400-600 лк протягом 10-12 год на добу. У шафу може бути вбудований обігрівач з контактним термометром, що забезпечує температуру 20±2 °C.

Для культивування дафній використовують відстояну водопровідну воду. Межі основних гідрохімічних показників води, яка використовується для культивування дафній: рН 7,0-8,2; вміст кисню 6-8 мг O<sub>2</sub>/л; окиснюваність за Кубелем 4,2- 5,8 O<sub>2</sub> мг/л; загальна жорсткість 3,0-6,5 мг х екв/л (200 ± 50 мг CaCO<sub>3</sub>/л); співвідношення Ca/Mg 4:1; NH<sub>4</sub>NO<sub>2</sub> - сліди (тисячні частки міліграм N/л).

Як корм можуть служити зелені протококові водорості, вирощувані на середовищі Тамія.

Вихідна концентрація водоростей повинна бути близько 2 млн кл./л. За оптимальних умов культура досягає максимальної щільності через 7-10 днів зростання. Для годування дафній водорості відокремлюють від поживного середовища центрифугуванням або 2-3-добовим відстоюванням в холодильнику. Осад розбавляють дистильованою водою в 2 рази. Суспензію

можна зберігати в холодильнику протягом 14 днів, але не більше, оскільки старі клітини виділяють хлорелін, який пригнічує розвиток дафній. Годування дафній проводять 1 раз в день з розрахунку 1 мл суспензії (щільність 600 - 1000 млн кл./мл) на 1 л води. Один або два рази на тиждень дафній можна підгодовувати пекарськими або кормовими дріжджами з розрахунку 3 мл 1%-ної суспензії на 1 л культурального середовища.

Дафній культивують в скляних кристалізаторах об'ємом 2-5 л. Щільність посадки має бути не більше 25 особин на 1 л води.

Переносити дафній зручно автоматичною піпеткою із зрізаною вузькою частиною накінечника. Воду в кристалізаторах слід оновлювати на 50% один раз на 7-10 днів. Осад, що накопичується, видаляють сифоном. Аерація середовища в кристалізаторі не проводять.

У токсикологічних дослідженнях використовують дафній, починаючи з другого покоління. З метою зниження варіабельності досліди проводять на синхронізованій культурі з використанням дафній одного віку. Для отримання такої синхронізованої культури 3-5 статевозрілих самок розсаджують по одній в хімічні склянки (100 мл води). Після появи першого посліду у найбільш плідної самки молодь відбирають і поміщають в 1-2-літровий кристалізатор для подальшого культивування. Молодь другого покоління з одного посліду у віці 1-2 доби використовують в досліді.

Для глибокого, детального дослідження властивостей природних, стічних вод і окремих речовин використовують хронічний дослід з дафніями, який триває до 30 діб. Умови проведення хронічних дослідів аналогічні описаним вище гострим дослідом: постійний температурний, світловий режим, щоденне внесення корму - водорості хлорела (600 - 700 тис. кл./мл). Зміну розчинів проводять 2-3 рази у тиждень зі збереженням співвідношення 50 мл розчину на одну дафнію. Значення біологічних характеристик дафній в токсикологічних дослідях порівнюють з контрольними.

При проведенні дослідів на поколіннях слід дотримуватися наступної схеми: молодь з першого посліду, що з'явилася у вихідних особин в дослідних і контрольних розчинах, відсаджують по 10 шт. в стакани ємністю 500 мл з відповідними розведеннями стічних вод або концентраціями досліджуваних речовин. При спостереженні за розмноженням рачків звертають увагу на час настання статевозрілості в днях, реєстрований за моментом відкладання яєць у вивідкову камеру, час народження першого посліду з урахуванням виходу молоді з вивідкової камери, число послідів за термін спостереження, загальну кількість молоді, що народилася, абортивних яєць, мертвонародженої і потворної молоді. Молодь прораховують і видаляють. Тривалість дослідів з кожним поколінням 30 діб. Досліджується не менше трьох поколінь. Результати записуються до табл. 10.

Загальна кількість молоді, що народилася життєздатною від однієї самки за 30 діб відображає величину реальної (фактичної) плодючості дафній. Ця величина в кінцевому підсумку визначає збереження виду і має вирішальну роль при оцінці токсичності води.

## Зміна біологічних показників у дафній

Дата	Тривалість, доби	Контроль					
		Вихідні, покоління 1, 2 та ін.					
		кіль- сть дафній	карапакси	молодь	абортивні яйця	мертві	ефіппії
	1						
	30						
Всього							
Дата	Тривалість, доби	У досліджуваних зразках природних вод або із солями Купруму					
		Вихідні, покоління 1, 2 та ін.					
		кіль- сть дафній	карапакси	молодь	абортивні яйця	мертві	ефіппії
	1						
	30						
Всього							

Для наочності будують графіки виживання, плодючості (по осі абсцис відкладають час або покоління, а по осі ординат - величину показника для контрольних і дослідних розчинів).

Принцип запропонованого в лабораторній роботі методу базується на зміні виживання і фізіологічного стану дафній в середовищі з токсикантами.

**Хід роботи**

1. Приготувати розчин  $\text{CuCl}_2$  за концентрації 10, 1, 0,1 ГДК (див. Додаток).
2. У 9 склянок налити по 200 мл розчинів досліджуваних концентрацій (кожна в трьох повторностях) і внести по 10 дафній. В останні 3 склянки налити 200 мл водопровідної води і також внести по 10 дафній (контроль).
3. Поспостерігати за виживанням дафній (їх виживання у короткочасних дослідах є основним показником токсичності середовища). Звертати увагу на виживання кожної хвилини протягом першої години дії розчину, через кожні 15 хв протягом другої години, потім через 24 год, 48 год, 96 год. Час загибелі рачків відзначити за настанням нерухомості (іммобілізації): дафнії лежать на дні склянки, плавальні руху відсутні і не поновлюються при погойдуванні склянки. Отримані дані щодо виживання рачків в часі занести до таблиці 11.  
**Увага!** Загибель контрольних дафній в період експерименту не повинна перевищувати 10%. Якщо більше 10% - дослід повторюють знову.



Вживання дафній у зразках води (шт.)

Тривалість експозиції	Контроль		Зразки води з токсикантом								
	повторності		повторності		повторності		повторності		повторності		

4. Врахувати фізіологічні показники дафній в гострому досліді в якості додаткових показників (табл. 12). Зміни фізіологічних показників нерідко передують загибелі тварин. Це дозволяє використовувати їх для ранньої діагностики.

**Увага!** Оцінка фізіологічних показників у дафній, тестованих у воді з природних джерел, проводиться за бальною системою (Табл. 13). За табл. 14 можна приблизно визначити концентрацію Cu у воді в міліграмах на літр.

Таблиця 12

Індикаторні реакції дафній на забруднення (за Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование, 2007)

Тварина	Індикаторні реакції
Дафнії	Посилення або пригнічення рухової активності; викиди ембріонів; інтенсивні виділення, які коагулюють, і рачки разом з ембріонами і молоддю заплутуються в нитках виділень. Помутніння, зміна забарвлення, знебарвлення; розкладання жирових крапель; нерівномірне заповнення або порожній кишечник; забивання фільтраційного апарату; загибель яєць у вивідковій камері. Судомні конвульсії, уповільнення руху антен, загибель. Втрата у мертвих дафній пігменту. Хронічна реакція: здрибніння, народження мертвої молоді, зниження виживаності

Таблиця 13

Визначення ступеня забруднення водойми за станом дафній (за Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование, 2007)

Зона забруднення	Індикаційні зміни у дафній
1-а – сильне забруднення (наближена до джерела забруднення)	Часткова загибель особин, особини тримаються в природному шарі, частина втрачає активність, спостерігаються випадки «вертячки». Відмічається осад на антенах, забиті фільтраційні апарати. Особини, що гинуть, мають рожеве дифузне забарвлення
2-а – середнє забруднення	Підвищення активності змінюється пригніченням, дафнії періодично залягають на дно, особини мають порожній кишечник, каламутно-жовте забарвлення, серцебиття ослаблені, відсутні жирові краплі
3-я – слабке забруднення (Віддалена від джерела)	Наявність підвищеної активності у окремих особин, у решти - періоди активності змінюються нормальним станом; кишечник слабо наповнений

Реакції біотестів на присутність токсикантів (за Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование, 2007)

Концентрація Су, мг/л води	Індикаторні зміни у гідробіонтів
До 0,2	Личинки волохокрильців не будують будиночків або їх структура відрізняється від таких у контрольних особин. У дорослих комах, що літають, відзначається недорозвинення крил, крововилив у основу крил
0,25	Спостерігається знебарвлення тіла у молоді другого покоління дафній при їх культивуванні в цій воді
0,5	Знебарвлення тіла дафній, жирові краплі відсутні
0,8	У личинок хірономід руйнується гемоглобін, і вони набувають зеленого забарвлення. Порушується травлення і випадає дистальна частина кишечника
Вище 0,8	Личинки комарів впадають в заціпеніння, близьке до паралічу. У дафній різко підвищується активність та порушується координація рухів

5. За результатами дослідів визначити середню (медіанну) летальну концентрацію речовини ( $LK_m$ ), що викликає загибель 50% піддослідних тварин за 96 год ( $LK_{50}$ ), концентрацію речовини, за якої гинуть всі тварини ( $LK_{100}$ ), порогову концентрацію (мінімальнодіючу), при якій організми НЕ гинуть ( $LK_0$ ), і середній (медіанний) час виживання 50% особин ( $ЛВ_{50}$ ).

6. Здійснити порівняння показників піддослідних і контрольних дафній. Для визначення достовірності відхилення від контролю використати стандартні методи варіаційної статистики.

7. Зробити висновок до роботи.

#### Контрольні питання

1. Якому виду дафній надається перевага у біотестуванні і чому?
2. Наведіть умови, за яких слід утримувати дафній.
3. Вкажіть вимоги до годування дафній.
4. Охарактеризуйте хронічний дослід з дафніями.
5. Які тест-показники дафній використано у лабораторній роботі?
6. За яких умов результати дослідження не враховуються і експеримент повторюють?

## Лабораторна робота № 11

**Тема:** Дослідження параметрів вродженого імунітету риб у відповідь на несприятливий вплив за реакцією гемаглютинації.

**Мета:** Навчитись досліджувати параметри вродженого імунітету риб у відповідь на несприятливий вплив за реакцією гемаглютинації

### Обладнання та матеріали

- 1) суспензія еритроцитів людини (ЕЛ) або еритроцитів барана (ЕБ);
- 2) гемолімфа мідій або перивісцеральна рідина морських зірок;
- 3) фізіологічний розчин; 4) морська вода; 5) стандартні піпетки або мікротитратор Такачі; 6) камера Горяєва; 7) скляна пробірка; 8) водяна баня;
- 9) центрифуга; 10) планшет круглодонний 96-лунковий.

### Теоретичні відомості

Принцип реакції гемаглютинації (РГА) полягає в тому, що при взаємодії еритроцитів і гемаглютиніну в досліджуваній рідині відбувається склеювання еритроцитів, в цьому випадку можлива напівкількісна оцінка концентрації аглютинінів. За результатами РГА роблять висновок про присутність в досліджуваній рідині антитіл проти поверхневих антигенів еритроцитів і говорять про титр антитіл. Титр антитіл - це останнє розведення досліджуваної рідини, при якому еритроцити склеюються. Реакція високочутлива і дозволяє визначити наявність антитіл за концентрації 0,001 мкг/мл. Часто застосовують модифікації РГА, наприклад пасивну РГА, коли еритроцити обробляють таніновою кислотою і навантажують антигеном, проти якого слід виявити антитіла, тобто еритроцити використовують як індикатор.

У лабораторній роботі представлений мікрометод РГА для дослідження гемолімфи і перивісцеральної рідини безхребетних тварин, однак і при дослідженні сироватки крові хребетних тварин, наприклад риб, хід роботи аналогічний. У безхребетних гемаглютинуюча активність перивісцеральної рідини, як і при дослідженні сироватки крові хребетних, є непрямим показником імунного статусу організму.

Мірою гемаглютинуючої активності досліджуваного зразка біологічної рідини є останнє розведення, у якому виявлено гемаглютинацію. Слід враховувати, що реакція гемаглютинації напівкількісна і вірна оцінка її результатів потребує навичок.

Використовувати реакцію гемаглютинації можна у польових умовах, порівнюючи тварин, які мешкають у природних незабруднених районах (контрольна група) і місцях, які піддаються будь-яким антропогенним впливам (дослідна група). Після антигенної стимуляції, досліджуючи сироватку або целомічну рідину на наявність аглютинінів, можна з впевненістю констатувати збільшення напруженості імунітету у дослідних груп, тоді як контрольні групи демонструють норму реакції.

Як об'єкти використовуються представники масових видів безхребетних тварин (молюски та морські зірки) і нижчих хребетних тварин (морські та прісноводні риби), що відносяться до різних систематичних груп і відрізняються способом життя. Їх вилов проводять відповідно до правил, наведених нижче. У безхребетних на відміну від хребетних тварин в основному виражені реакції вродженого імунітету, найважливішу роль в якому відіграють амебоцити або гемоцити. У риб вперше в еволюції виявляються антитіла – гуморальні фактори набутого імунітету, синтезовані клітинами лімфоїдної лінії диференціювання.

Звичайна їстівна мідія (*Mytilus edulis* L.) - один з найбільш поширених видів двостулкових молюсків, в якому виділяються екологічні та фізіологічні раси. Мідії є донними біофільтраторами, крізь які проходять дуже великі об'єми води. При температурі близько 20 °С одна мідія довжиною 5-6 см може профільтрувати близько 3 л води за годину. У порожнину тіла при фільтрації води можуть потрапити не тільки харчові об'єкти, але і патогенні організми - найпростіші і бактерії.

Морські зірки ведуть хижий спосіб життя. Характерний представник цієї групи тварин - морська зірка *Asterias rubens* L.

#### **Відловлювання та утримання тварин**

Дослідження імунозахисних реакцій тварин не рекомендується проводити в період нересту. Вилов тварин (мідій, морських зірок, морських риб, прісноводних двостулкових молюсків) слід проводити в день обстеження в екологічно чистих (контроль) і схильних до забруднення (дослід) місцях проживання. Спійманих тварин потрібно перевозити в ємностях з морською (або річковою) водою. У кожен експериментальну групу включають рівне число повноцінних здорових особин приблизно рівної ваги і розміру. До постановки експериментів тварин утримують в умовах, максимально наближених до природних умов проживання: кожен групу тварин поміщують в окремий садок з діаметром комірок 0,5 см, ретельно зав'язують і опускають у водойму на глибину 2-5 м, прив'язуючи мотузкою до плавучого причалу. Довжину мотузки вибирають з урахуванням можливого найбільшого підйому води під час припливу, так щоб садок не відривався від дна (для морських зірок) або вільно висів (для мідій та риб). Тварин не рекомендують розміщувати в місцях, схильних до антропогенного забруднення. Необхідно вести протокол спостережень, в якому вказується, де вилвлені тварини, як довго і в яких кліматичних умовах вони містилися до обробки (температура і солоність води, розклад припливів і відпливів, температура повітря, атмосферний тиск і т.п.), стан експериментальних тварин. Прісноводних риб (райдужну форель) розміщують у відкритих садках невеликими групами. При цьому необхідно суворо дотримуватися температурного режиму.

Протягом нетривалого часу допускається утримання тварин за лабораторних умов. Однак слід враховувати, що водні тварини дуже чутливі до погіршення умов середовища проживання, і тому під час проведення експериментальних робіт необхідно дотримуватися ряду вимог: міняти воду

в акваріумі не рідше 1 разу на добу, збагачувати воду киснем, температура в приміщенні не повинна перевищувати 10°C, не допускається поміщати в один акваріум тварин з різних експериментальних груп, не можна утримувати морських зірок і риб на повітрі довше 10-15 хв. Працювати слід тільки в гумових рукавичках, щоб уникнути стресового впливу на холоднокровних тварин.

#### Хід роботи

1. Центрифугувати гемолімфу або перивісцеральну рідину при 5000 g протягом 10 хв для осадження клітин.
2. Перелити в пробірку супернатант (обережно, щоб не пошкодити осад).
3. Нагріти рідину на водяній бані при 56°C протягом 30 хв для руйнування лізинів.
4. Титрувати оброблену таким чином гемолімфу або перивісцеральну рідину методом двократних розведень у круглодонному 96-лунковому планшеті, використовуючи мікротитратор Такачі. Для цього, починаючи з другої лунки, в горизонтальні ряди планшета внести по 50 мкл фізіологічного розчину (рис. 5). Потім по 50 мкл досліджуваної рідини додати в перші дві лунки. Рідину 2-ї лунки добре перемішати і 50 мкл перенести в 3-ю лунку, потім рідину в 3-й лунці добре перемішати і 50 мкл перенести в 4-у лунку і т.д. В останню, 12-ту лунку НЕ додавати рідину з попередньої лунки - це контроль. В результаті вищеописаних маніпуляцій кожна лунка планшета повинна містити 50 мкл рідини, причому перша лунка кожного ряду - відповідний нерозведений зразок, друга - зразок, розведений вдвічі, третя - вчетверо і так далі, до передостанньої лунки. Остання лунка кожного рядка, що використовується в якості контрольної, повинна містити фізіологічний розчин.

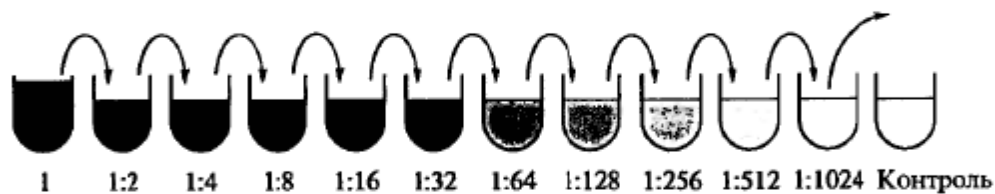


Рис. 5. Титрування гемолімфи (за Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование, 2007)

5. Отримати суспензію еритроцитів у викладача для постановки РГА, відмити їх фізіологічним розчином, центрифугуючи при 5000 g протягом 5 хв, супернатант злити. Якщо еритроцити добре відмиті, супернатант після їх осадження практично безбарвний.

**Увага!** ЕЛ слід зберігати в консерванті (в співвідношенні 1 частина консерванту на 5 частин еритроцитів) під ватною пробкою при 4°C. Концентрація осаду близько 10 млрд клітин в 1 мл.

6. Розвести отриманий осад фізіологічним розчином з таким розрахунком, щоб в результаті була 3-5%-на суспензія еритроцитів. Зазвичай на планшет досить 5-6 мл 5%-ної суспензії еритроцитів.

7. Додати по стандартній краплі (25 мкл) 5%-ної суспензії еритроцитів у кожен лунку планшета.

**Увага!** Суспензію еритроцитів необхідно постійно перемішувати, не допускаючи осадження клітин.

8. Перемішати вміст лунок легкими коловими рухами планшета в горизонтальній площині, після чого планшет накрити листком паперу або фольги і залишити за кімнатної температури на 6-8 год. Протягом періоду інкубації еритроцити осаджуються на дно лунки. Аглютиновані еритроцити не можуть зібратися на дні лунки, на чому базується візуальний облік результатів реакції.

**Увага!** Категорично заборонено струшувати планшет під час інкубації, оскільки це може спотворити результати реакції.

9. Після інкубації провести облік результатів за системою «чотири хрести» (табл. 15). Для більш точної оцінки результатів реакції користуються бінокулярним мікроскопом.

Таблиця 15

Шкала оцінки результатів реакції гемаглютинації

Візуальні ознаки	Оцінка
Еритроцити груповані у вигляді чіткої крапки на дні лунки	–
Еритроцити згруповані у вигляді крапки з розмитими краями на дні лунки	+
Еритроцити утворюють невелике коло на дні лунки	++
Еритроцити розподілені по лунці, утворюючи сітку	+++
Еритроцити рівномірно розподілені по лунці, утворюючи «парасольку»	++++

10. Проаналізувати отримані дані, починаючи з контролю. Якщо еритроцити зовсім або частково не осіли на дно лунки, а рідина в ній забарвилася у бурувато-рожевий колір, то мова піде про повний або частковий лізис еритроцитів (гемоліз). Гемоліз, а також явища гемаглютинації в контрольних лунках вказує на експериментальну помилку, погану якість суспензії еритроцитів або реактивів. У цьому випадку експеримент повторюють.

11. При отриманні «чистих» негативних результатів у контролі, проаналізувати результати у інших лунках, співставляючи їх з контрольними. Результати занести до таблиці 16.

Таблиця 16

Результати РГА

Варіант досліджу	Розведення сироватки											
	1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	К

12. Зробити висновок до роботи.

### **Контрольні питання**

1. Поясніть які зміни імунного статусу організму можуть бути тест-показником у біотестуванні.
2. Поясніть сутність реакції гемаглютинації з метою біотестування токсикантів.
3. Які тварини частіше за все використовуються у біотестуванні токсикантів за реакцією гемаглютинації?
4. Наведіть шкалу оцінки результатів реакції гемаглютинації.

## Лабораторна робота № 12

**Тема:** Визначення токсичності органічних сполук за розмноженням бактерій диско-дифузійним методом

**Мета:** Навчитись визначати токсичність органічних сполук за розмноженням бактерій диско-дифузійним методом

### Обладнання та матеріали

1) стерильні чашки Петрі – 7 шт.; 2) стерильні піпетки на 1 мл – 7 шт.; 3) МПА; 4) добова культура ґрунтових бактерій; 5) диски з фільтрувального паперу; 6) флакони з-під пеніциліну – 6 шт.; 7) спиртові розчини органічних речовин (0,5, 1,0 та 2,0%); 8) пінцет; 9) термостат; 10) одноразові шприці на 1 мл – 4 шт.; 11) стерильна водопровідна вода; 12) стерильні пробірки – 3 шт.; 13) стандарт каламутності 0,5 МакФарланд

### Теоретичні відомості

Метод дифузії у агар є якісним тестом, що дозволяє проводити скринінгові дослідження для оцінки токсичності хімічних речовин.

Існує 2 модифікації непрямих контактних випробувань - метод дифузії з використанням лунок та метод дифузії з використанням диска.

**Метод дифузії у агар з використанням лунок:** Під час випробування хімічний розчин вводять у лунки агарового середовища, що містить концентрацію досліджуваного штаму.

**Метод дифузії у агар з використанням диска з фільтрувального паперу:** У цьому випробуванні на поверхню агарової пластинки, попередньо засіяної стандартною кількістю досліджуваного тест-мікроорганізму, розміщується ряд невеликих стерильних фільтрувальних дисків однакового розміру (6 мм). Пластинку інюкують рівномірними, близькими смугами, щоб переконатися, що зростання мікробів буде зливатися і рівномірно розподілятися по всій поверхні пластини. Агарове середовище має бути належним чином збагачене для підтримки росту досліджуваного організму. За допомогою дозатора для дисків або стерильним пінцетом диски розміщуються рівномірним масивом на чашці на добре розташованих інтервалах один від одного. Коли диски міцно контактують з агаром, антимікробні агенти дифундують у середовище і контактують з організмами, які розмножуються.

Час та температура інкубації визначаються оптимальними умовами для досліджуваного тест-мікроорганізму.

Після інкубації чашки досліджують на наявність зон пригнічення росту бактерій (чисті кільця) навколо антимікробних дисків. Якщо немає інгібування, зростання поширюється до краю диска з усіх боків, і організм повідомляється як стійкий (R) до антимікробного агента на цьому диску. Якщо зона гальмування оточує диск, організм автоматично не вважається несприйнятливим (S) до тестуваного препарату. Спочатку потрібно виміряти діаметр зони (у міліметрах). Розмір зони інгібування залежить від ряду



факторів, включаючи швидкість дифузії даного засобу в середовищі, ступінь сприйнятливості організму до препарату, кількості мікроорганізмів, їх швидкості зростання. Тому важливо, щоб випробування було виконано повністю стандартизовано, щоб значення давали точну інтерпретацію сприйнятливості чи опору. У деяких випадках організм не можна класифікувати як сприйнятливий або стійкий, а трактується як “проміжна” або “невизначена” (I) сприйнятливості до певного препарату. Коли буде отримана інтерпретація I, можуть знадобитися додаткові тести для більш точної оцінки сприйнятливості організму.

### Хід роботи

1. На кожній кришці чашок Петрі зазначити дату проведення досліду та, відповідно, назву (номер) досліджуваної на токсичність речовини (3 чашки для однієї сполуки,  $n=3$ ) або контроль (1 чашка).
2. Приготувати суспензію клітин бактерій  $1,5 \times 10^8$  КУО/мл. Для цього краплю добової культури мікроорганізмів перенести у прозору стерильну пробірку зі стерильною водопровідною водою. Пробірку збовтати і її каламутність порівняти зі стандартом 0,5 МакФарланд (який попередньо струсити) на фоні темного поля з білими поздовжніми смужками. Якщо пробірка прозоріша за стандарт, то додати бактеріальну суспензію, якщо більш каламутна – стерильну воду. Для дослідження використати суспензію клітин  $10^8$  клітин/мл (за стандартом каламутності 0,5 МакФарланда). Після досягнення однакової каламутності зі стандартом каламутності концентрація мікроорганізмів становить приблизно  $1,5 \times 10^8$  КУО/мл.
3. Перенести асептично 1 мл суспензії з кількістю  $1,5 \times 10^8$  колонієутворюючих одиниць/мл (КУО/мл) в 9 мл стерильної водопровідної води у пробірці. Одержана концентрація клітин  $1,5 \times 10^7$  КУО/мл.
4. В умовах стерильності в кожену чашку внести піпеткою по 1 мл культури з концентрацією клітин  $1,5 \times 10^7$  КУО/мл.
5. Налити розплавлене та охолоджене до  $45-50^\circ\text{C}$  щільне поживне середовище в чашки, перемішати з бактеріями і дати час застигнути. В результаті одержують кількість клітин в кожній з чашок приблизно  $10^6$  клітин в 1 мл МПА.
6. Пінцет обпалити в полум'ї спиртівки. Охолодженим пінцетом брати, просякнені однією зі сполук, і розташовувати їх по колу чашки на відстані 3–4 см один від одного і на відстані 2–2,5 см від краю чашки. Одну чашку залишити як контроль росту культури (без дисків).
7. Чашки перегорнути догори дном і розмістити в термостаті при температурі, оптимальній для даної культури мікроорганізмів. Сполука з дисків дифундує в агар і формує навколо диску зону затримки росту.
8. Визначити токсичність сполуки щодо тест-культури за діаметром зони пригнічення росту мікроорганізмів та заповнити таблицю 17.

## Токсичність органічних сполук до тест-культури бактерій диско-дифузійним методом

Формула сполуки	Діаметр зони затримки росту бактерій _____ при дії відповідної концентрації сполуки, мм												Чутли- вість культури
	0,1%				0,2%				2,0%				
	1 чашка	2 чашка	3 чашка	сер.арифм	1 чашка	2 чашка	3 чашка	сер.арифм	1 чашка	2 чашка	3 чашка	сер.арифм	

9. Зробити висновок про токсичність органічних сполук до тест-культури бактерій.

**Контрольні питання**

1. Які методи оцінки чутливості мікроорганізмів до токсикантів вам відомі?
2. В чому полягає диско-дифузійний метод визначення токсичності органічних сполук для бактерій?
3. Як цей метод може бути використаний у біотестуванні?
4. Охарактеризуйте токсичність досліджених вами сполук для бактерій.

### Рекомендована та використана література

1. Багдасарян А.С. Биотестирование почв техногенных зон городских территорий с использованием растительных организмов: дис. канд.биол.наук: 03.00.16 / Багдасарян Александр Сергеевич. Ставрополь, 2005. 159 с.
2. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование / Мелехова О.П., Егорова Е.И., Евсеева Т.И. и др.; под ред. Мелеховой О.П. и Егоровой Е.И. Москва: Академия, 2007. 288 с.
3. Калаев В.Н., Карпова С.С. Цитогенетический мониторинг: методы оценки загрязнения окружающей среды и состояния генетического аппарата организма. Воронеж, 2004. 79 с.
4. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. 4-е изд., перераб. и доп. Москва: ВО «Агропромиздат», 1988. 271 с.
5. Федорова А.И., Никольская А.Н. Практикум по экологии и охране окружающей среды: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. завед. Москва: Гуманитарный издательский центр ВЛАДОС, 2001. 288 с.
6. Cai X., Ostroumov S.A. 2021. Finding of toxicity of herbal shampoo to plant seedlings: phytotest of mixture product that contains membranotropic chemicals as components. *Ecologica*, 28(101), 6-10.
7. Josephine A. Morello, Paul A. Granato, Helen Eckel Mizer. *Laboratory Manual and Workbook in Microbiology Applications to Patient Care*. Spiral Bound/Comb, 2003. 304 p.
8. OECD Guidelines For The Testing Of Chemicals. Revised Proposal For A New Guideline 221. *Lemna* sp. Growth Inhibition Test (July 2002). 22 p. URL: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/1948054.pdf> (дата звернення: 7 серпня 2021).
9. OECD Guidelines For The Testing Of Chemicals 202. *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test (4 April 1984). 16 p. URL: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948249.pdf> (дата звернення 7 серпня 2021).

Гранично допустимі концентрації забруднюючих речовин для  
рибогосподарського призначення (за Биологический контроль окружающей  
среды: биоиндикация и биотестирование, 2007)

Забруднююча речовина	Гранично допустима концентрація, мг/л
Амоній сольовий ( $\text{NH}_4^+$ )	0,5
Нітрат-іон ( $\text{NO}_3^-$ )	40
Натрит-іон ( $\text{NO}_2^-$ )	0,08
Нафта і нафтопродукти	0,05
Феноли	0,001
Синтетичні поверхнево-активні речовини аніоноактивні	0,1
Ферум ( $\text{Fe}^{3+}$ )	0,5
Купрум ( $\text{Cu}^{2+}$ )	0,001
Цинк ( $\text{Zn}^{2+}$ )	0,01
Хром ( $\text{Cr}^{3+}$ )	0,5
Хром ( $\text{Cr}^{6+}$ )	0,001
Нікол ( $\text{Ni}^{2+}$ )	0,01
Кобальт ( $\text{Co}^{2+}$ )	0,01
Плюмбум ( $\text{Pb}^{2+}$ )	0,03
Арсен ( $\text{As}^{3+}$ )	0,055
Гідраргірум ( $\text{Hg}^{2+}$ )	0,0005
Кадмій ( $\text{Cd}^{2+}$ )	0,005
Манган ( $\text{Mn}^{2+}$ )	0,01
Флуор ( $\text{F}^-$ )	1,5
Цианіди ( $\text{CN}^-$ )	0,05
Роданіди ( $\text{CNS}^-$ )	0,1
Метилмеркаптани	0,002
Бензол	0,5
Метанол	0,1
Формальдегід	0,01
Калій (катіон) ( $\text{K}^+$ )	50,0
Кальцій (катіон) ( $\text{Ca}^{2+}$ )	180,0
Магній (катіон) ( $\text{Mg}^{2+}$ )	40,0
Натрій (катіон) ( $\text{Na}^+$ )	120,0
Сульфати (аніон) ( $\text{SO}_4^{2-}$ )	100,0
Хлориди (аніон) ( $\text{Cl}^-$ )	300,0