

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ, МОЛОДІ ТА СПОРТУ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І.І. МЕЧНИКОВА

Інститут гідробіології НАН України

О. О. Ковтун, А. О. Снігір'ова, О.П. Білоус

Методичні рекомендації

**з вивчення фітомікробентосу
та фітоперифітону**

О д е с а
«ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ»
2012

Методичні рекомендації з вивчення фітомікробентосу та фітоперифітону. О.О. Ковтун, А.О. Снігірєва, О.П. Білоус – Одеса: Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2012. – 38 с.

Рецензенти:

Т.В. Васильєва,

кандидат біологічних наук, доцент кафедри ботаніки Одеського національного університету імені І.І.Мечникова

Теренько Л.М.,

кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник Одеського філіалу Інституту біології південних морів НАН України

Представлено основні методи відбору проб фітомікробентосу та фітоперифітону, їх камерального опрацювання, аналізу отриманих результатів та основи мікрофотографування. Методичні вказівки рекомендовані для студентів біологічних спеціальностей при написанні кваліфікаційних та дипломних робіт, а також для практичних занять на спеціальних курсах та спеціальному практикумі, розділ «Альгологія».

Рекомендовано до друку
Вченою радою
біологічного факультету ОНУ
імені І.І. Мечникова
Протокол № 5 від 07.02.2012р.

© О.О. Ковтун, А. А. Снігірєва, О.П. Білоус, 2012 г.
© Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2012
© Інститут гідробіології НАН України, 2012

ЗМІСТ

	ВСТУП	4
	Основні терміни	6
1.	Методика відбору проб фітомікробентосу і фітоперифітону	7
1.1.	Методи відбору проб фітомікробентосу	8
1.2.	Методи відбору проб фітоперифітону	10
1.3.	Використання експериментальних субстратів для вивчення угруповань перифітону	11
1.4.	Фіксація та зберігання проб	13
1.5.	Методи згущення проб	14
2.	Методи камерального опрацювання проб	15
2.1.	Вивчення якісного матеріалу	15
2.1.1.	Методи виготовлення постійних препаратів діатомових водоростей	16
2.1.2.	Методи виготовлення постійних препаратів «м'яких» мікроскопічних водоростей	18
2.2.	Методи кількісного підрахунку	20
2.2.1.	Розрахунок чисельності фітомікробентосу і перифітону	20
2.2.2.	Визначення біомаси	22
3.	Аналіз результатів	25
3.1.	Статистичний аналіз матеріалу	25
3.2.	Індекси, що використовуються у гідробіологічних та ботанічних дослідженнях	26
4.	Фотозйомка мікроводоростей	29
	Додаток	32
	Література	35
	Рекомендовані визначники	36

ВСТУП

Мікроскопічні водорості водойм є основним джерелом органічної речовини та початковою ланкою більшості харчових ланцюгів, тому у районах найбільшого їх розвитку спостерігається висока чисельність зоопланктону та риб, що харчуються ними.

Фітомікробентос та фітоперифітон відіграють особливу роль у житті водойм. Перш за все, це ґрунтується на їхній участі у процесах біологічного самоочищення. Особливо це актуально для прибережної зони моря та, зокрема, на мулистих ґрунтах і піщаних пляжах, що переважають у північно-західній частині Чорного моря. Попри це, велике значення мікрофітів бентосу і перифітону в формуванні кисневого режиму прибережних вод, в утворенні мулистих відкладів та їх ущільненні, що полегшує наступне їхнє заселення макроскопічними водоростями та іншими гідробіонтами. Важлива роль мікроводоростей у формуванні слизової плівки угруповання перифітонних мікроорганізмів, які є початковою стадією обрастань (Горбенко, 1977).

Мікроводорості бентосу та обрастань мають вражаючу пластичність морфологічних та фізіологічних властивостей, високу стійкість до дії екстремальних умов. Завдяки цим характеристикам мікроводорості використовуються при вивченні впливу різноманітних чинників довкілля на гідробіонти.

Надзвичайно важливою є роль мікроводоростей як організмів-індикаторів стану довкілля. Існують багаточисельні системи, де мікроводорості використовуються для проведення сапробіологічного аналізу. Проте найкраще ці системи розроблені для планктонних мікроводоростей прісних водойм.

Кількісне і якісне вивчення фітомікробентосу та фітоперифітону посідає важливе місце у морських біологічних дослідженнях. До цих пір відомості щодо кількісної оцінки мікрофлори бенталі лиманів, озер, річок та морів є небагаточисельними. Низький рівень досліджень питання продуктивності фітомікробентосу та фітоперифітону та вивчення їх значимості в трофічних ланцюгах.

Накопичені дані систематичного, флористичного та кількісного характеру про мікроводоростеві угруповання перифітону – на скелях літоралі, макрофітах, занурених штучних субстратах, також все ще залишаються небагаточисельними, саме тому отримання будь-яких нових відомостей про цей тип угруповання – важливо та актуально.

Студенти-біологи повинні пам'ятати, що термін фітомікробентос об'єднує усю сукупність фотосинтезуючих мікроорганізмів, прикріплених чи рухомих, що мешкають як на будь-якому підводному твердому субстраті, що утворює дно басейну, так і на рухомому, природному чи штучному.

У цих рекомендаціях фітоперифітон відокремлено до самостійної екологічної групи, що розглядається нарівні із фітопланктоном та фітомікробентосом. Це вичленення обумовлене відмінностями у гідрологічних, гідрохімічних та фізичних режимах води безпосередньо поблизу дна та на предметах, що височіють над дном, та має вагомий вплив на усі угруповання обростань (Дуплаков, 1933; Белякова и др. 2006; Методи гідроекологічних..., 2006).

Метою цих рекомендацій є ознайомлення студентів біологічних спеціальностей із основним категоріальним апаратом, що використовується при вивченні фітомікробентосу та фітоперифітону, методами його збору, опрацювання, первинного аналізу та із основами фотографування мікрководоростей.

Основні терміни

Бенталь – глобальний біотоп бентосу, заселений мікроорганізмами, рослинами та тваринами, які мешкають на поверхні дна водойми чи у товщі ґрунту.

Біологічне різноманіття – усі мешканці Землі, види рослин, тварин і мікроорганізмів, а також екосистеми, частиною яких є живі організми та екологічні процеси, в яких вони беруть участь.

Біотоп – неживі компоненти чи неживе середовище біоценозу.

Біоценоз – історично складена сукупність рослин, тварин, мікроорганізмів, що населяють ділянку суші чи водойми та характеризуються певними відносинами як між собою, так і з абіотичними факторами навколишнього середовища.

Місцеіснування – територія, зайнята певним видом.

Обростання – сукупність організмів, що поселяються на живих чи мертвих субстратах у товщі води.

Обростає – водний організм, що належить до угруповання обростання.

Перифіталь – глобальний біотоп перифітону, сукупність твердих поверхонь, оточених водою у різноманітних водоймах, що заселені організмами перифітону.

Перифітон – екологічне угруповання гідробіонтів, що мешкає на межі фаз «вода - твердий субстрат» будь-якого походження та природи.

Перифітони – організми різноманітної систематичної приналежності, та ті, що належать до складу угруповань перифітону.

Фітомікробентос – сукупність мікроскопічних водоростей прикріплених, вільноживучих чи тих, що вільно пересуваються, які постійно чи більшу частину свого життєвого циклу пов'язані із рихлим субстратом.

Флора – історично сформована сукупність популяцій видів рослин, приурочена до певного географічного простору.

Експериментальний субстрат – різноманітні тверді поверхні природного чи штучного походження, спеціально виготовлені чи ті, що використовуються для вивчення обростань (перифітону).

1. Методика відбору проб фітомікробентосу і фітоперифітону

У ботанічній та гідробіологічній літературі описано досить багато різноманітних методів відбору та вивчення мікрофітів бентосу, проте вибір методів відбору проб залежить в першу чергу від завдань дослідження, типу водойм та субстрату, рясності розвитку водоростей та існуючих приладів і обладнання.

Для флористико-систематичних та гідробіологічних досліджень у більшості випадків використовують одночасно декілька методів, так як найкращі результати можна отримати тільки після опрацювання як якісних, так і кількісних проб різними методами (Водоросли. Справочник, 1989).

У зв'язку із мікроскопічними розмірами більшості видів, виявити їх неозброєним оком за природних умов далеко не завжди видається можливим. Саме тому, відбір проб необхідно проводити не лише за умов масового розвитку, що обумовлено зміною забарвлення субстрату (таломів макрофітів, каміння, «цвітіння» піску і т.п.), але і в тому випадку, якщо найуважливіше візуальне обстеження субстрату не дозволяє виявити водорості.

Вибір станцій для відбору проб, перш за все, залежить від мети дослідження. Проте у будь-якому випадку необхідно попередньо ознайомитись з гідрологічним, хімічним та фізичним режимом району дослідження, розташуванням виходу стічних і дренажних вод, наявністю гідротехнічних споруд (пірсів, хвилерізів) та інших чинників, що можуть впливати на якісні та кількісні показники мікрководоростей.

При плануванні експерименту важливо обрати правильний **період відбору проб**. У різні пори року переважають різноманітні групи мікрководоростей, тому при дослідженнях необхідно враховувати сезонні коливання чисельності та біомаси, а також видове різноманіття. Наприклад, при вивченні діатомових водоростей бентосу, необхідно пам'ятати, що масовий розвиток цієї групи спостерігається весною та восени, тому ці сезони неможливо не брати до уваги. При проведенні сапробіологічного аналізу найбільш сприятливим вважається кінець біологічного літа (друга половина вересня), що характеризується стабілізацією водного та температурного режимів (Комулайлен, 2003).

При класичних гідробіологічних та ботанічних дослідженнях доцільно проводити щомісячний (1-2 рази в місяць) відбір проб, в певний (однаковий) час доби, в ясну штильову погоду. Подалі складається база даних, в якій подається список видів мікроводоростей, чисельність, біомаса, розміри клітин (довжина і ширина), а також гідрохімічні параметри (температура, солоність, рН та ін.), які вимірюються під час відбору проб.

1.1. Методи відбору проб фітомікробентосу

Використання існуючих методів відбору проб фітомікробентосу передбачає відбір водоростей, що мешкають на поверхні донних ґрунтів на межі двох фаз рідина-субстрат на глибинах від 0 до 35 - 40 метрів. У зв'язку з цим, основною умовою при відборі проб є повна герметичність відібраного субстрату, на якому вегетують мікроводорості.

На невеликих глибинах (до 0,5 м) є змога використовувати будь-які методи ручного відбору проб за допомогою трубок, пробірок, бакпечаток, банок чи з використанням сифону – резинового шлангу із скляними трубками на кінцях, до якого засмоктується верхній шар ґрунту.

На глибинах понад 0,5 м, де ручний збір ускладнено (за виключенням методів із використанням легковололазного обладнання), відбір проб фітомікробентосу здійснюється з використанням мікробентометра чи дночерпача, відбираючи невеликий об'єм за допомогою ємності (пробірки, банки), внутрішній діаметр та площа якої відома (вираховують за формулою $S = \pi r^2$, де S – площа круга; постійна $\pi = 3,14$; r - радіус внутрішньої окружності банки).

Однак слід враховувати, що відбір кількісних проб дночерпателем дає дуже велику похибку, так як при піднятті із глибини в ґрунті, що ним захоплений, порушується та змивається верхній шар (намулок), в якому знаходиться основна маса мікроводоростей.

Найбільш досконалою моделлю мікробентометру є модель В. С. Трав'янка та Л. В. Євдокимової, який складається із трубки довжиною 30 - 40 см з діаметром 5 - 6 см (площа охоплення 19 - 28 см²), що у верхній частині має автоматично працюючий клапан стабілізатора (рис. 1).

На мірній мотузці трубку із відкритим клапаном у вертикальному положенні кидають за борт човна. Під впливом своєї ваги трубка вривається у донний ґрунт, при цьому клапан автоматично герметично закриває верхній отвір.

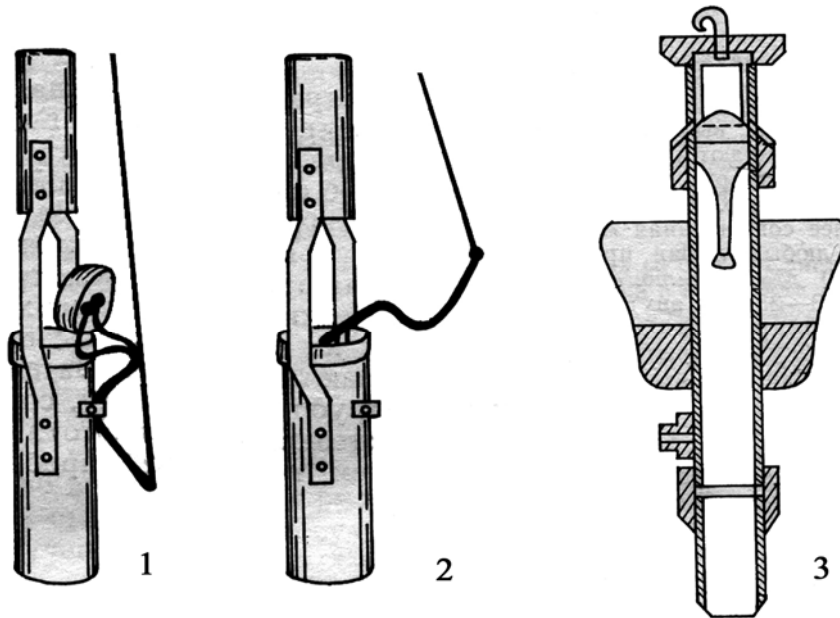


Рис. 1. Мікробентометри Владимирової (у відкритому (1) та закритому (2) вигляді) та Трав'янка-Євдокимової у повздовжньому перерізі (3)

За участі мотузки трубку підіймають на поверхню; при виході із води нижній отвір закривають долонею, щоб із трубки не випав ґрунт. Потім верхній шар води зливають, а трубку, що містить ґрунт та залишок придонної води, відгвинчують від стабілізатора із клапанної коробки, збовтують та, вимірявши об'єм і відокремивши верхній 2-3 см шар, переносять пробу у підготовлений для неї посуд. Подалі проба фіксується 4% розчином формаліну, чи відразу надається до опрацювання.

Найкращі кількісні результати можна отримати лише при відборі проб різноманітними конструкціями трубок чи із використанням легководолазного обладнання, коли разом із відбором проб проводять візуальне обстеження дна, визначають стан донних угруповань мікрофітів, його проективне покриття зоо- чи фітобентосом, плямистість розподілу тощо.

Враховуючи мозаїчність розподілу мікрофітів на різноманітних типах донних ґрунтів доцільно на одній станції відбирати проби не

менш ніж у трьох повторностях. Проби, відібрані на одній станції, зливаються до загального посуду.

1.2. Методи відбору проб фітоперифітону

Для вивчення видового складу (якісні проби) перифітону наліт із природних чи штучних субстратів (каміння, мушлі моллюсків та ракоподібних, стебла водних рослин та водорості, гідротехнічні споруди, корпуси суден, скло із обрастаннями і т. д.) знімають за допомогою ножа чи спеціальних скребків, чи змивають м'якою щіточкою. При цьому необхідно враховувати, що частину організмів неминуче буде зруйновано і загальна картина взаємного розміщення компонентів мікрогруповань зміниться. Тому доцільніше, субстрат разом із водоростями обережно та повільно витягнути із води та увесь (чи його фрагмент) із невеликою кількістю води помістити у підготовлену для проби посудину чи кювету.

Для кількісного обліку обростань за допомогою щіточки ретельно змивають водорості із витягнутого субстрату і, зафіксувавши змив, залишають його в циліндрі чи у іншій посудині для згущення. Крім об'єму змиву (звично 50 чи 100 мл) необхідно також знати площу субстрату, з якого змиті мікрофіти. Для цього вказану поверхню (камінь чи інший об'єкт) вкривають вологим папером чи плівкою та вирізають по контуру. Для розрахунку площі на вирізаний папір накладають плівку, розділену на квадрати зі стороною 1 см. Після цього підраховують кількість цілих квадратів і по контуру частково перекривають. Загальна площа дорівнює кількості цілих квадратів плюс 1/2 неповних квадрати (рис. 2).

Більш точним є метод середньозважених площин: отриманий контур поверхні субстрату переносять на кальку та вирізають; із цього ж паперу вирізають квадрат зі стороною 1 см (площею 1 см^2) та зважують. Знаючи масу паперового квадрату і масу вирізаного із цього ж паперу контуру, розраховують необхідну площу.

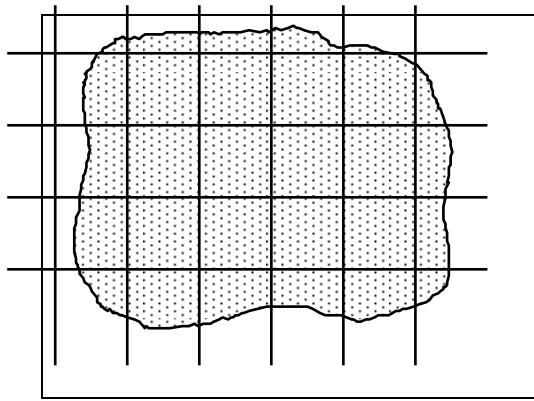


Рис. 2. Приклад розрахунку площі методом повних квадратів

При відборі проб із плоских поверхонь (палі, пірси, велике каміння) використовують дротяні рамки із стороною 10-20 см. Зчищені епіфіти фіксують на місці, проте, при подібному методі збору також є вірогідність похибки.

Вивчення епіфітних водоростей, змитих із таломів макрофітів та листя вищих водних рослин, та кількісний підрахунок, проводиться в розрахунку не лише на одиницю площі, але і на одиницю маси (сирої та повітряно-сухої) рослини (водорості) - субстрату. Для цього ділянку рослини (водорості), з поверхні якої змиті епіфіти, зважують, потім висушують (в термостаті при температурі 105 °С) до повітряно-сухого стану і знову зважують.

За польових умов, коли відразу опрацювати матеріал не видається можливим, зібрані макрофіти із обрастаннями фіксують у банках чи висушують до повітряно-сухого стану. Згодом, при розмочуванні в лабораторії, вони повертаються до попереднього стану.

1.3. Використання експериментальних субстратів для вивчення угруповань перифітону

Оцінка швидкості формування та порушення прикріплених водоростевих угруповань на основі проб, відібраних із натуральних субстратів, достатньо трудомістка. Крім того, у результаті гетерогенності умов середовища, спостерігається мозаїчність розподілу мікрowodоростей. Деякими дослідженнями зазначається, що за природних умов можливий лише відбір якісних проб.

Альтернативним способом вивчення перифітонних угруповань водоростей є метод «штучних», чи «експериментальних» субстратів (Макаревич та ін., 1987, Протасов, 1994), оскільки поряд із використанням дійсно штучних матеріалів (скло, фаянс, пластик, цемент, цегла, шлак і т. д.) часто використовуються природні субстрати (камінь, деревина, макрофіти, пісок). Матеріал експериментальних субстратів обирають виходячи із мети досліджень. Для оцінки швидкості колонізації, в першу чергу важлива початкова стерильність субстрату. Тому, перед використанням, субстрати необхідно відмити, очистити, змочити 7 % розчином формаліну та висушити в сушильній шафі при 40 °С (Комулайнен, 2003).

У якості експериментальних субстратів широко використовують скляні пластини найрізноманітніших конструкцій. Це пояснюється можливістю спостерігати структуру непорушеного альгоценозу.

Метод експериментальних субстратів має свої недоліки, пов'язані наприклад, із тим, що деякі нитчасті форми, широко поширені на натуральних субстратах, відсутні на експериментальних, особливо при короткій експозиції. Проте недоліки значно нівелюються перевагами цього методу.

На початку експериментальний субстрат являє собою «безлюдний острів». Його колонізація залежить від розмірів, матеріалу та положення. Ці фактори безпосередньо визначають число видів, різноманіття угруповання, особливо на першій стадії колонізації.

У якості експериментальних субстратів використовуються об'єкти із гомогенною поверхнею, стійкі до хімічного та біологічного руйнування, недорогі та легкодоступні. Пристрій, до якого прикріплюються субстрати, повинен мінімально впливати на них і забезпечувати формування повторностей за однотипних умов; легко використовуватись у різноманітних ситуаціях (грунт, течія і т.д.), легко вилучаються з води без порушення перифітонного угруповання та використовуватись для стандартних повторюваних субстратів.

Найкращі періоди для проведення експериментів – кінець біологічного літа, так як у перші тижні весни, осені і зими колонізація відбувається повільно. Тривалість експозиції визначається температурою, трофічним статусом водойми, забрудненістю і, як правило, становить від 2-х до 4-х тижнів: в

мезосапробних водах – 2 тижні, в олігосапробних - довше, в α -мезосапробних - менше.

При аналізі проб необхідно враховувати, що процес формування на різноманітно орієнтованих субстратах помітно відрізняється. Горизонтально розташовані пластини містять набагато більше матеріалу, ніж вертикальні.

1.4. Фіксація та зберігання проб

Найчастіше відібраний на одній станції матеріал складається із декількох частин - фіксованих та живих, якісних і кількісних проб. Живий матеріал зберігається у скляному посуді, пробірках, банках та у закритому вигляді чи у стерильних пакетах із міцного паперу чи поліетилену. Для зберігання матеріалу в живому стані проби обгортають вологим папером, а потім розміщують у ящиках – в прохолодному місці (у холодильнику). Якщо експедиція довготривала, проби періодично виставляють на світло та звожують.

Матеріал, що необхідно фіксувати переносять до чистої висушеної скляної посудини та фіксують 4 % розчином формаліну. Водорості, що знаходяться на будь-якому субстраті; разом з ним заливають розчином формаліну. Фіксація формаліном не впливає на морфологічну структуру діатомових і синьозелених водоростей та не викликає деформації клітин більшості таксономічних груп водоростей.

Однак, при дослідженні еугленових, динофітових, зелених водоростей доцільно використовувати більш м'які фіксатори, що не порушують клітинні стінки водоростей, наприклад розчин Люголю (1г KI і 1 г I₂ в 100 мл H₂O). Проте тривале зберігання таких проб небажано, через ймовірність розвитку в них бактерій та грибів.

Кожна зібрана проба обов'язково повинна мати робочу етикетку. На етикетках, що заповнюються простим олівцем чи водостійкою пастою, вказують дату, місце збору, тип водойми, номер проби, прізвище того, хто збирав матеріал та іншу необхідну інформацію (див. приклад). Етикетки бажано робити на міцному, не розмоклому у воді папері чи на пергаменті.

01.12.04 р. Пониззя Тилігульського лиману
Мікрофітобентос (МФБ). Кількісна.
Глибина 0,5 м, площа $S=15 \text{ см}^2$
Камінь із макрофітами. Проба № _____
Т° води – 21 °С. Зібрав Іванов І. І.

Ці ж відомості фіксуються у польовому щоденнику, до якого заносять також результати гідрохімічних вимірювань, температуру води та повітря, за необхідності – малюнки, опис водойми та місця збору, його фонові рослинності та інші особливості.

1.5. Методи згущення проб

Перед тим, як розпочати якісне чи кількісне опрацювання відмитих від субстрату проб, необхідно згустити зібраний матеріал.

Метод седиментації полягає у відстоюванні ємностей проб протягом 10-12 днів. Подалі, воду над водоростями, що осіли, відсмоктують сифоном, доводячи об'єм проби до 100 мл. Залежно від густини проби, її переливають до посудини меншого об'єму та повторно відстоюють, доводячи кінцевий об'єм до 30-50 мл. Після цього проба придатна до опрацювання.

Метод фільтрації є швидким методом згущення альгологічних проб за допомогою дрібнопористих фільтрів. Для цього необхідно: колба Бунзена, фільтрувальна воронка, дрібнопористі фільтри, вакуумна резинова трубка, вакуумний насос (насос Камовського). Недоліком цього методу є втрата при фільтрації клітин водоростей, розміром менше 10 мкм та можливе ушкодження морфологічних структур клітини – основних систематичних ознак.

2. Методи камерального опрацювання проб

2.1. Вивчення якісного матеріалу

Необхідною умовою успішного вивчення водоростей є обов'язковий попередній перегляд під мікроскопом живого матеріалу в день його збору, для того, щоб відзначити якісний стан водоростей до настання змін, пов'язаних із фіксацією та тривалим зберіганням проб. В цей же день, чи, в крайньому випадку, після недовготривалого зберігання в холодильнику, бажано здійснити фотозйомку, котра подалі дозволить більш чітко описати стан угруповань мікрофітів. Особливо це важливо для прикріплених видів, які вибірково поселяються на різноманітних видах макрофітів чи твердому субстраті природного або штучного походження.

Водорості, залежно від їх розмірів, вивчають у світлових мікроскопах різноманітних виробників із використанням різних систем об'єктивів та окулярів в прохідному світлі чи методом фазового контрасту із дотриманням звичних правил мікроскопіювання.

Для мікроскопічного вивчення живого матеріалу готують водні чи водно-гліцеринові препарати: на предметне скло наносять краплю досліджуваної рідини із проби чи поміщують субстрат із обрастаннями в розчин гліцерину у воді (шматочки макрофітів, пісок чи інший матеріал). За умов довготривалого вивчення препарату, рідина під покривним склом може підсихати, тому її потроху додають при мікроскопіюванні.

Під час вивчення рухливих водоростей із монадною структурою, а також шовних діатомових, слід призупинити їх рух. Для цього препарат трохи нагрівають, чи додають до нього розчин йоду, формальдегід, хлоралгідрат чи хлороформ. Кількість встановлюють експериментально залежно від специфіки об'єкту. Частіше за все використовують «розчин Люголю», котрий не лише добре фіксує водорості, але при цьому і забарвлює крохмаль клітин у синій колір.

Разом з цим із кількісним аналізом (визначення чисельності та біомаси) необхідно провести таксономічний аналіз, скласти список таксонів (видів, родів), що відзначені на тій чи іншій станції. Таксономічне різноманіття, виражене у флористичному багатстві і співвідношенні таксонів різного рангу, відзеркалює походження та

еволюцію альгоценозу.

Залежно від факторів середовища різноманіття видів може варіювати. При забрудненні відзначають зменшення видового багатства родів та родин (Комулайнен, 2003). Невелике додавання біогенних речовин викликає ускладнення структури за рахунок впровадження нових і посиленого розмноження раніше поодиноких в фітоценозі видів. При значному забрудненні, число доміантних видів зменшується за рахунок зникнення чутливих та посиленого розвитку небагатьох конкурентоспроможних видів. У таких ценозах часто відзначається виникнення морфологічних аномалій (тератологічні зміни) у різних груп водоростей, зокрема, серед діатомових.

При аналізі видового складу, матеріал слід переглянути у «живому» стані в день збору, до того як відбудеться руйнування клітин за дії фіксатора. Це особливо важливо при вивченні зелених, евгленових, синьозелених, криптофітових, динофітових водоростей, тобто тих груп водоростей, ідентифікація котрих пов'язана із типом їх руху. Видове визначення діатомових водоростей здійснюють на основі аналізу постійних препаратів чи фотографій, виконаних на СЕМ (скануючому електронному мікроскопі) чи ТЕМ (трансмісійному електронному мікроскопі).

Перегляд живих проб також допомагає оцінити стан альгологічних угруповань вцілому, мозаїчність розподілу, рухливість окремих видів, структуру та розподіл колоній. У цьому випадку бажано переглядати проби безпосередньо на субстраті (піску, листях рослин, на макрофітах і т. д.).

Гідробіологічні дослідження, пов'язані із оцінкою якості води, не потребують детального таксономічного аналізу.

2.1.1. Методи виготовлення постійних препаратів діатомових водоростей

Якісна проба, призначена для детального вивчення діатомових водоростей на світловому мікроскопі (СМ), скануючому та трансмісійному електронному мікроскопі (СЕМ та ТЕМ), зазнає технічної обробки, що проявляється в очистці панцирів від різноманітних домішок та органічної речовини і приготуванні з них постійних препаратів.

Очистка панцирів відбувається у декілька етапів.

1. **Фракціонування проби.** Із профільтрованої через сито проби виділяють фракцію, що містить діатомові водорості. Для цього пробу переливають у пробірку (10 мл) та відстоюють протягом 1 хв. У пробірці проба розділяється на декілька фракцій: більш верхня – колоїдний розчин (1 см), під ним глинисті, алевропелітові часточки (0,5 см), нижній шар – власне діатомеї (SiO_2), власне на дні – важкі часточки. Із вказаного шару піпеткою із довгим носиком відбирають 4 мл проби.

2. **Відмивання від фіксатора та розчинних солей.** Для цього пробу (4 мл) двічі центрифугують із дистильованою водою (4 мл) протягом 5 хвилин (3000 обертів) із наступним обережним відсмоктуванням (чи зливанням) верхнього шару рідини.

3. **Видалення з проби нерозчинних солей кальцію.** Для цього осад заливають 10 % розчином соляної кислоти (2-3 мл) та підігрівають протягом 7 хвилин. Охолоджену пробу відмивають повторним центрифугуванням до повного видалення залишків соляної кислоти (визначається за допомогою лакмусового паперу).

4. **Спалювання органічної речовини методом** холодної обробки концентрованою сірчаною кислотою. Для цього пробу витримують протягом 24 годин у концентрованій сірчаній кислоті із наступним додаванням дрібних кристаликів біхромату калію до її знебарвлення.

Другий спосіб приготування панцирів діатомових водоростей для виготовлення постійних препаратів базується на використанні 30-50 % розчину пероксиду водню з метою **видалення із проби нерозчинних солей кальцію та спалювання органічної речовини.** Для цього осад (1 мл) заливають 2-3 мл пероксидом водню та кип'ятять на водяній бані протягом 10 хв.

Коли осад повністю знебарвився, відмивання проби від кислоти чи пероксиду водню відбувається центрифугуванням збовтаної проби 3-4 рази дистильованою водою.

Очищені панцирі зберігають у спирті (очищеному, повторно перегнаному), дистильованою водою чи сухими в маленьких баночках, міцно закритих та із етикеткою. Перед вивченням матеріалу на СЕМ чи ТЕМ пробу необхідно «осаджувати» та зливати верхній шар рідини для унеможливлення потрапляння бактерій та грибів. Краплю матеріалу із ступками діатомей наносять на спеціальні латунні столики, висушують, потім двостороннім скотчем приклеюють у чашці Петрі.

Для визначення видової приналежності діатомових водоростей на СМ виготовляють постійні препарати. Для цього частину очищеної проби поміщують у високозаломлюване середовище, показник заломлення (n) якого більший, ніж показник заломлення кремнеземного панцира діатомей ($n=1,43$). Для середовища використовують різноманітні природні та синтетичні смоли. Найчастіше використовують смолу Ельяшева ($n=1,67-1,68$), яку готують за спеціальної методики із аніліну, формальдегіду та оцтової кислоти (Діатомовий аналіз, Т. 1). Смола являє собою тверду, крихку, світло-янтарного кольору масу, що легко плавиться при нагріванні.

Для приготування постійного препарату необхідно мати чисті, добре промиті та знежирені предметні та покривні скельця. Краплю суспензії, що містить стулки діатомей, наносять на покривне скельце, рівномірно по ньому розподіляючи та добре висушують над спиртівкою чи електроплиткою. При цьому, на предметному скельці розташовують шматочок середовища Ельяшева та легко підігрівають, ретельно спостерігаючи, щоб середовище лише розплавлялось, але не кипіло.

Покривне скельце із сухим осадом та стулками діатомей на нижній поверхні опускають на краплю підігрітого середовища та злегка придавлюють, щоб середовище рівномірно розподілилось і його залишок видавився із-під покривного скла.

Шар середовища має бути якомога тонший, в іншому випадку можна знову нагрівати предметне скло і повторювати процедуру. Надлишок середовища, що виступає після охолодження препарату обережно зчищають скальпелем чи лезом.

Готовий препарат відразу ж етикетують. Етикетка має бути точною копією етикетки проби та мати наскрізний порядковий номер, що відповідає номеру в журналі запису відбору проб.

2.1.2. Методи виготовлення постійних препаратів «м'яких» мікроскопічних водоростей

Для виготовлення постійних препаратів мікроскопічних водоростей, що не мають твердих панцирів, таких як синьозелені, евгленові, жовтозелені, зелені, використовують гліцерин. Середовище готують настоюючи одну вагову частину желатину в 6 частинах дистильованої води протягом декількох годин, потім

додають 7 вагових частин чистого гліцерину та кристалик антисептику, наприклад, тимолу чи карболової кислоти. Суміш нагрівають на водяній бані, помішуючи склянною паличкою, до повного розчинення желатину. Виготовлене середовище гліцерин-желатину має бути прозорим. Згодом суміш охолоджують, при наступних використаннях її розплавляють на водяній бані. Гліцерин-желатин має здатність добре перемішуватись із водою, тому при його використанні немає необхідності довготривало сушити матеріал.

Препарати готують наступним чином: водорості з води переносять в краплю гліцерину і на деякий час залишають підсихати. Надалі краплю розчиненого гліцерин-желатину наносять на злегка нагріте предметне скло, переносять до неї водорості і накривають покривним склом. Після повного затвердіння гліцерин-желатину краї покривного скла вкривають швидко підсихаючим лаком. Такі препарати в горизонтальному положенні можна зберігати декілька років.

При вивченні десмідієвих та панцирних динофітових водоростей, матеріал обробляють жавелевою водою, що сприяє його освітленню. Для приготування жавелевої води в 100 частинах води розтирають 20 г хлорного вапна, доливаючи 100 частин 15 % розчину карбонату калію та відстоюють протягом декількох годин, після чого суміш багаторазово збовтують. До фільтрату поступово додають розчин карбонату калію до припинення появи осаду. Після повторної фільтрації рідину зберігають в міцно закритій пляшці із темного скла.

Досліджуваний матеріал осаджують центрифугуванням, осад заливають на 1-2 доби жавелевою водою, міцно закриваючи посудину пробкою. Оброблений таким чином матеріал 2-3 рази відмивають дистильованою водою. Панцирі динофітових водоростей після такої обробки бажано підфарбовувати барвниками чи спиртовим розчином йоду.

Для декальцінування водоростей, інкрустованих вапном чи існуючих у вапняних породах (свердлярчі водорості), застосовують молочну (чи соляну) кислоту, що також сприяє освітленню препарату.

2.2. Методи кількісного підрахунку

Кількісний підрахунок можливий лише для проб, що спеціально відібрані для цього. Дані про чисельність водоростей є вихідними для подальшого визначення їхньої біомаси, продукції тощо. Чисельність визначається за кількістю клітин усіх видів на певну площу дна (см^2 , м^2) чи на об'єм (вагу) піску, макрофітів чи інших субстратів.

Підрахунок чисельності здійснюють на спеціальних рахункових скельцях (розграфлених на рядки), на поверхню яких наноситься певний об'єм (0,05 мл) ретельно перемішаної досліджуваної проби. Для цього використовують штемпель-піпетку чи звичну піпетку, попередньо розрахувавши об'єм краплі. Для цього медичним шприцом чітко набирають 1-2 мл води, котру виливають у невелику посудину. Піпеткою, якою будуть відбирати пробу, перекраплюють цей об'єм рідини і підраховують кількість крапель. Простий розрахунок дозволяє визначити об'єм однієї краплі, котрий подалі використовується при розрахунках.

Також для підрахунку чисельності використовують спеціальні рахункові камери (Нажота, Фукса-Розенталя, Горяєва та ін.), в яких досліджений об'єм фіксований ($0,01-0,05 \text{ см}^3$). Залежно від кількості організмів у досліджуваній пробі можна підрахувати або всі, або частину доріжок (квадратів) на поверхні рахункового скельця.

Необхідно обов'язково проводити повторні підрахунки декількох (не менше трьох) крапель із однієї і тієї ж проби, кожний раз відбираючи піпеткою зразок для підрахунку після ретельного взбавтування проби. Крім того, необхідно враховувати кількість порохованих клітин. При окулярі 10, об'єктиві-100 і на випадково вибраному полі вважається достатнім підрахувати від 100 до 500 клітин (Комулайлен, 2003). Понад 1000 клітин підраховують в тому випадку, якщо необхідно знайти рідкісні форми чи розрахувати індекс біорізноманіття.

2.2.1. Розрахунок чисельності фітомікробентосу і перифітону

Розрахунок чисельності водоростей в пробах бентосу і перифітону проводять на 1 см^2 чи 1 м^2 поверхні субстрату. Для цього необхідно наступні вихідні дані:

1. Площа перетину трубки мікробентометру (см^2) чи площу, з якої

змиті водорості;

2. Вага макрофітів, з котрих зроблено змив (для перифітону);
3. Вага (об'єм) піску чи іншого субстрату (для інтерстеціальних проб);
4. Об'єм відмитої та згущеної проби (звично 50-100 мл);
5. Об'єм досліджуваної краплі (0,05 - 0,03 мл);
6. Кількість рядків на рахунковому склі;
7. Кількість рядків, в котрих здійснено підрахунок клітин водоростей;
8. Кількість повторностей підрахунку (звично 3 - 4);
9. Середнє значення чисельності для кожного виду.

Кожний дослідник повинен прагнути використовувати одну й ту ж піпетку, рахункове скло, мікробентометр та мікроскоп, що виключає при подальших підрахунках плутанину та грубі помилки. При відборі проб слід не забувати вносити до щоденника і на етикетку усю необхідну інформацію.

Приклад розрахунку:

Умови: Проба піску взята трубкою із глибини 0,5 м в двох повторностях. Площа отвору трубки 8 см², відповідно взято із площі 8 · 2 = 16 см². Об'єм згущеної проби - 50 мл. Покривне скло 25 x 25 мм вкриває 70 рядків на рахунковому скельці. Об'єм однієї краплі із проби вираховано як 0,025 мл.

Після кількісного підрахунку на мікроскопі в 10 рядках (3 повторності) середня кількість *Navicula* sp. дорівнює 15. Розрахунок проводиться таким чином:

Якщо в 10 рядках – 15 клітин *Navicula* sp.
в 70 рядках – X клітин

$$X = \frac{70 \cdot 15}{10} = 105 \text{ клітин}$$

Якщо в 1 краплі (0,025 мл) – 105 клітин
то в 50 мл – X клітин

$$X = \frac{50 \cdot 105}{0,025} = 210000 \text{ клітин}$$

Нашу пробу зібрано із площі 16 см² та згущено до об'єму 50 мл, відповідно, на 16 см² площі припадає – 210000 клітин *Navicula* sp., а на 10000 см² (1 м²) – X клітин

$$X = \frac{210000 \cdot 10000}{16} = 131250000.$$

Так, нами встановлено, що на площі 1 м² чисельність *Navicula* sp. складає 131,25 · 10⁶ клітин. Подібним чином розраховується чисельність для усіх виявлених видів, а подалі загальна чисельність для усїєї проби.

Необхідною умовою отримання достовірних результатів є підрахунок частки живих і мертвих клітин. Для фітопланктонного угруповання таку кількість приймають рівною 10 %. Ця величина дуже умовна і змінюється протягом вегетаційного періоду. Крім того, співвідношення живих і мертвих клітин значно варіює протягом продукційного періоду кожного виду. Літературних даних щодо бентосних видів надто мало, тому отримання такої інформації для різноманітних районів та сезонів вкрай необхідно.

Власне розрахунок проводять у момент підрахунку чисельності на рахунковому скельці, окремо записуючи кількість клітин, у котрих видно живий вміст чи хлоропласт і кількість пустих стулок. Звично з цією метою використовують люмінесцентну мікроскопію. Досить часто у бентосних пробах трапляються планктонні чи тихопелагічні види (наприклад *Coscinodiscus gigas*, *Paralia sulcata*). Інколи за чисельністю вони домінують, тому їх підрахунок є обов'язковим. Отримані результати, а також співвідношення живих до мертвих клітин є достовірним показником стану конкретного фітоценозу і усїєї біологічної системи в цілому.

2.2.2. Визначення біомаси

Біомаса водоростей, як і їх чисельність, відноситься до найважливіших характеристик структури угруповання. Для підрахунку біомаси існує декілька методів. Найбільш точним з них є *геометричний*, чи *метод істинного об'єму*, запропонований І.О. Кисельовим (1956). Суть його у тому, що клітину водорості прирівнюють до відповідної геометричної фігури чи комбінації фігур, після чого їхні об'єми вираховують за відомими у геометрії формулам. Приймаючи питому вагу клітини прісноводних і солоноватоводних видів рівною одиниці (гіпергалобних – 1,1-1,2), біомасу вираховують за формулою:

$$W_{\text{кл}} = V_{\text{кл}} \cdot \rho,$$

де $W_{\text{кл}}$ – біомаса, $V_{\text{кл}}$ – об'єм клітини, ρ – питома вага.

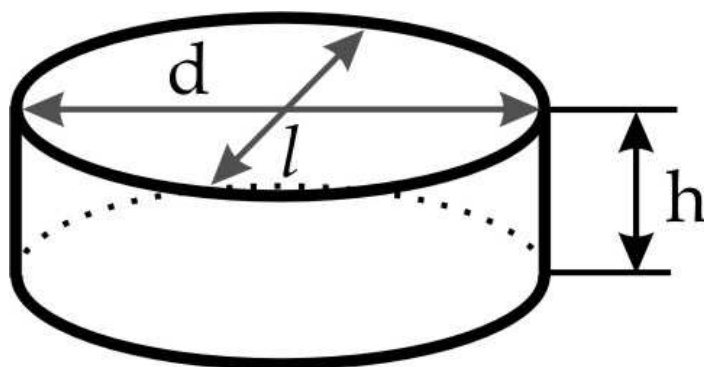
Біомасу розраховують для кожного виду окремо, а потім вираховують їх суму. Усі різноманітні форми клітин водоростей звично об'єднують у декілька груп. Більшість з них має циліндричну, еліптичну, конічну чи кулеподібну форму (табл.).

Таблиця

Приклади геометричних формул для розрахунку об'ємів клітин мікрводоростей

Геометрична фігура	Формула	Відділ мікрводоростей
Куля	$V = \pi / 6 \cdot d^3$	Chlorophyta, Cyanoprocarvota
Круглий циліндр	$V = \pi / 4 \cdot d^2 \cdot h$	Cyanoprocarvota (Oscillatoria)
Еліптичний циліндр	$V = \pi / 4 \cdot d \cdot l \cdot h$	Bacillariophyta (Navicula, Nitzschia)
Сплюснутий сфероїд	$V = \pi / 6 \cdot d^2 \cdot h$	Chlorophyta, Dinophyta
Еліпсоїд	$V = \pi / 6 \cdot d \cdot h \cdot l$	Dinophyta (Gymnodinium, Prorocentrum)
Паралелепіпед із ромбом в основі	$V = 1 / 2 \cdot d \cdot l \cdot h$	Bacillariophyta (Pleurosigma)

Примітка: V – об'єм клітини, d – довжина, l – ширина, h – висота.



При дослідженні клітини у мікроскопі завжди доступні для виміру два її параметри (довжина і ширина). Однак для обчислення її об'єму часто необхідно знати і третій – вісь (висоту), що не завжди є можливим. При цьому у

кожного виду мікрводоростей співвідношення між видимими і невидимими параметрами клітини є достатньо постійною величиною.

Використовуючи *додатковий коефіцієнт*, можна знайти

невидиму для дослідника сторону клітини – висоту – шляхом множення коефіцієнта на менший видимий розмір клітини (як правило, ширину). У додатку наведено ці коефіцієнти для деяких видів мікроводоростей (за Брянцевою та ін., 2005).

Розрахунково-об'ємний метод широко використовується при вивченні кількісних співвідношень різноманітних компонентів угруповань мікрофітів, закономірностей розподілу водоростей у певних біотопах одного і того ж чи різних водойм, сезонної динаміки тощо.

У літературі є дані щодо об'ємів клітин деяких видів (здебільшого - фітопланктон), однак необхідно враховувати, що розміри клітин кожного виду можуть змінюватись залежно від сезону року, солоності водойми тощо. Тому необхідно при обробці проб вимірювати клітини та заносити ці дані до бланку опрацювання проб.

3. Аналіз результатів

Результати гідробіологічних досліджень подаються у формі таблиць (в Excel), що включають список визначених видів із зазначенням їх чисельності, біомаси, еколого-географічної характеристики (див. Додаток), а також дані про загальну чисельність та біомасу із зазначенням помилки середнього значення.

3.1. Статистичний аналіз матеріалу

За наявності у дослідженнях декількох повторностей та підрахунку середнього значення чисельності чи розмірів об'єкту необхідно наводити похибку середнього значення.

Похибка стандартна (середнього значення) – величина, на яку змінюється середнє значення декількох відмінних експериментальних значень однієї і тієї ж вибірки при їхньому повторному перегляді. Відмінності між отриманими середніми значеннями враховуються статистично значимими, якщо вони перевищують подвійну стандартну похибку цих значень, а вірогідність появи такої відмінності (чи відмін) у вибірці не перевищує 5 %.

Стандартна похибка – ступінь відхилення конкретних спостережень від середнього значення. Позначається буквами **S** чи **σ** . Незначне стандартне відхилення вказує на те, що дані групуються навколо середнього значення, а значне – що початкові дані розміщуються далеко від нього. Стандартні відхилення дорівнюють квадратному кореню величини, що називається дисперсією. Вона є середнім числом суми зведених у квадрат різниць початкових даних, що відхиляються від середнього значення.

Розрахунок похибки середнього значення здійснюється наступним чином:

1. Підраховується середнє арифметичне (чисельність N_{cp} чи біомаси B_{cp}) із низки значень вимірювань.
2. Розраховується стандартна похибка **σ** за формулою:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2};$$

де x_i – i -й елемент вибірки; n – об'єм вибірки; \bar{x} – середнє арифметичне вибірки. Для обчислення σ можна також використовувати програму Excel.

3. Похибка середнього значення (μ) розраховується за формулою:

$$\mu = \sigma / \sqrt{n},$$

де σ – стандартне відхилення, n – число вимірів.

Приклад розрахунку:

Умови: У результаті кількісного опрацювання проб на 10 станціях отримані дані чисельності мікроводоростей: 13, 14, 23, 12, 10, 16, 23, 19, 15, $16 \cdot 10^3$ кл./см².

Середнє значення чисельності $N_{cp} = 16,1 \cdot 10^3$ кл./см².

Стандартна похибка $\sigma = 4,4$.

Помилка середнього значення $\mu = 4,4/\sqrt{10}=1,4$.

Загалом, середня чисельність мікроводоростей на досліджених станціях складає $N_{cp} = 16,1 \pm 1,4 \cdot 10^3$ кл/см².

3.2. Індекси, що використовуються у гідробіологічних та ботанічних дослідженнях

Індекси видового багатства

Важливою мірою оцінки різноманіття для обмеженого у просторі і часі угрупованні, для якого чітко відомо число видів і особин що його складають, є видове багатство. Однак у більшості випадків дослідник не має повного списку видів угруповання. У цьому випадку використовують співвідношення числа видів на чітко обумовлене число особин чи на певну біомасу і щільність виду (наприклад, на 1 м²).

При відборі та обробці проб мікроводоростей слід звернути особливу увагу на розмір вибірки. Не завжди він однаковий, проте слід пам'ятати, що при його збільшенні, число видів закономірно зростає.

Різнманітні співвідношення S (число виявлених видів) і N

(загальне число особин усіх S видів) лежать в основі простих показників видового різноманіття.

Індекс видового багатства Маргалефа

$$D_{Mg} = S - 1 / \ln N$$

Перевага цього індексу – простота розрахунків. Із збільшенням його значень зростає біорізноманіття.

Індекси, на основі відносної кількості видів

Цю групу називають індексами неоднорідності, оскільки враховується одночасно і вирівняність, і видове багатство.

Індекс різноманіття Шенона

$$H = - \sum n_i / N \cdot \lg n_i / N,$$

де N – загальне число особин, n_i – число особин кожного виду.

Причина помилок при оцінці різноманіття із використанням цього індексу полягає в тому, що неможливо включити до вибірки усі види реального угруповання. Індекс Шенона звично варіює в межах від 1,5 до 3,5, зрідка перевищуючи 4,5.

Індекси, котрі приділяють основну увагу великій кількості самих звичних видів, а не видовому багатству, називаються *індексами домінування*. Найкращим серед індексів домінування вважається:

Індекс Сімпсона

$$D = (\sum n_i (n_i - 1)) / N (N - 1),$$

де N – загальне число особин, n_i – число особин кожного виду i .

При збільшенні D , різноманіття зменшується. Тому індекс Сімпсона часто використовують у формі:

$$H = 1 - D.$$

Ця величина варіює від 0 до 1. Індекс дуже чутливий до присутності у вибірці найрясніших видів, але слабо залежить від видового багатства.

Аналіз бета-різноманіття: порівняння, подібність, відповідність угруповань.

Бета-різноманіття характеризує ступінь відмінностей чи подібностей низки місцезростань чи вибірок з погляду їх видової подібності чи рясності видів. Одним із способів визначення є порівняння видового складу різноманітних угруповань. Чим менше спільних видів в угрупованнях, тим вище бета-різноманіття. Цей показник можна використовувати для оцінки внутрішнього різноманіття місцезростання, а також для отримання уявлень щодо загального різноманіття умов цієї території.

Найпростіший спосіб виміру бета-різноманіття двох ділянок – розрахунок *індексу подібності*. Існує велика кількість формул для його підрахунку, однак частіше у біоценологічних, фауністичних і біогеографічних роботах використовуються:

Індекс Жакара

$$I_J = a / a+b+c;$$

Індекс Сьоренсена-Чекановського

$$I_{Cs} = 2a / (a+b)+(a+c);$$

Індекс Браун-Бланке

$$I_B = a / a+b, b \geq c,$$

де a – число загальних видів для двох списків, b – число видів, що містяться лише у другому списку, c – число видів лише у першому списку.

Ці індекси становлять: 1 – у випадку повного співпадіння видів угруповань, та 0 – якщо вибірки зовсім відрізняються і не включають спільних видів.

4. Фотозйомка мікрководоростей

У наукових дослідженнях фотографування набуло великого значення. Опис нових та цікавих видів, комплексів та характерних форм колоній нерідко доречно проілюструвати лише у вигляді мікрофотографій, оскільки вони є достатньо об'єктивними документами.

Для мікрофотографування використовують мікрофотонасадки (МФН - 10, 11, 12), встановлені на дзеркальні фотоапарати типу «Zenit», «Nikon», «Canon», тощо, зрідка – дальномірні, типу «Зорякий» чи «Киев - 4». Найбільш практичними є дзеркальні фотокамери, оскільки через пентапризму фотоапарату і візирне обладнання можна бачити пряме чи перевернуте зображення об'єкту, при цьому візуально дуже легко навести різкість об'єкту. Витримка може змінюватись в широких межах (залежно від чутливості плівки, освітлення і густоти об'єкту зйомки), однак короткі витримки мають більшу перевагу, оскільки нівелюють наявні у фотоапараті вібрації, що утворюються при дії затвору. Частіше за все експозиція визначається вмонтованим експонетром фотоапарату чи дослідним шляхом, через низку послідовних проб (фотографічна вилка).

Найкращим освітленням при зйомці на кольорову плівку є сонячний «зайчик», оскільки саме до денного світла збалансовані більшість кольорових плівок. Якщо ж зйомка відбувається на чорно-білу плівку, то спектральний склад променів джерела освітлення суттєвого значення не має.

Зйомка на сучасних мікроскопах із вмонтованим освітленням здійснюється на будь-які види плівок (ліпше дрібнозернисті, наприклад Fuji чутливістю 50-100 ASA), однак друк фотографій із кольорових плівок потребує подалі більш професійного підходу, оскільки корекція на збалансованій до сонячного світла плівці буде надто відрізнитись від стандартної та надрукованої у звичній лабораторії фотографії та матимуть спотворену передачу кольору.

Останнім часом все більшого значення набуває цифрова фотографія, що не потребує використання фотоматеріалів. Отримані цифровим фотоапаратом чи камерою зображення легко переносяться до персонального комп'ютера та подалі використовуються для вивчення чи ілюстрування.

Із чорно-білих плівок найбільш поширені для зйомки на

мікроскопах «Микрат - 200, 300», «МЗ - 3Л», «Фото - 32», фототехнічні плівки (ФТ) різного значення. Рекомендовані режими обробки цих плівок загальновідомі із доступної спеціальної літератури з фотографування (рис. 3).

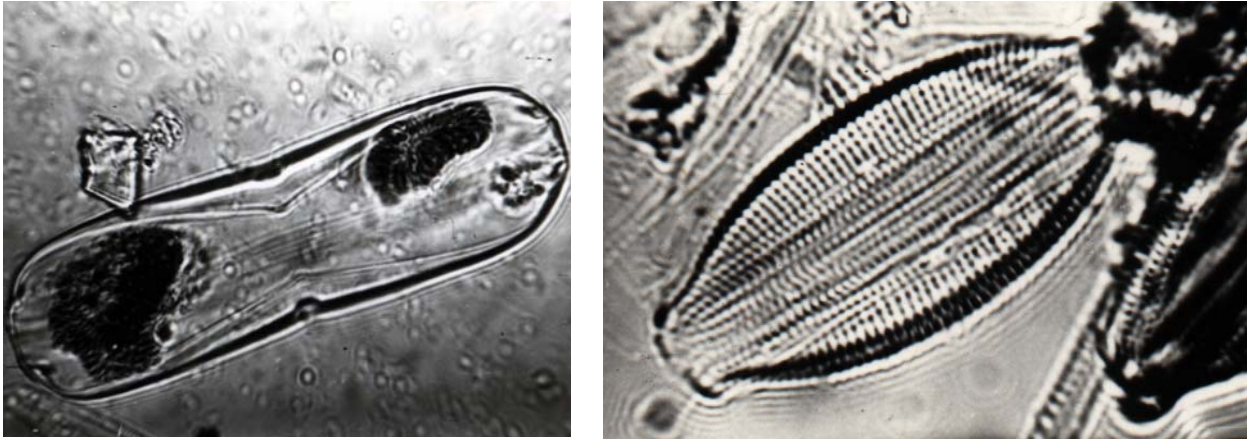


Рис. 3. Фотографія, виготовлена на світловому мікроскопі на чорно-білу плівку «Микрат» із тимчасового водного препарату (1) і постійного препарату (2), в котрому матеріал знаходиться у високозаломлюваному середовищі Ельяшева

Вивчення панцирів діатомових водоростей, а також уточнення видової ідентифікації дрібних форм, здійснюється на трансмісійному електронному мікроскопі типу EM-5, JSM-100, Hitachi-300, а також скануючих електронних мікроскопах JSM-25S, JSM-35S. Для вивчення і фотографування стулок діатомей в TEM дуже ретельно промиті стулки водоростей розташовують на предметні сітки, виготовлені із нітроцелюлози із використанням розчину колодію в амілазі. При дослідженні матеріалу в SEM очищені панцирі водоростей розташовують на спеціальні столики із нержавіючої сталі чи латуні, котрі із висušеним матеріалом подалі в спеціальній установці напилюють тонким шаром вуглеводу і золотом найвищої проби (рис. 4, 5).



Рис. 4. Фотографії панцирів діатомей, виконані на скануючому електронному мікроскопі (SEM).

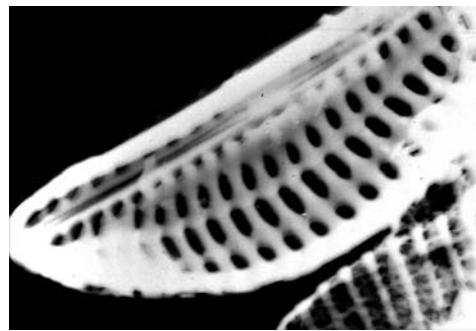
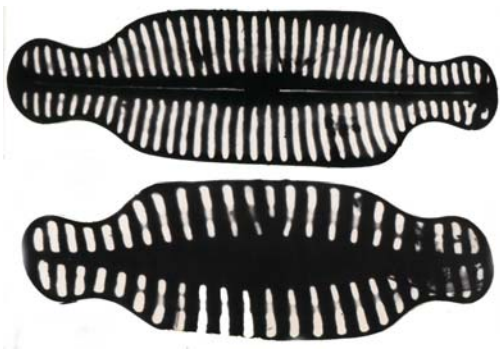


Рис. 5. Фотографії діатомових водоростей, виконані на трансмісійному електронному мікроскопі (ТЕМ).

Отримані на вмонтованому в електронний мікроскоп фотоапараті негативи обробляють звичним чином. Подалі негативи сканують чи використовують для друку фотографій на фотопапері.

Додаток

Стереометрія (прирівнювання до геометричних фігур) та поправкові коефіцієнти декількох видів діатомових водоростей

Назва виду	Фігури	Коеф.
<i>Achnanthes longipes</i> C. Agardh 1832	еліпт. циліндр	0,660
<i>Amphiprora paludosa</i> W. Sm.	еліпт. циліндр	0,810
<i>Amphora coffeaeformis</i> (C. Agardh) Kütz. 1844	еліпт. циліндр	0,540
<i>Amphora hyalina</i> Kütz. 1844	еліпт. циліндр	0,500
<i>Amphora ovalis</i> Kütz. var. <i>ovalis</i> Kütz. 1834	еліпт. циліндр	0,500
<i>Amphora proteus</i> Greg. var. <i>proteus</i> Greg. 1857	еліпт. циліндр	0,500
<i>Bacillaria paxillifera</i> (O.F.Müller) Hendey	еліпт. циліндр	0,800
<i>Bacillaria socialis</i> (Greg.) Grunow var. <i>baltica</i> Grunow in De Toni 1891	еліпт. циліндр	0,800
<i>Caloneis amphisbaena</i> (Bory) Cleve 1894-1895	еліпт. циліндр	0,500
<i>Cocconeis scutelum</i> var. <i>parva</i> Grunow in var. Heurck 1880-1885	еліпт. циліндр	0,700
<i>Cocconeis scutellum</i> var. <i>scutellum</i> Ehrenb. 1838	еліпт. циліндр	0,700
<i>Cylindroteca closterium</i> (Ehrenb.) Reimann & Lewin 1964	2 усіч. конуси+2 цил.	1,000
<i>Mastogloia pusilla</i> Grunow var. <i>pusilla</i> Grunow, 1878	еліпт. циліндр	0,600
<i>Navicula cancellata</i> Donkin 1871-1872	еліпт. циліндр	2,130
<i>Navicula directa</i> (W.Sm.) Ralfs in Ritchard 1892	еліпт. циліндр	0,600
<i>Navicula forcipata</i> Grevar. var. <i>forcipata</i> Greville 1859	еліпт. циліндр	0,600
<i>Navicula pennata</i> var. <i>pontica</i> Merezchkovsky 1902	еліпт. циліндр	0,750
<i>Navicula ramosissima</i> (C. Agardh) Cleve 1894-1895	еліпт. циліндр	0,778
<i>Nitzschia holsatica</i> Hustedt in A. Schidt 1874-1958	еліпт. циліндр	0,785
<i>Pleurosigma angulatum</i> (Qweck.) W. Sm. var. <i>angulatum</i> W. Sm. 1853-1856	паралелепіпед із ромбом при основі	0,690
<i>Pleurosigma elongatum</i> W. Sm. 1852	паралелепіпед із ромбом при основі	0,690
<i>Pseudo-nitzschia seriata</i> (Cleve) H. Peragallo 1897-1908	еліпт. циліндр	0,600
<i>Rhoicosphenia curvata</i> (Kütz.) Grunow 1867	еліпт. циліндр	0,500

Література

1. Белякова Г. А. Ботаника: в 4-х т. Т. 1. Водоросли и грибы: учебник для студ. высш. учеб. заведений / Г. А. Белякова, Ю. Т. Дьяков, К. Л. Тарасов. – М.: Издат. центр «Академия», 2006. – 320 с.
2. Брянцева Ю. В., Лях А. М., Сергеева А. В. Расчет объемов и площадей поверхности одноклеточных водорослей Черного моря. – Севастополь, 2005. – 25 с.
3. Водоросли. Справочник / С.П. Вассер, Н.В.Кондратьева, Н.П.Масюк и др. – Киев: Наук. думка, 1989. – 608 с.
4. География и мониторинг биоразнообразия / Коллектив авторов: Лебедева Н. В. и др. – М.: Издат. Научн. учебн.-метод. центра, 2002. – 432 с.
5. Дуплаков С. Н. Материалы к изучению перифитона // Тр. лимнол. станции в Косине. – М., 1933. – Вып. 16. – 160 с.
6. Залепухин В. В. Теоретические аспекты биоразнообразия: Учебное пособие. – Волгоград: Изд-во ВолГУ, 2003. – 192 с.
7. Киселев И. А. Методы исследования фитопланктона // Жизнь пресных вод СССР. – М.-Л., 1956. – Т. 4, № 1. – 234 с.
8. Комулайнен С. Ф. Методические рекомендации по изучению фитоперифитона в малых реках. – Петрозаводск: Карельс. научн. центр РАН, 2003. – 43 с.
9. Макаревич Т. А., Остапеня А. П., Михеева Т. М. Экспресс-метод оценки роста и продукционных характеристик перифитона // Гидробиол. журн. – 1987. – Т. 24, № 4. – С. 76-80.
10. Методи гідроекологічних досліджень поверхневих вод / О. М. Арсан, О. А. Давидов, Т. М. Дьяченко та ін.; за ред. В. Д. Романенка. – НАН України. Ін-т Гідробіології. – К.: ЛОГОС, 2006. – 408 с.
11. Миничева Г.Г., Зотов А.Б., Косенко М.Н. Методические рекомендации по определению морфофункциональных показателей одноклеточных и многоклеточных форм водной растительности. – Одесса, 2003. – 32 с.
12. Минюк Г.С., Дробецкая И.В., Чубчикова И.Н., Терентьева Н.В. Одноклеточные водоросли как возобновляемый биологический ресурс: обзор // Морской экологич. журн. – 2008, – Т. VII. № 2 – С. 5-23.
13. Одум Ю. Основы экологии. – М.: Мир, 1975. – 740 с.
14. Протасов А. А. Пресноводный перифитон. – Киев. – 1994. – 302 с.

Рекомендовані визначники

1. Гусялков Н. Е., Закордонец О. А., Герасимюк В. П. Атлас диатомовых водорослей бентоса северо-западной части Черного моря и прилегающих водоемов. – Киев: Наук. думка, 1992. – 112 с.
2. Диатомовые водоросли СССР. Ископаемые и современные / З.И. Глезер, А. П. Жузе, И. В. Макарова и др. – Л.: Наука, 1974. – Т. 1. – 400 с.; 1988. – Т. 2. – Вып. 1. – 115 с.
3. Диатомовый анализ / А. П. Жузе, И. А. Кисилев, В. С. Порецкий и др. – Л.: Госгеолитиздат, 1949. – Кн. 1. – 273 с.; 1949. – Кн. 2. – 283 с.; 1950. – Кн. 3. – 398 с.
4. Караева Н. И. Диатомовые водоросли бентоса Каспийского моря. – Баку: Изд-во ЭЛМ, 1972. – 258 с.
5. Косинская Е. К. Определитель морских синезеленых водоростей. Изд-во АН СССР, 1948. – 278 с.
6. Матвієнко О. М. Визначник прісноводних водоростей Української РСР. III, част. 1. Золотисті водорості Chrysophyta. – Київ: Наук. думка, 1965. – 365 с.
7. Прошкина-Лавренко А. И. Диатомовые водоросли бентоса Черного моря. - М.-Л.: Изд-во АН СССР - 1963. – 243 с.
8. Разнообразие водорослей Украины. /Под ред. Вассера С. П., Царенко П. М // Альгология. - 2000. – 10, № 4. – 309 с.
9. Топачевский А. В., Масюк Н. П. Пресноводные водоросли УССР. – Киев: Вища школа, 1984. – 336 с.
10. Флора водоростей України. Синьозелені водорості. Том. 1. Спеціальна частина. Вип. 1. Порядок Chroococcales / Коваленко О. В. – К.: Арістей, 2009. – 387 с.
11. Царенко П. М. Краткий определитель хлорококковых водорослей Украинской ССР. – Киев: Наук. думка, 1990. – 208 с.
12. Diatoms of Europe. Vol. 1-5. – A.R.G. Gantner Verlag K.G., 2001-2009.
13. Witkowski I. A., Lange-Bertalot H., Metzeltin D.. Diatom flora of Marine Coasts – A.R.G. Gantner Verlag K.G., 2000. – 925 p.

Навчально-методичне видання

Ковтун Олег Олексійович
Снігірьова Анастасія Олександрівна
Білоус Олена Петрівна

Методичні рекомендації з вивчення фітомікробентосу та фітоперифітону

Підп. до друку 05.10.2012. Формат 60x84/8.
Гарн. Таймс. Умов.-друк. арк.1,3.Тираж 25 прим.
Зам. № 507

Видавець і виготовлювач
**Одеський національний університет
імені І.І. Мечникова**

65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12, Україна
Тел.: (048) 723 28 39. E-mail: druk@onu.edu.ua
Свідоцтво ДК № 4215 від 22.11.2011 р.