

Региональный этап Всероссийского конкурса
юных исследователей окружающей среды
Муниципальное образовательное учреждение дополнительного
образования
Ярославский юннатский центр «Радуга»

Номинация «Зоология и экология беспозвоночных»

Исследовательский проект
**Особенности содержания и разведения культуры гидры зелёной
(*Chlorohydra viridissima*) в качестве тест-объекта на присутствие
тяжёлых металлов в водоёме**

Автор: Ивойлова Татьяна Михайловна, 14 лет
9 класс, МОУ СШ № 74 им.Ю.А.Гагарина,
учащаяся объединения «Экотроп»
МОУ ДО ЯрЮЦ «Радуга»
Руководитель: Смирнова Дарья Игоревна,
педагог дополнительного образования
МОУ ДО ЯрЮЦ «Радуга»

Ярославль, 2018

Аннотация .

По данным некоторых зарубежных исследований последних лет считается, что гидра зелёная может являться чувствительным тест-объектом присутствия тяжёлых металлов в водоёме, благодаря зоохлореллам, живущим с ней в симбиозе. Воздействуя на гидру тяжёлыми металлами, в первую очередь погибают одноклеточные водоросли, а после них сама гидра. В общепринятых программах экомониторинга гидры чаще всего не используются как тест-объекты. Хотя есть данные, что они более чувствительны к токсикантам.

Цель нашего проекта - создать оптимальные условия содержания и разведения гидры зелёной в культуре для дальнейшего изучения влияния на неё тяжёлых металлов.

Задачи:

Изучить биологию и экологию гидры; Изучить проблему загрязнения водоёмов тяжёлыми металлами и пути их попадания в воду; Изучить нормальные и предельно допустимые концентрации тяжёлых металлов в водоёмах в природе, опираясь на литературные данные; Создать устойчивую колонию гидр *in vitro*; Провести острый опыт по воздействию разных концентраций тяжёлых металлов на колонию гидры зелёной; Сформулировать выводы; Определить дальнейшие перспективы работы

В нашей работе мы использовали метод пилотажного эксперимента.

Для подсчёта особей пользовались методом отбора средней пробы (в первом опыте), и визуальным методом подсчёта. Морфологию гидры изучали методом микроскопирования. Для изучения экологии гидры применяли гидробиологические методы анализа водоёмов. А так же использовали вспомогательные методы – анализ продуктов деятельности и наблюдение. При проведении 3-х опытов по культивации гидры зелёной выявлены оптимальные условия её содержания; . Опытным путём получена устойчивая экспериментальная популяция гидры зелёной *in vitro*, с невысоким, но стабильным приростом численности, и с высоким приростом при условии кормления каждый день; Выдвинута гипотеза, что гидра зелёная может служить живым тест – объектом для определения присутствия солей тяжёлых металлов в водоёме (на основании анализа научных статей); Проведён пилотажный эксперимент по воздействию сульфата цинка на гидру зелёную с экспозицией 72 часа. Сублетальная концентрация составляет 0.007 г/л (при экспозиции 24 часа), 0.0035 г/л (при экспозиции 48 часов), летальная концентрация составляет 0.007 г/л (при экспозиции 48 часов),и 0,0035 и 0.0017 г/л (при экспозиции 72 часа.). Гидра зелёная более чувствительна к присутствию ТМ в воде (в данном случае сульфата цинка), чем общепринятый тест-объект дафния магна, (что подтверждает данные исследования 2018-го года учёных Колумбийского университета) и выдает целый спектр морфологических и физиологических изменений, которые легко фиксировать, а значит, её можно использовать как тест-объект на присутствие ТМ в водоёме, что подтверждает нашу гипотезу.

Содержание

| | |
|--|----|
| Введение..... | 4 |
| Методика исследований..... | 7 |
| Результаты исследований и их обсуждение..... | 8 |
| Выводы..... | 19 |
| Список использованной литературы..... | 20 |
| Приложение..... | 21 |

Введение

Данная работа представляет собой исследовательский проект, направленный на изучение особенностей содержания и разведения культуры гидры зелёной (*Chlorohydra viridissima*) в качестве тест-объекта на присутствие тяжёлых металлов в водоёме.

Наша работа началась с того, что в 2016 году мы столкнулись с проблемой – избыточным размножением гидры зелёной в декоративном аквариуме. Это проблема весьма актуальна для тех, кто занимается аквариумистикой. Наименее травматичным считается биологический метод борьбы с гидрой, который мы хотели опробовать. В процессе изучения данной проблемы мы пересмотрели цель и задачи, и составили план работы, не став ограничиваться только способами борьбы с гидрой в аквариуме. Нас заинтересовало, можно ли обнаружить гидр в пробах воды из естественных водоёмов, какова их экология, и что может влиять на жизнестойкость популяции гидр, и могут ли они сами являться индикаторами загрязнения воды.

Изучая литературные данные, мы обратились к проблеме загрязнения пресных водоёмов.

Мы изучили проблему эвтрофикации пресных водоёмов, и антропогенные факторы, которые могут ускорять этот сложный процесс.

Загрязнение водной среды, наряду с дефицитом пресной воды, является глобальной экологической проблемой (4,8). В водоемах увеличивается содержание веществ антропогенного происхождения, токсичность которых для большинства водных организмов проявляется уже в малых концентрациях (8, 5). Наибольшую экологическую опасность представляют тяжелые металлы (ТМ). Установлено, что даже эссенциальные металлы, такие как медь, никель, цинк, кобальт при накоплении в водной среде являются потенциальной угрозой для живых систем. Известно, что они способны нарушать целостность физиологических и биохимических процессов, вызывать серьезные изменения в метаболических реакциях у гидробионтов. В связи с этим актуальной задачей факториальной экологии является определение пределов толерантности водных организмов к воздействию тяжелых металлов в условиях хлоридного и сульфатного засоления водоемов (10).

Тяжелые металлы относятся к приоритетным загрязняющим веществам, наблюдения за которыми обязательны во всех средах (15,16).

Термин тяжелые металлы, характеризующий широкую группу загрязняющих веществ, получил в последнее время значительное распространение.

Источниками загрязнения вод тяжелыми металлами служат сточные воды гальванических цехов, предприятий горнодобывающей, черной и цветной металлургии, машиностроительных заводов. Тяжелые металлы

входят в состав удобрений и пестицидов и могут попадать в водоемы вместе со стоком с сельскохозяйственных угодий (16).

Постоянно возрастающий уровень антропогенного воздействия на водную среду приводит к ухудшению ее качества, что в первую очередь влияет на количественный и качественный состав фито- и зоопланктона. В общем объеме токсического загрязнения водной среды основную часть составляет загрязнение тяжёлыми металлами. Биоаккумуляция ионов металлов в клетках гидробионтов является естественным процессом, который поддерживает количество металлов на требуемом физиологическом уровне. При повышении концентрации металлов в окружающей среде биоаккумуляция может достигнуть критических уровней, что отрицательно скажется на жизнедеятельности водных организмов (10).

На сегодняшний день к **тяжелым металлам** относят более 40 металлов периодической системы Д.И. Менделеева с атомной массой свыше 50 атомных единиц: **V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Cd, Sn, Hg, Pb, Bi** и др. При этом немаловажную роль в категорировании тяжелых металлов играют следующие условия: их высокая токсичность для живых организмов в относительно низких концентрациях, а также способность к биоаккумуляции и биомagniфикации. Практически все металлы, попадающие под это определение (за исключением свинца, ртути, кадмия и висмута, биологическая роль которых на настоящий момент не ясна), активно участвуют в биологических процессах, входят в состав многих ферментов. По классификации Н.Реймерса, тяжелыми следует считать металлы с плотностью более 8 г/см³. Таким образом, к тяжелым металлам относятся **Pb, Cu, Zn, Ni, Cd, Co, Sb, Sn, Bi, Hg** (16).

Изучая литературные данные, мы обратились к зарубежным научным статьям. В частности в научной статье ирландских ученых указывается, что гидра может являться модельной системой для экологических исследований. Гидра широко используются для изучения тератогенного и токсического воздействия многих токсинов на протяжении многих лет, и в последнее время все большую популярность она приобретает как тест-объект для оценки воздействия загрязнителей окружающей среды (13). Гидры являются видами – биоиндикаторами для использования в экологической оценке ввиду их легко измеряемых физических, биохимических поведенческих и репродуктивных показателей. Гидра также обладает несравненной способностью к регенерации, позволяющей определить тератогенные вещества и воздействия загрязняющих веществ на её стволовые клетки. (13).

Гидры широко распространены по всей пресноводной среде (3,9) и сравнительно легко размножается в культуре, что делает их подходящими для использования в биоаналитическом анализе. Гидры были использованы для оценки воздействия на окружающую среду многочисленных загрязнителей окружающей среды, включая металлы, органические токсиканты, промышленные и муниципальные стоки. И показали себя как самые чувствительные животные на присутствие металлов, по сравнению с

более распространёнными тест-объектами. Несмотря на отсутствие гидр в формализованных программах мониторинга, гидра широко используется и рассматривается в качестве модельного организма в водной токсикологии (13 – перевод авторский).

Название гидра (*hydra*) присвоено Карлом Линнеем, по-видимому, за способность этих животных к регенерации, по аналогии с многоголовой Лернейской гидрой, победа над которой была одним из двенадцати подвигов Геракла: когда Лернейской гидре отрубили одну голову, на её месте тут же вырастала другая (14).

Зеленая окраска этой гидры возникает из-за присутствия в ее внутреннем слое (энтодерме) зеленых одноклеточных водорослей — зоохлорелл (*Chlorella vulgaris*). (17).

Водоросли дополнительно снабжают гидру кислородом, а сами находят для себя в теле гидры очень комфортную среду, богатую солями азота и фосфора. В результате такого симбиоза эта гидра легче переносит загрязнение воды, чем другие виды гидр; водоросль же пользуется углекислотой и аммиаком, выделяемыми клетками гидры и вредными для нее. Благодаря симбиозу с зелеными водорослями, зеленая гидра на свету может длительное время (более четырёх месяцев) обходиться без пищи, в то время как искусственно лишённые симбионтов гидры без кормления погибают через два месяца (14).

Питается гидра, захватывая своими щупальцами мелких животных, проплывающих мимо нее: циклопов, водных блох, мелких личинок комаров и даже мальков рыб.

Гидра - типичное пресноводное животное. Гидры живут в озерах, реках, ручьях, прудах и даже в канавах, если вода в них достаточно чистая и содержит большое количество растворенного кислорода (2,3).

Чаще встречается у берегов, где селится на водных растениях — на кувшинках (*Nymphaea* и *Nuphar*) и корешках ряски. Если вода чистая и прозрачная, то гидры селятся на камнях у самого берега, образуя порой бархатный ковер. Гидры любят свет, поэтому отдают предпочтение неглубоким местам. Гидры различают направление света и двигаются к его источнику, поэтому если они живут в аквариуме, то всегда перебираются в его освещенную часть. Зеленая гидра предпочитает спокойные, чистые водоемы (2,6).

Гидр легко найти в природе и сравнительно просто содержать в лабораторных условиях. Они быстро размножаются, и потому в короткий срок можно получить массовый материал (13,17).

Способность гидр двигаться в сторону источника света или просто перемещаться в более светлые участки бассейна очень важна для этих животных. Гидры питаются преимущественно планктонными рачками - циклопами и дафниями, а эти рачки всегда держатся в светлых и хорошо прогретых солнцем местах. Таким образом, идя навстречу свету, гидры приближаются к своей добыче (14).

Гидры (кроме зеленой) не нуждаются в свете для нормальной жизнедеятельности. Если их хорошо кормить, они прекрасно живут и в темноте. Зеленая гидра, в теле которой живут симбиотические водоросли зоохлореллы, даже при обилии пищи в темноте чувствует себя плохо и сильно сокращается (14,17).

Эвтрофикация (от др.-греч. εὐτροφία — хорошее питание) — насыщение водоёмов биогенными элементами, сопровождающееся ростом биологической продуктивности водных бассейнов. Эвтрофикация может быть результатом как естественного старения водоёма, так и антропогенных воздействий. Основные химические элементы, способствующие эвтрофикации, — фосфор и азот. В некоторых случаях используется термин «гипертрофизация» (15).

Эвтрофным водоёмам присущи богатая литоральная и сублиторальная растительность, обильный планктон. Несбалансированная эвтрофикация может приводить к бурному развитию водорослей (цветение воды) и появлению в воде цианобактерий, которые в период цветения выделяют токсины (алкалоиды и низкомолекулярные пептиды), способные вызвать отравление людей и животных, а также приводит к дефициту кислорода, заморам рыб и животных. Этот процесс можно объяснить малым проникновением солнечных лучей вглубь водоёма и, как следствие, отсутствием фотосинтеза у придонных растений, а значит и кислорода.

Благодаря симбиозу с зоохлореллами гидра зелёная обладает особыми факторами, влияющими на её жизнестойкость.

Ранее нами была выдвинута гипотеза, что данный вид может являться биоиндикатором эвтрофикации. Но когда мы более подробно изучили данный вопрос, мы пришли к выводу, что это гораздо более сложный и уникальный процесс, чем мы предполагали.

Гипотеза: гидра зелёная может являться тест-объектом присутствия тяжёлых металлов в водоёме, благодаря зоохлореллам, живущим с ней в симбиозе. Воздействуя на гидру тяжёлыми металлами, в первую очередь погибают одноклеточные водоросли, а после них сама гидра.

Цель: создать оптимальные условия содержания и разведения гидры зелёной в культуре для дальнейшего изучения влияния на неё тяжёлых металлов.

Задачи:

1. Изучить биологию и экологию гидры;
2. Изучить проблему загрязнения водоёмов тяжёлыми металлами и пути их попадания в воду;
3. Изучить нормальные и предельно допустимые концентрации тяжёлых металлов в водоёмах в природе, опираясь на литературные данные;
4. Создать устойчивую колонию гидр in vitro
5. Провести острый опыт по воздействию разных концентраций тяжёлых металлов на колонию гидры зелёной
6. Сформулировать выводы

7. Определить дальнейшие перспективы работы

Конечная гипотеза работы: гидра зелёная может служить **живым тест – объектом** для определения присутствия тяжёлых металлов в водоёме, в том числе вследствие антропогенного воздействия, что крайне актуально именно сейчас, когда остро стоит проблема загрязнения пресных водоёмов. Данный проект может иметь широкий спектр применения в учебных целях (как для ознакомления с биологией и экологией гидры зелёной, так и практическую значимость при проведении оценки степени загрязнения воды).

Методика исследований

В нашей работе мы использовали метод пилотажного эксперимента.

Пилотажный эксперимент (pilot experiment) – пробное экспериментальное исследование, в котором апробируются основная гипотеза, подходы к исследованию, план, проверяется работоспособность применяемых методик, уточняются технические моменты процедур эксперимента. Он проводится на небольшой выборке, без строгого контроля переменных. Пилотажный эксперимент позволяет устранить грубые ошибки в формулировке гипотезы, конкретизировать цель, уточнить методику проведения эксперимента, оценить возможность получения экспериментального эффекта.

Для подсчёта особей пользовались методом отбора средней пробы (в первом опыте), и визуальным методом подсчёта (во втором и третьем опыте) (Приложение 3,4).

Морфологию гидры изучали методом микроскопирования (Приложение 2)

Для изучения экологии гидры применяли гидробиологические методы анализа водоёмов.

А так же использовали вспомогательные методы – анализ продуктов деятельности и наблюдение.

Материал и оборудование: Две трёхлитровых стеклянных ёмкости, 1 4ехлитровая ёмкость, 2 круглых аквариума, микроскоп монокулярный (Юннат – 2п -1), микроскоп бинокулярный (Биомед), лупа с подсветкой, пипетка, скальпель, пинцет, ножницы закруглённые, песок кварцевый, чашки Петри, предметные и покровные стёкла, химическая пипетка для забора пробы воды, вата, раствор хлоргексидина. (Приложение 1)

Результаты исследований и их анализ

Наблюдение за гидрами в лабораторных условиях мы начали в ноябре 2016г.

Наш эксперимент начался зимой 2017 г.

Первый опыт был поставлен с 30.01 по 5.02. 2017 г.

Отсадив часть популяции гидры из аквариума, даже невооружённым глазом определили, что это гидра зелёная (*Chlorohydra viridissima*), она имеет характерный одноименный окрас за счёт того, что живёт в симбиозе с зелёными водорослями.

Ход опыта:

Краткое описание изучаемого аквариума. Объём аквариума: 24 литра, запущен 3,5 года назад. Грунт: песок кварцевый, мелкие речные камни. Температура: 26 градусов. Световой день: 8 часов (1 ватт на литр).

Население аквариума: моллинезии рыжие (3 самки), тернеции генномодифицированные флуоресцентные (1 самка + 1 самец), 1 ампулярия, 1 хилена.

Растения: таиландский папоротник, ричия (на камнях 2 особи), мох яванский на камнях, мох печёночный, кладофора, лимонник, элодея, элодея наяс.

Нами была произведена механическая первичная очистка аквариума и взята проба воды со следующим содержанием особей гидры зелёной (примерно 7-8 особей в средней пробе).

Одновременно с этим были подготовлены ёмкости для содержания популяции гидр

1. Отсажена часть популяции гидр из аквариума
2. Подготовлены ёмкости для содержания гидр
 - 2.1. Прокалён грунт (кварцевый песок)
 - 2.2. Отстояна вода (в течение 1 недели с 23.01 по 29.01.2017 г)
 - 2.3. Заложён грунт (кварцевый песок и галька)
3. Произведён запуск водоёмов-резервуаров (для содержания популяции гидр)
4. Наблюдали за изменением численности популяции гидр в созданных нами резервуарах с разными условиями содержания

Гидры были запущены в водоёмы 30.01 (предварительно вода отстаивалась неделю с 23.01 по 29.01. 2017г).

Водоёмы-резервуары представляют собой 2 трёхлитровых баллона, в которых изначально мы установили несколько отличающиеся условия содержания для гидр.

А именно в первой ёмкости мы оставили только грунт и воду, с запущенными в неё гидрами, установили баллон в тёплое и освещённое место, производили подкормку каждые 2 дня (Корм Тетра, измельчённый до состояния порошка), ёмкость находилась без дополнительной аэрации. (Ёмкость № 1)

Во второй ёмкости кроме грунта и воды с гидрами мы внесли зелёные растения (роголистник), производили подкормку каждые 2 дня (Корм Тетра, измельчённый до состояния порошка) и установили над ёмкостью постоянное освещение. Дополнительной аэрации так же не производилось. (Ёмкость № 2)

Третий резервуар, за которым велось наблюдение – был, собственно, сам аквариум, где кроме вышеперечисленных условий дополнительная аэрация производится постоянно. (Ёмкость № 3)

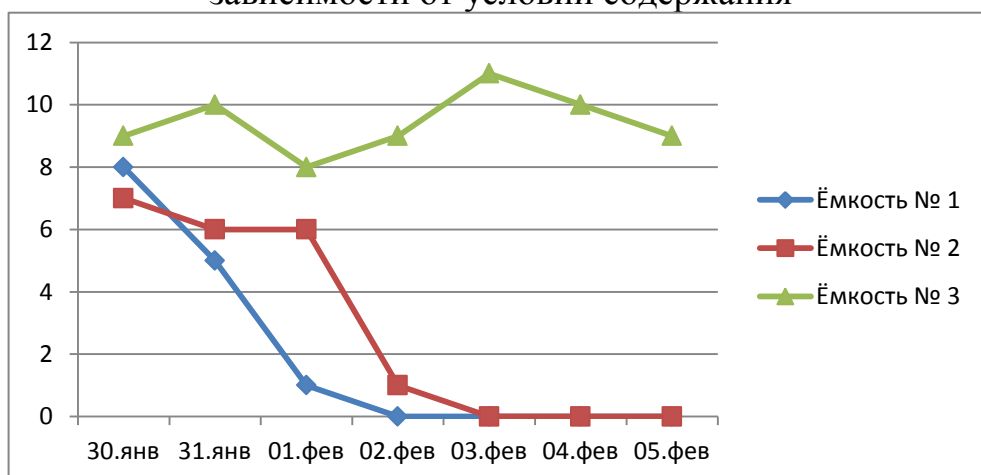
После этого мы начали наблюдение за популяцией гидр и брали средние пробы для изучения каждый день в течение недели (с 30.01 по 5.02.2017) в количестве 3ех за один раз из каждой ёмкости

Совокупность факторов для трёх исследуемых нами ёмкостей:

| Факторы Ёмкость | Ёмкость № 1 | Ёмкость № 2 | Ёмкость № 3 |
|--|----------------|----------------|----------------|
| Дополнительное освещение (световой день 8 часов) | - | + | + |
| Тепло (25-26 гр) | + | + | + |
| Растения | - | + | + |
| Макрофауна | - | - | + |
| Дополнительный корм | + | + | + |
| Искусственная аэрация | - | - | + |

| | 3 0.01 | 3 1.01 | 1 .02 | 2 .02 | 3 .02 | 4 .02 | 5 .02 |
|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Ёмкость № 1 | 8 особей | 5 особей | 1 особь | - | - | - | - |
| Ёмкость № 2 | 7 особей | 6 особей | 6 особей | 1 особь | - | - | - |
| Ёмкость № 3 | 9 особей | 10 особей | 8 особей | 9 особей | 1 особей | 1 особей | 9 особей |

График колебания численности популяции гидры зелёной в зависимости от условий содержания



Главные ошибки в первом опыте:

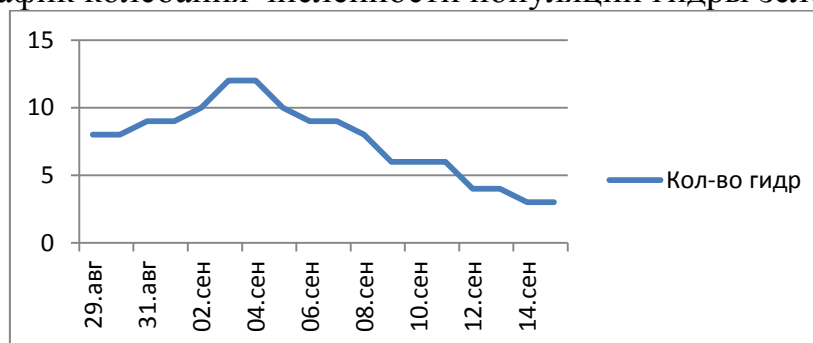
- Кормление гидр осуществлялось сухим кормом. Охотничий рефлекс гидры происходит при касании щупалец пищи, но если живой корм плавает и его вероятность задеть щупальца гидры гораздо больше, то сухой корм падает один раз и после этого начинает разлагаться. И гидра, скорее всего уже его не съест.

- Отсутствие замены воды и удаление остатков корма. Удалять остатки корма необходимо было каждый день, или хотя бы раз в три дня, на следующий день после кормления. В совокупности с сухим кормом, оседающим на дно, это приводит к гниению и разложению остатков. Именно это и привело к смерти гидр.

Вывод: При содержании гидр необходима регулярная замена воды и живой корм.

Второй опыт мы проводили с 29 августа по 15 сентября 2018 г. В качестве ёмкости мы использовали белый 4хлитровый таз. Туда мы поместили несколько ветвей элодеи, и вместе с нею туда попали несколько улиток - катушек, мы решили их оставить для того, чтобы они чистили стенки таза от налёта. Из корма были живущие прямо в воде циклопы и остракоды.

График колебания численности популяции гидры зелёной



Главные ошибки во втором опыте:

- Наличие улиток, растений и открытая ёмкость. Растения мешали просматривать гидр и измерять их количество, т.к. некоторые гидры садятся на них, а поскольку мы изучали именно гидру зелёную, на фоне водных растений её было трудно увидеть. Улитки хоть и чистили поверхность ёмкости, но отходы их жизнедеятельности оставались на стенках, что опять мешало просматривать гидр. Открытая ёмкость, разная пыль и шерстинки, что содержатся в воздухе, а так же естественное образование водорослей на стенках ёмкости, стало причиной образования трудноотделимого налёта. Он сильно мешал просматривать гидр;

- Малое кол-во корма. Гидрам было недостаточно небольшого количества содержащихся в воде остракод и циклопов относительно общего объёма воды. Для культивации гидр необходимо большое количество корма.

Вывод: Ёмкость должна меняться, так как образуется налёт из водорослей на стенках. В ёмкости не должно быть растений и улиток. Ёмкость должна быть накрыта сеткой для предотвращения попадания из воздуха мусора и пыли.

Учтя всё эти ошибки, мы пришли к следующим условиям культивации, которых мы придерживались при постановке третьего опыта.

Методика культивации и содержания гидр в третьем опыте:

Методику содержания мы сформировали на основании наших наблюдений во время проведения 1 и 2го опытов и анализа литературы.

Гидр удобно содержать в небольших желательных плоских ёмкостях, можно использовать пластиковые контейнеры различные поддоны. Пока число гидр небольшое их удобно содержать в пол-литровых банках. Мы использовали пол-литровые банки, эмалированные поддон и 20-литровый аквариум.

Для любого перемещения гидр можно использовать обычные пипетки и химические, но удобнее всего работать со шприцами от одного до двадцати миллилитров (для различных нужд) без иглы

Температура воды должна быть 18-27 градусов

Свет: 10 Ватт светодиодной лампы, цветовая температура 4000К, световой день 8-12 часов

В лабораторных условиях гидры размножаются почкованием, половое размножение можно вызвать лишь понижением температуры. Почкование гидр зависит лишь от количества корма. Для грамотного кормления мы выделили стадии насыщения гидры: (Приложение 5)

1. Гидра полностью вытянута, щупальца расправлены. Стебель очень тонкий, прямой, сложно заметить.

2. Гидра вытянута, но уже короче, чем в первой стадии, щупальца расправлены. Стебель более толстый может иметь утолщения, быть немного кривым.

3. Гидра ещё короче, щупальца поджаты. Стебель начинает напоминать форму шара, может немного просвечивать переваривающаяся еда

4. Гидра шарообразна, щупальца сильно поджаты. Просвечивает переваривающаяся еда.

Для быстрой культивации следует кормить до четвёртой стадии.

В качестве корма можно использовать артемий либо дафний. Желательно кормить 1 раз в сутки или 1 раз в 2ое суток.

Артемий необходимо содержать в отдельной трёхлитровой банке, с постоянной аэрацией и 12-часовым световым днём, на одну банку добавляется 2 столовых ложки соли и 1.5-2 ложки цист артемий. Раз в неделю менять не меньше 20% воды. Артемий кормят мутным раствором небольшого количества дрожжей, примерно раз в три дня. Для кормления гидр отключают свет и через несколько минут рачки собираются у источника света, затем их собирают шприцом. После промывают через хлопковую ткань отстоянной водой, ткань с рачками прополаскивают в воде с гидрами.

Каждый день необходимо удалять мусор со дна. Делается это шприцом без иглы. Либо вода сильно взбалтывается, и пока гидры оседают на дно, а мусор ещё не усел, мусор удаляется. Бывает, что гидры прикрепляются к остаткам корма, разным пылинкам. Тогда вылавливают этих гидр, отсаживают в небольшую ёмкость с плотно закрывающейся крышкой, и сильно взбалтывают. Затем выливают их в чашку Петри и выбирают отделившихся гидр. При необходимости можно повторить.

Раз в неделю гидр пересаживают в новую ёмкость, со свежей отстоянной водой.

Раз в неделю необходимо менять ёмкость или тщательно промывать от налёта, предварительно отсадив гидр.

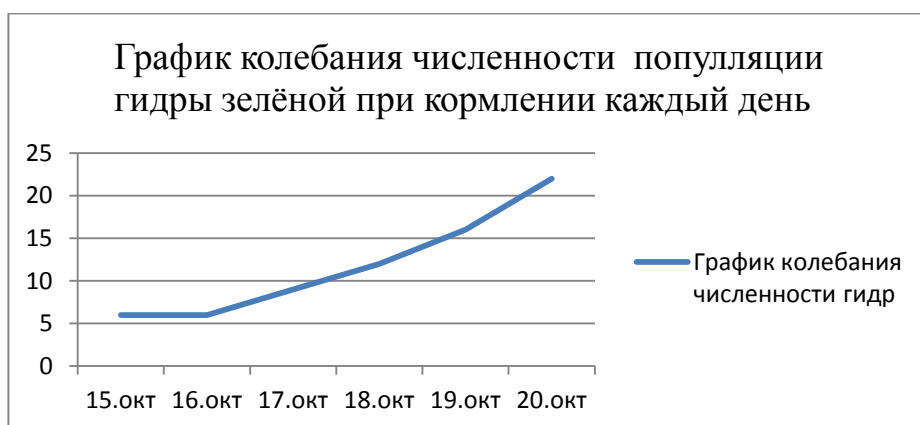
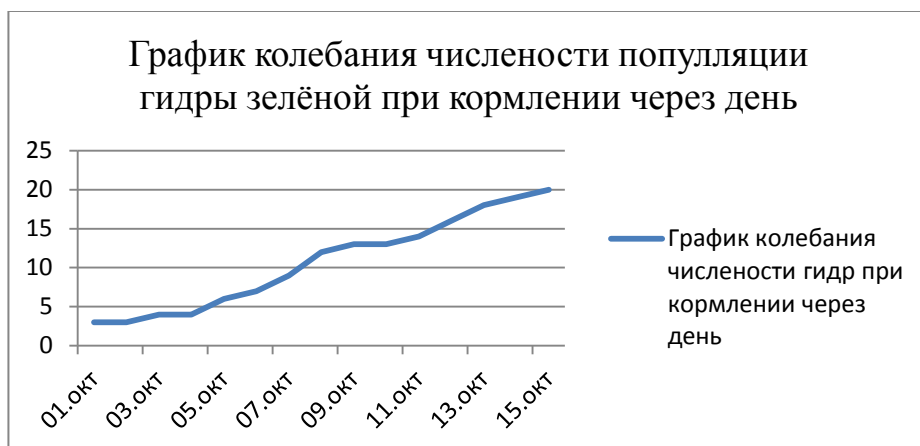
Что мы и делаем по сей день.

Создание устойчивой культуры мы разделили на два этапа:

-первый: быстрая культивация колонии гидр в литровых банках до 50-70 особей.

-второй: содержание гидр в 20 литровом аквариуме для поддержания численности, более 70 особей.

Так же для увеличения скорости размножения мы решили попробовать кормить гидр каждый день. Это дало свои результаты, скорость размножения действительно увеличилась.



Совокупность факторов для трёх опытов:

| | Опыт №1 | Опыт №2 | Опыт №3 |
|---|------------------------|--------------------|------------------|
| Корм | Сухой | Живой | Живой |
| Подмена воды | - | - | + |
| Смена ёмкости | - | - | + |
| Растения | + | + | - |
| Освещение | 8ч | 12ч | 12ч |
| Удаление остатков пищи со дна каждый день | - | + | + |
| Ёмкость | 2 трёхлитровые ёмкости | 4хлитровая ёмкость | Литровые ёмкости |

Для изучения экологии гидры зелёной с мая по июль 2018 г мы исследовали 3 водоёма в Заволжском районе (оз.Дизельное, оз.Техас, и карьер на Нижнем посёлке). Гидры в природных условиях были встречены в небольшом количестве, в 2ух из 3ех исследуемых водоёмов., но мы провели гидробиологический анализ данных водоёмов, хоть в задачи данной работы это не входит.

Таким образом, сейчас у нас имеется устойчивая небольшая экспериментальная популяция гидры зелёной. При соблюдении всех вышеперечисленных условий, скоро её можно будет использовать для подтверждения нашей гипотезы.

Мы выбрали 2 реагента, которыми собираемся воздействовать на гидр. Это сульфат меди (CuSO_4) и сульфат цинка (ZnSO_4). Проанализировав литературные источники, мы пришли к выводу, что соли этих металлов вызывали гибель одноклеточных водорослей - **что ионы Cu^{2+} , Zn^{2+} в концентрациях ниже ПДК угнетают фотосинтетическую активность одноклеточных водорослей (10),** а так же зоохлорелл в теле гидры (13).

Так же выбор металлов обусловлен их эссенциальностью и широким распространением в природных водах. Содержание данных металлов в поверхностных водах европейской части России намного превышает ПДК: так в водах бассейна реки Волга среднегодовые и максимальные концентрации соединений меди составляют 5 ПДК и 27 ПДК. (10)

Из литературных источников мы определили диапазон концентраций, при которых наблюдается гибель гидры:

Для CuSO_4 – 8,5-28 мкг/л

Для ZnSO_4 – 9,5 – 11,00 мкг/л

Определены дальнейшие перспективы работы.

Медь - один из важнейших микроэлементов. Физиологическая активность меди связана главным образом с включением ее в состав активных центров окислительно-восстановительных ферментов. Недостаточное содержание меди в почвах отрицательно влияет на синтез белков, жиров и витаминов и способствует бесплодию растительных организмов. Вместе с тем, избыточные концентрации меди оказывают неблагоприятное воздействие на растительные и животные организмы.

Содержание меди в природных пресных водах колеблется от 2 до 30 мкг/дм³, в морских водах - от 0.5 до 3.5 мкг/дм³. Повышенные концентрации меди (до нескольких граммов в литре) характерны для кислых рудничных вод (16).

В природных водах наиболее часто встречаются соединения Cu(II). Из соединений Cu(I) наиболее распространены труднорастворимые в воде Cu₂O, Cu₂S, CuCl. При наличии в водной среде лигандов наряду с равновесием диссоциации гидроксида необходимо учитывать образование различных комплексных форм, находящихся в равновесии с акваионами металла.

Основным источником поступления меди в природные воды являются сточные воды предприятий химической, металлургической промышленности, шахтные воды, альдегидные реагенты, используемые для уничтожения водорослей.

Предельно допустимая концентрация меди в воде водоемов санитарно-бытового водопользования составляет 0.1 мг/дм³ (лимитирующий признак вредности — общесанитарный), в воде рыбохозяйственных водоемов - 0.001 мг/дм³.

Цинк попадает в природные воды в результате протекающих в природе процессов разрушения и растворения горных пород и минералов (сфалерит, цинкит, госларит, смитсонит, каламин), а также со сточными водами рудообогатительных фабрик и гальванических цехов, производств пергаментной бумаги, минеральных красок, вискозного волокна и др.

В воде существует главным образом в ионной форме или в форме его минеральных и органических комплексов. Иногда встречается в нерастворимых формах: в виде гидроксида, карбоната, сульфида и др.

В речных водах концентрация цинка обычно колеблется от 3 до 120 мкг/дм³, в морских - от 1.5 до 10 мкг/дм³. Содержание в рудных и особенно в шахтных водах с низкими значениями pH может быть значительным.

Цинк относится к числу активных микроэлементов, влияющих на рост и нормальное развитие организмов. В то же время многие соединения цинка токсичны, прежде всего его сульфат и хлорид.

ПДК_в Zn²⁺ составляет 1 мг/дм³ (лимитирующий показатель вредности — органолептический), ПДК_{вр} Zn²⁺ - 0.01 мг/дм³ (лимитирующий признак вредности — токсикологический) (16).

С 25.12 по 28.12.2018 мы провели пилотажный эксперимент по определению чувствительности гидры зелёной к воздействию ZnSO₄.

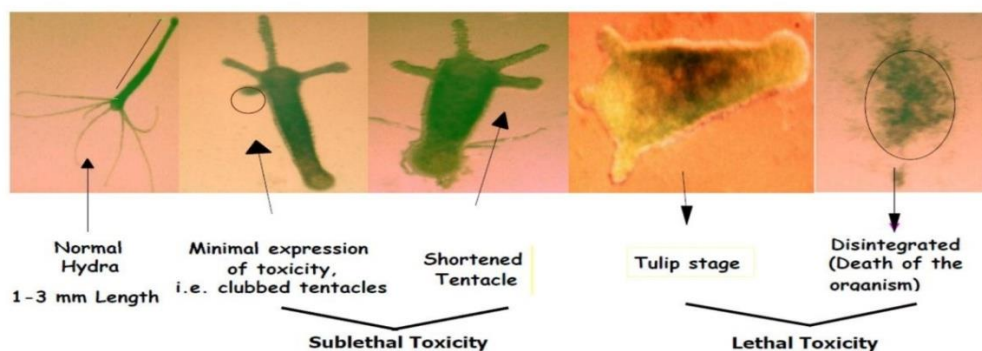
Исходя из данных исследования учёных Колумбийского университета за 2018 год (14) мы выбрали концентрацию по цинку, сложив все представленные и получив среднее значение. – 0.007 г/л (Таблица слева) Это должна была быть Среднелетальная концентрация для гидры зелёной, остальные пороговые концентрации мы нашли последовательным разбавлением искомой в 2 раза. (Приложение 6)

25.12.18 Мы приготовили концентрации $ZnSO_4$ 0,007 0,0035 0,0017 г/л и посадили по 10 гидр в каждую концентрацию. Первое измерение мы провели спустя сутки после начала эксперимента - 26.12.18

Согласно вышеуказанному исследованию (14) при воздействии ТМ при экспозиции 96 часов гидра зелёная претерпевает морфологические и физиологические изменения вплоть до летального исхода. Все эти стадии мы наблюдали в ходе нашего эксперимента. Кроме этого указали и другие особенности внешнего вида и двигательных реакций.


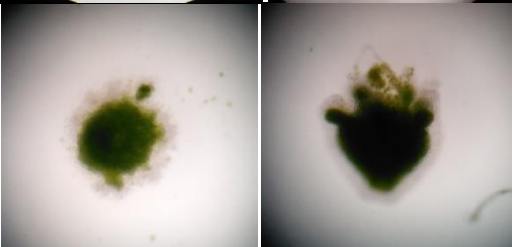
Изменение внешнего вида гидры зелёной под воздействием сублетальных и летальных концентраций ТМ. (14) :







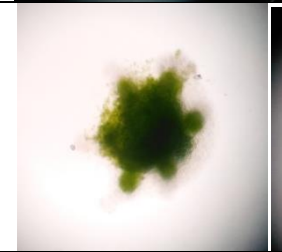
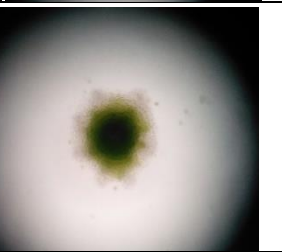
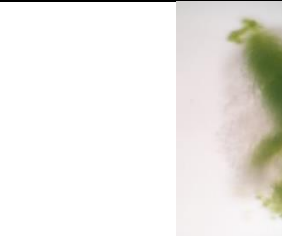

ges were used as toxicity endpoints to estimate the median lethal concentration (96-h LC_{50} lues in the definitive toxicity tests.



Результаты пилотажного эксперимента:

При воздействии на гидру солью цинка мы можем наблюдать различные изменения: рыхлая окраска, расслоение тканей, щупальца с утолщениями, булавовидные щупальца, нитевидные щупальца, слишком резкие реакции на раздражение, отсутствие реакции на раздражение, неполное расправление, отсутствие расправления, некоторые гидры чаще всего при более низких концентрациях могут начать образовывать гаметы.

| Дата наблюдения | Концентрация (г/л) | Описание | % смертности | Фото |
|-----------------|--------------------|---|--------------|--|
| 26.12.18 | 0.007 | Гидры были сжаты, наблюдалась так называемая тюльпанная фаза, было заметно сильное расслоение тканей, а также булавовидные щупальца. Из-за сжатия определить рыхлость не возможно | 50% |  |
| | 0.0035 | Полностью не расправляются, часто и резко съёживаются, сильная раздражимость, рыхлая консистенция, щупальца неправильной формы с утолщениями. | 0% |  |
| | 0.0017 | Сильная раздражимость, неправильное съёживание, гидры нитевидные, консистенция рыхлая, щупальца ломаные с утолщениями | 0% |  |
| 27.12.18 | 0.007 | Все мертвы, часть полностью разложилась, часть мёртвые тюльпаны.(| 100% |  |

| | | | | | |
|----------|--------|--|------|---|---|
| | 0.0035 | Вытягиваются не до конца, резкое сжатие, при расправлении заметна рыхлая консистенция, сильное расслоение. Имеется несколько гидр без движений и один разлагающийся тюльпан. | 40% |  |  |
| | 0.0017 | Сильное расслоение, окраска рыхлая, щупальца поджаты. | 0% |  |  |
| 28.12.18 | 0.007 | Часть полностью разложилась, часть мёртвые тюльпаны | 100% |  |  |
| | 0.0035 | Сильное расслоение, окраска рыхлая, полуразложившийся тюльпан | 100% |  |  |
| | 0.0017 | Сильное расслоение, окраска рыхлая, щупальца поджаты. | 100% |  |  |

Выводы:

1. На основе анализа литературных источников изучены отличительные особенности вида Гидра зелёная (*Chlorohydra viridissima*);
2. На основе анализа литературных источников изучена проблема загрязнения воды тяжёлыми металлами, их нормальные и предельно допустимые концентрации;
3. При проведении 3ех опытов по культивации гидры зелёной выявлены оптимальные условия её содержания;
4. Опытным путём получена устойчивая экспериментальная популяция гидры зелёной *in vitro*, с невысоким, но стабильным приростом численности, и с высоким приростом при условии кормления каждый день;
5. Выдвинута гипотеза, что гидра зелёная может служить живым тест – объектом для определения присутствия солей тяжелых металлов в водоёме (на основании анализа научных статей);
6. Приобретены необходимые реактивы и изучен диапазон их концентраций, способный вызывать летальный исход
7. Определены дальнейшие перспективы работы по созданию искусственного водоёма с оптимальными условиями, поддерживающими жизнестойкость или жизнённость гидры на должном уровне для дальнейшего изучения и постановки опыта по определению среднелетальной концентрации солей тяжёлых металлов (CuSO_4 и ZnSO_4);
8. Проведён пилотажный эксперимент по воздействию сульфата цинка на гидру зелёную с экспозицией 72 часа. Сублетальная концентрация составляет 0.007 г/л (при экспозиции 24 часа), 0.0035 г/л (при экспозиции 48 часов), летальная концентрация составляет 0.007 г/л (при экспозиции 48 часов), и 0,0035 и 0.0017 г/л (при экспозиции 72 часа.)
9. Гидра зелёная более чувствительна к присутствию ТМ в воде (в данном случае сульфата цинка), чем общепринятый тест-объект дафния magna, (что подтверждает данные исследования 2018-го года учёных Колумбийского университета 14) и выдает целый спектр морфологических и физиологических изменений, которые легко фиксировать, а значит её можно использовать как тест-объект на присутствие ТМ в водоёме, что подтверждает нашу гипотезу.

Перспективы дальнейшего исследования:

В планы нашего дальнейшего исследования входит поддержание экспериментальной популяции гидры зелёной на оптимальном высоком уровне, а также постановка острого опыта по выявлению среднелетальной концентрации сульфата меди (водорастворимых солей тяжелых металлов) для на гидры зелёной и сравнение полученных результатов.

Литературные источники

1. Воронков Н.А. Основы общей экологии. М.: Агар, 1997
2. Гольд З.Г., Гольд В.М. Общая гидробиология. Учебно-методическое пособие, Красноярск, СФУ, 2013
3. Догель В.А. "Зоология беспозвоночных", Москва, "Советская наука", 1959
4. Моисеенко Т.И. Антропогенная изменчивость пресноводных экосистем и критерии оценки качества вод /Т.И. Моисеенко // Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем. – 2003. – Т. 19. –с. 72.
5. Моисеенко Т.И. Водная экотоксикология. Теоретические и прикладные аспекты. – Наука, 2009. – 400 с.
6. Стадницкий Г.В., Родионов А.И. Экология. СПб.: Химия, 1997
7. Старобогатов Я. И., Кутикова Л. А. Определитель пресноводных беспозвоночных Европейской части СССР
8. Флерова Б.А. Актуальные проблемы водной токсикологии / Б.А. Флерова.– Борок, 2004.–248 с.
9. Чертопруд М.В., Чертопруд Е.С. Краткий определитель беспозвоночных пресных вод центра европейской России. Москва, 2005
10. Шилова Н.А. Влияние тяжёлых металлов на представителей пресноводного фито- и зоопланктона в условиях засоления: диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук. СГТУ, Саратов, 2014
11. Штефан Дрейер, Райнер Кеплер /«Аквариум: рыбы, растения, гидротехника», Москва 2001 г.
12. Яхонтов А.А. "Зоология для учителя", т. 1, Москва, "Просвещение", 2001 г
14. Toxicity Effects of Selected Heavy Metals on *Lactuca sativa* and *Hydra viridissima* used for Sustainable Crop / Lina María Cáceres Díaz Claudia Campos// Environmental Management and Sustainable Development – 2018 - Vol. 7, No. 3- P 82-101
13. Hydra, a model system for environmental studies / Brian Quinn, Francois Gagne, Christian Blaise// Int. J. Dev. Biol. – 2012 –No.56 – P. 613-625
Интернет-ресурсы: ,
- 14.<http://enc-dic.com/soil/Mikrofauna-1144.html> Водные беспозвоночные - обитатели пресных водоемов средней полосы России (определитель основных таксонов)
- 15.<http://www.ecosystema.ru/04materials/tables/14.htm> - Экологический центр «Экосистема», образовательный портал.
- 16.<http://bio.krc.karelia.ru/misc/hydro/mon5.html> Тяжёлые металлы
- 17.www.kakerlakenparade.de **Kakerlakenparade** | *Hydra vulgaris* - Süßwasserpolyp

Приложение 1

Материалы и ход эксперимента (фото)



Приложение 2

Методика приготовления временных препаратов и правила работы с микроскопом

Правила приготовления временных препаратов:

Для приготовления временных микропрепаратов необходимо иметь набор предметных и покровных стекол, препаровальные иглы, лезвия бритвы, скальпели, стеклянные палочки для воды, пипетки, пинцеты, фильтровальную бумагу, некоторые реактивы, биноклярные лупы, микроскопы.

Предметное и покровное стекла промывают водой и протирают досуха салфеткой из мягкой ткани. Объект помещают в каплю воды на предметное стекло и накрывают покровным стеклом. Если жидкость на препарате выступает за края покровного стекла, то излишек ее удаляют полосками фильтровальной бумаги. Когда вода не покрывает всю площадь под покровным стеклом, пипеткой наносят близ края покровного стекла еще каплю, которая сама втягивается под стекло.

Техника приготовления временных микропрепаратов:

1. Микропрепараты готовят путем помещения объектов в каплю воды на предметном стекле, тщательно расправляя их с помощью препаровальных игл

и накрывая покровным стеклом. Избыток воды удаляется фильтровальной бумагой.

2. Приготовленный препарат рассматривается вначале при малом ($\times 8$, $\times 20$),

а затем при большом ($\times 40$, $\times 60$, $\times 90$ с иммерсией) увеличении микроскопа с осветителем. При использовании иммерсионной системы микроскопа на препарат наносят каплю кедрового масла и рассматривают без покровного стекла.

3. Рассматриваемые объекты зарисовываются и подписываются.

4. Узнать увеличение микроскопа, при котором рассматривается тот или иной объект, просто. Для этой цели необходимо умножить цифру, стоящую на объективе, на цифру, обозначенную на окуляре (эта цифра всегда со знаком \times). Например, при объективе 40 и окуляре $\times 10$, микроскоп дает увеличение в 400 раз.

Техника выполнения биологического рисунка:

Зарисовке зоологических объектов нужно уделять серьезное внимание, так как это не только способ оформления результатов наблюдения, но и метод эксперимента, позволяющий более детально изучить объект.

1. Рисунок должен быть четким, пропорциональным, правильно отражать результаты наблюдений, трактовку исследованных структур.

2. Схему строения рисуют при малом, а детальное строение отдельных клеток при большом увеличении микроскопа.

3. Располагают рисунок с левой стороны листа.

4. На правую сторону выносят стрелки с цифрами и расшифровывают их в подрисуночной подписи.

5. Рисунок должен быть крупным (не более двух на листе). Делают его простым карандашом

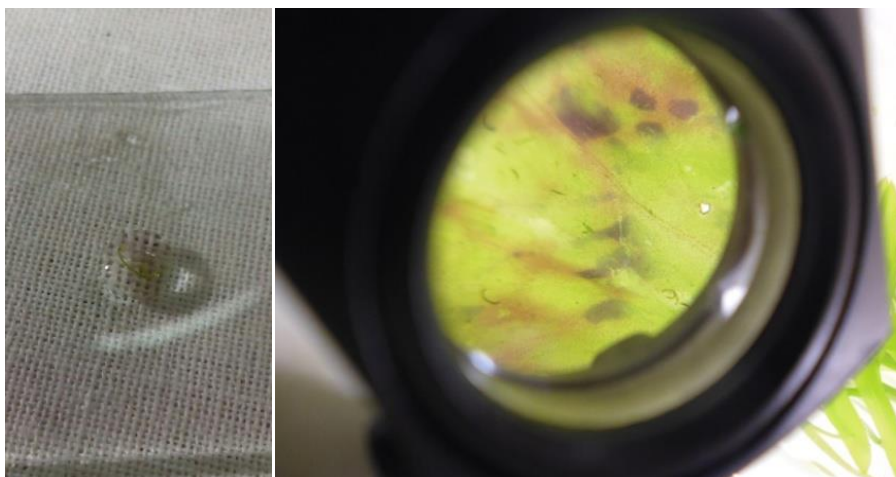


Приложение 3

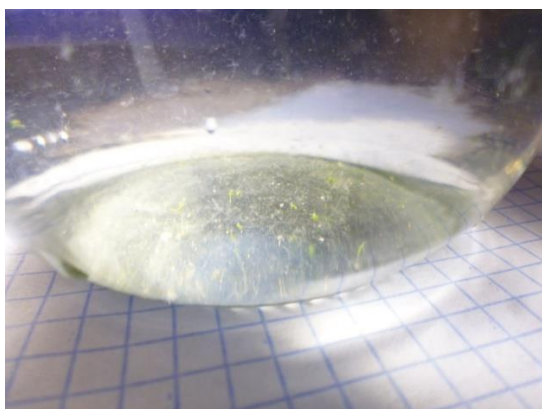
Метод отбора средней пробы воды

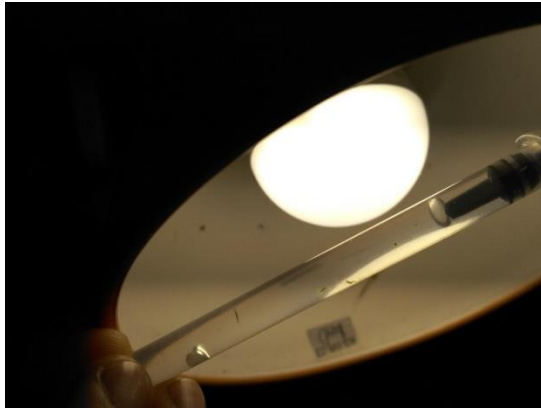
Средняя проба, поступающая на анализ, должна отражать качество всей исследуемой партии продукта. Для составления средней пробы вначале от однородной партии отбирают пробы (выемки), совокупность которых составляет исходный образец. Часть исходного образца, выделенная из него после тщательного перемешивания, является средней пробой (средним образцом).





Приложение 4
Визуальный метод подсчёта особей через шприц на свету





Приложение 5

Стадии насыщения гидры зелёной

1 и 2 стадия:

| | |
|--|--|
| | <p>Размер гидры на первой стадии – 8-15 мм (с учётом щупалец)</p> <p>Размер гидры на второй стадии: 5-10 мм (с учётом щупалец) – утолщения могут быть в любой части стебля</p> |
|--|--|

3 и 4 стадия:

| | |
|--|--|
| | <p>Размер гидры на первой стадии – 5-7 мм (с учётом щупалец)</p> <p>Размер гидры на второй стадии: 2-6 мм (с учётом щупалец)</p> |
|--|--|

При определении стадии насыщения гидры и её размера необходимо обеспечить полную статичность ёмкости, отсутствие любых раздражителей, излишне громких звуков.

Table 5. Comparative toxicity data for *Hydra viridissima* exposed to cadmium, chromium, zinc and boron with literature values for other species of *Hydra* and *Daphnia magna* (used for regulatory testing programs as indicator of toxicity)

| Toxic | Organism | Duration (hours) | LC ₅₀ ^b (mg/L) | Reference |
|----------------------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|----------------------------|
| Cadmium | <i>Hydra viridissima</i> | 96 | 0.002 | This study |
| | <i>Hydra viridissima</i> | 96 | 0.21 | Karntanut and Pascoe, 2002 |
| | <i>Hydra viridissima</i> | 96 | 0.003 | Holdway et al., 2001 |
| | <i>Hydra vulgaris</i> ^a | 96 | 0.16 | Karntanut and Pascoe, 2002 |
| | <i>Hydra oligatis</i> | 96 | 0.32 | Karntanut and Pascoe, 2002 |
| Chromium | <i>Hydra attenuata</i> | 96 | 0.17 | Quinn et al, 2007 |
| | <i>Hydra viridissima</i> | 96 | 0.33 | This study |
| | <i>Hydra attenuata</i> | 96 | 0.15 | Diaz-Baez and Perez, 2000 |
| Zinc | <i>Hydra viridissima</i> | 96 | 0.19 | This study |
| | <i>Hydra viridissima</i> | 96 | 11.0 | Karntanut and Pascoe, 2002 |
| | <i>Hydra viridissima</i> | 96 | 2.5 | Karntanut and Pascoe, 2005 |
| | <i>Hydra viridissima</i> | 96 | 0.93 | Holdway et al., 2001 |
| | <i>Hydra viridissima</i> | 96 | 11.0 | Karntanut and Pascoe, 2002 |
| | <i>Hydra vulgaris</i> ^a | 96 | 13.0 | Karntanut and Pascoe, 2002 |
| | <i>Hydra oligactis</i> | 96 | 14.0 | Karntanut and Pascoe, 2002 |
| | <i>Hydra vulgari</i> ^a | 96 | 2.3 | Pollino and Holdway, 1999 |
| | Boron | <i>Hydra viridissima</i> | 96 | - |
| <i>Daphnia magna</i> | | 48 | 141 | Maier and Knight, 1991 |

^a*Hydra vulgaris* also known as *Hydra attenuata* (Pollino and Holdway, 1999; Javois and Frazier-Edwards, 1991).

Изменение внешнего вида гидры зелёной под воздействием сублетальных и летальных концентраций ТМ. (14) :

ges were used as toxicity endpoints to estimate the median lethal concentration (96-h LC₅₀ lues in the definitive toxicity tests.

