

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТУСА

МОРАЛЕС КАМПОВЕРДЕ МАСІЕЛ АНАІ

Допускається до захисту:

в.о. завідувача кафедри,

ботаніки та екології

канд, біол. наук, доцент

_____ Машталер О.В.

« _____ » _____ 2025 р.

**ГІДРОМАКРОФІТИ ЯК ІНСТРУМЕНТ
ЕКОТОКСИКОЛОГІЧНОГО АНАЛІЗУ БАРВНИКІВ ДЛЯ ТЕКСТИЛЮ**

Спеціальність 091 Біологія та біохімія

Кваліфікаційна (магістерська) робота

Науковий керівник:

Руденко С.С., професор кафедри

ботаніки та екології,

д-р. біол.наук. професор

Оцінка: _____ / _____ /

Голова ЕК: _____

(підпис)

Вінниця 2025

АНОТАЦІЯ

Моралес Камповерде Масіел Анаї. Гідромакрофіти як інструмент екотоксикологічного аналізу барвників для текстилю. Спеціальність 091 «Біологія та біохімія», Освітня програма «Біологія». Донецький національний університет імені Василя Стуса, Вінниця, 2025

У роботі досліджено вплив двох найпопулярніших штучних барників текстильної промисловості – Конго червоного та Метиленового синього – на морфофізіологічні показники та життєздатність модельних гідромакрофітів. Як об'єкти дослідження обрані види з різними життєвими формами: плаваючий вид — пістія шарувата (*Pistia stratiotes* L.) та занурений вид — кушир занурений (*Ceratophyllum demersum* L.). Для кожного з модельних видів встановлено ЛД₅₀ за допомогою методів пробіт-аналізу та лінійної інтерполяції, а також визначено начутливіші морфофізіологічні тест-ознаки.

Ключові слова: Конго червоний, Метиленовий синій, *Pistia stratiotes* L., *Ceratophyllum demersum* L., ЛД₅₀, морфофізіологічні параметри.

Табл. 23. Рис.24. Бібліограф.: 46.

ANNOTATION

Morales Campoverde Maciel Anai. Hydromacrophytes as a tool of ecotoxicological analysis of dyes for textiles. Specialty 091 «Biology and Biochemistry», Programme «Biology». Vasyl' Stus Donetsk National University, Vinnytsia, 2025.

The work investigated the influence of the two most popular artificial dyes in the textile industry – Congo red and Methylene blue – on the morphophysiological parameters and viability of model hydromacrophytes. Species with different life forms were selected as objects of study: a floating species – *Pistia stratiotes* L. and a submerged species – *Ceratophyllum demersum* L.. For each of the model species,

LD50 was established using probit analysis and linear interpolation methods, and the most sensitive morphophysiological test signs were also determined.

Keywords: Congo red, Methylene blue, *Pistia stratiotes* L., *Ceratophyllum demersum* L., LD50, morphophysiological parameters.

Table. 23. Fig. 24. Bibliography: 46.



ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	10
РОЗДІЛ 2 ОБЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕННЯ	21
2.1. Об'єкти дослідження	21
2.2. Характеристика синтетичних барвників та обладнання	24
2.3. Методика постановки експерименту	28
2.4. Статистична обробка результатів	32
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	35
3.1. Вплив Конго червоного на морфофізіологічні показники куширу зануреного (<i>Ceratophyllum demersum</i> L.).....	35
3.2 Вплив Конго червоного на морфофізіологічні показники пістії шаруватої (<i>Pistia stratiotes</i> L.)	39
3.3. Вплив Метиленового синього на морфофізіологічні показники куширу зануреного (<i>Ceratophyllum demersum</i> L.).	43
3.4. Вплив Метиленового синього на морфофізіологічні показники пістії шаруватої (<i>Pistia stratiotes</i> L.)	47
3.5. Порівняльний аналіз впливу досліджуваних синтетичних барвників на морфофізіологічні показники <i>Pistia stratiotes</i> L. та <i>Ceratophyllum demersum</i> L..	51
3.6. Розрахунок ЛД ₅₀ для модельних гідромакрофітів під впливом Конго червоного та Метиленового синього із застосуванням пробіт-аналізу та лінійної інтерполяції між сусідніми точками	53
3.7. Співставлення результатів оцінки ЛД ₅₀ та морфофізіологічних змін модельних гідромакрофітів	66
ВИСНОВКИ	69
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ПОСИЛАНЬ	71

ВСТУП

Актуальність теми. Барвники – це речовини, які покращують зовнішній вигляд готових виробів, забезпечуючи однорідний колір. Фарбування – це процес нанесення барвників, що закріплюються у текстильних волокнах. Процес фарбування охоплює різні етапи, включаючи попередню обробку, знежирення, відбілювання, карбонізацію, дегумування та мерсеризацію. Вода вважається основним середовищем для нанесення барвників та інших хімічних речовин для цієї обробки в процесі фарбування. Процес фарбування містить багато токсичних хімічних речовин, металів та нерозчинних речовин, таких як стічні води, які потрапляють у навколишнє середовище. Зазначається, що під час фарбування для виробництва 1 кг волокна потрібно близько 50-300 літрів води. З іншого боку, для виробництва 50 000 метрів щоденного виробництва щодня потрібно 1-2 мільйони літрів води. Ця величезна кількість токсичних стічних вод є дуже шкідливою для навколишнього середовища, здоров'я людини, водної системи, ґрунту, повітря, води, рослин та тварин [23].

У текстильній промисловості використовується до 200 тонн води на тонну тканини. Більшість цієї води повертається в природу як токсичні відходи, що містять залишкові барвники та небезпечні хімічні речовини. Утилізація стічних вод рідко регулюється, дотримується або контролюється, що означає, що самі власники фабрик залишаються безвідповідальними [35].

Забруднюючі речовини, що виділяються на різних етапах обробки текстилю, здійснюють негативний вплив на навколишнє середовище, порушуючи харчовий ланцюг, екосистему та загальний екологічний баланс [36].

Текстильні барвники є стрімко зростаючими забруднювачами навколишнього середовища у всьому світі. Вони можуть бути безпосередньо скинуті з текстильної промисловості у водні об'єкти, які є прямим джерелом для всієї екосистеми, зрештою впливаючи на людей. Аналіз відповідної

літератури показав, що стічні води текстильних барвників можуть впливати на водну біоту, порушуючи її ріст та розмноження. Різні водні організми є мішенню стічних вод текстильних барвників. У таких організмах ці хімічні речовини впливають на їхній розвиток, поведінку та викликають окислювальний стрес.

У світі щорічно виробляється майже 700 000 тонн барвників. Азобарвники широко використовуються в текстильній та паперовій промисловості завдяки їхній низькій вартості та простоті застосування. Їхнє широке використання призводить до скидання великих обсягів стічних вод у водні екосистеми. Викиди великих обсягів становлять ризик для здоров'я, оскільки багато з цих барвників, таких як Конго червоний, виготовляються з бензидином, відомою канцерогенною сполукою [21]. Натомість інформація щодо токсичності барвників у водних екосистемах обмежена.

Широкі верстви населення піддається впливу текстильних барвників через харчовий ланцюг та вживання забрудненої води. У організмі людини текстильні барвники біотрансформуються в електрофільні проміжні продукти та ароматичні аміни ферментами родини цитохромів.

Текстильні барвники та продукти їх біотрансформації утворюють аддукти ДНК та білків на субклітинній основі. Більше того, ці сполуки каталізують утворення вільних радикалів та оксидативний стрес, а також запускають апоптотичні каскади, що призводять до уражень у багатьох органах. Крім того, текстильні барвники модулюють епігенетичні фактори, такі як ДНК-метилтрансфераза та гістондеацетилаза, що сприяє канцерогенезу [15].

Стічні води, що скидаються виробництвом барвників та оздобленням текстилю, стали екологічною проблемою. Заводи з фарбування текстилю використовують різноманітні синтетичні барвники та скидають величезну кількість стічних вод від фарбування, оскільки поглинання цих барвників тканинами дуже низьке. Фотосинтетична активність рослин значно погіршується цими сильно забарвленими стічними водами від фарбування

текстилю, що погіршує водне життя через низьке проникнення світла та споживання кисню. Через наявність важких металів та хлору в синтетичних барвниках, вони також можуть бути шкідливими для деяких водних організмів [14].

Азобарвники представляють найважливіший клас текстильних барвників. Їх біотрансформація різними бактеріями шкіри може вивільняти ароматичні аміни, які можуть значною мірою поглинатися шкірою. Деякі ароматичні аміни добре відомі своїми генотоксичними та/або канцерогенними властивостями. Відповідно, азобарвники, що вивільняють один у з 22 відомих канцерогенних ароматичних амінів, заборонені для використання в текстильних виробках одягу в Європейському Союзі. Мутагенні ароматичні аміни в текстильних азобарвниках викликають набагато більше занепокоєння, ніж очікувалося раніше, що тягне за собою наслідки для дизайну продукту та, можливо, для регулювання азобарвників у майбутньому [11].

Деякі азобарвники можуть бути канцерогенними, не розщеплюючись на ароматичні аміни. Однак канцерогенність багатьох азобарвників зумовлена продуктом їх розщеплення, таким як бензидин. Бензидин викликає різні пухлини у людей і тварин. Інший компонент азобарвника, п-фенілендіамін (п-ФДА), є контактним алергеном. Повідомляється, що багато азобарвників та їх відносно розщеплені продукти, а також хімічно споріднені ароматичні аміни впливають на здоров'я людини, викликаючи алергію та інші захворювання людини [13].

Синтетичні барвники значною мірою замінили натуральні барвники завдяки їхній чудовій стійкості до прання, нагрівання, світла, рН та впливу біологічних агентів. Азобарвники, сірчані барвники та пігментні барвники – це деякі приклади барвників, що використовуються в промислових процесах. На жаль, барвники становлять серйозну екологічну загрозу, будучи канцерогенними та мутагенними для людини. Крім того, їхня стійкість до

деградації через їхні ксенобіотичні властивості та хімічну структуру посилює проблему [16].

Резолюція Європейського парламенту «Strategy for Sustainable and Circular Textiles» від 2023 року [17] закликає до цілісного підходу, що охоплює весь ланцюжок створення вартості в текстильній промисловості, сприяє сталому розвитку практик та забезпечує дотримання законодавства ЄС щодо хімічних речовин. Зрештою, вона спрямована на перехід до циркулярної економіки для текстилю, зменшення шкоди для навколишнього середовища та забезпечення справедливих умов праці.

За цих умов, важливо проаналізувати потенційні несприятливі наслідки впливу текстильних барвників на водні рослини, водну фауну, наземних істот та людей.

Метою даної магістерської роботи було дослідження екотоксикологічного впливу таких популярних синтетичних барвників як Конго червоний (Congo Red) та Метиленовий синій (Methylene Blue) на морфофізіологічні показники та життєздатність модельних гідромакрофітів.

Згідно мети були визначені такі **завдання**:

1. Порівняти токсичність для гідромакрофітів двох популярних текстильних барвників – Конго червоного (Congo Red) та Метиленового синього (Methylene Blue).

2. Обрати для досліджень модельні види рослин з різними життєвими формами: як плаваючий вид використати пістію шарувату (*Pistia stratiotes* L.), а як занурений вид — кушир занурений (*Ceratophyllum demersum* L.).

3. Порівняти вплив обраних текстильних барвників на морфофізіологічні показники модельних рослин і визначити для кожного з них найбільш чутливі тест-ознаки.

4. Розробити інтегральний показник для можливості порівняння токсичної резистентності видів з відмінними морфофізіологічними параметрами.

4. Визначити ЛД50 для досліджуваних водних макрофітів під впливом Конго червоного та Метиленового синього, використовуючи для цього два альтернативних методи –метод пробіт-аналізу та метод лінійної інтерполяції.

Об’єктом роботи – є водні макрофіти, а **предметом досліджень** – вплив синтетичних барвників на занурені і плаваючі види гідромакрофітів.



РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Історія створення синтетичних барвників

Використання кольорів сягає кам'яного віку (перші звітки про печерні малюнки); колір зробив свій внесок у соціальний та символічний розвиток цивілізацій. У деяких з них колір асоціювався з ієрархією, владою та лідерством. Поява синтетичних барвників зробила революцію в індустрії кольорів; і завдяки їхній низькій вартості їх використання поширилося на різні промислові сектори. Хоча відсоток кольорових стічних вод, що скидаються текстильною, харчовою, фармацевтичною, косметичною та паперовою промисловістю, серед інших виробничих галузей, невідомий, токсичний ефект та екологічні наслідки їх скидання у водойми є шкідливими.

L. D. Ardila-Leal зі співав. [4] здійснили короткий історичний огляд, пов'язаний з відкриттям та використанням натуральних та синтетичних барвників. Вони підсумували вплив на навколишнє середовище, спричинений скиданням неочищених або погано очищених кольорових стічних вод у водойми, а також узагальнили досвід фізичних, хімічних та біологічних обробок для зменшення кольорових одиниць та покращення важливих фізико-хімічних параметрів.

Історію синтетичних текстильних барвників дев'ятнадцятого століття та їхню ідентифікація на тканині дослідив також R.M. Baker [6]. Зокрема, він з'ясував, що хоча перший синтетичний барвник був виготовлений в Англії, центр промисловості незабаром перемістився до Німеччини та Швейцарії.

Хімічні особливості азобарвників

Детальний огляд різних класифікацій азобарвників як функції кількості азогруп та відповідних функціональних груп знаходимо у праці [7]. У цій роботі автори розглянули також деякі хімічні властивості цих барвників, такі як реакційна здатність, ізомеризація та таутомерія.

Класифікації барвників та впливу синтетичних текстильних барвників на водну флору присвячена також робота J. Sharma та ін. [39]. У цьому огляді

розглядається вплив текстильних барвників на водойми, водні мікрородорості та макрофіти. Також розглядаються різні класи барвників, які класифікуються за їх розчинністю у воді. Ці барвники бувають кислотними, основними, прямими, дисперсними, кубовими, сірковими та пігментними. Оскільки барвники не міцно зв'язуються з тканиною; їх викид у вигляді стічних вод у водне середовище може коливатися від 2% для основних барвників до 50% для реактивних барвників. Через необізнаність та постійний викид текстильних барвників без попередньої обробки в навколишнє середовище та їх стійкість, вони постійно збільшують ризик для водної флори та знижують якість води, такі як евтрофікація, запах, колір та каламутність, а також довгострокову небезпеку, таку як накопичення канцерогенних продуктів, стійкість та утворення побічних продуктів. Вони також спричиняють канцерогенність та мутагенність.

Конго червоний – найвикористованіший азобарвник

Конго червоний – один із найвідоміших та найвикористовуваних азобарвників, який має два азозв'язки ($-N=N-$) хромофори у своїй молекулярній структурі. Його структурна стабільність робить його високотоксичним та стійким до біодеградації.

Барвник Конго червоний є органічним забруднювачем, що викликає занепокоєння щодо навколишнього середовища. Він застосовується в текстильній, поліграфічній, фарбувальній та гумовій промисловості як барвник. Канцерогенність, мутагенність та різні пов'язані з цим токсичні властивості конго червоного для флори, фауни та людини зумовили вимоги щодо його видалення з промислових (стічних) вод, що містять цей барвник.

В огляді [41] підсумовано токсичність конго червоного барвника для різних живих форм. Основна увага приділяється мутагенним, тератогенним та канцерогенним наслідкам дії конго червоного та його метаболітів. Також обговорюються механізми канцерогенності азобарвників.

В іншому огляді [29] відібрано та проаналізовано 300 дослідницьких та оглядових публікацій, присвячених токсичному впливу барвника конго червоного на водну фауну та флору. Причому барвник виявився фітотоксичним для водної флори та здатним впливати на репродуктивну активність водної фауни. Крім того, були ретельно досліджені та обговорені стратегії видалення конго червоного. Автори підкреслюють, що технологія адсорбції пропонує найкращий шлях для деконтамінації конго червоного завдяки деяким притаманним перевагам, таким як регенеративність (ад)сорбентів, відсутність утворення вторинних токсичних забруднювачів, простота та низька вартість порівняно з іншими. Цей синтез завершується рекомендаціями щодо досліджень у сферах адсорбції на колонках та оцінки адсорбції/видалення конго червоного у присутності коорганічних/неорганічних забруднювачів.

К.С.Rani та ін. [34] розробили технологію видалення конго червоного з води з використанням недорогого кокосового залишкового волокна. Кокосове залишкове волокно є основним побічним продуктом, що отримується під час виробництва кокосової олії першого віджиму.

Робота N. Asses та ін. [5] присвячена знебарвленню, біодеградації та детоксикації конго червоного за допомогою *Aspergillus niger*. Біоконверсія конго червоного під впливом цього цвілевого гриба утворювала метаболіти розпаду. Тести на фітотоксичність та мікротоксичність підтвердили, що метаболіти розпаду були менш токсичними, ніж вихідний барвник.

Вплив барвників на довкілля

М. Berradi та ін. [8] дослідили вплив барвників для оздоблення текстилю на водне середовище. Вони описали різні родини барвників та пігментів, що використовуються в процесах оздоблення текстилю (пряжа, тканини, неткані матеріали, в'язані вироби та килими), таких як фарбування та друк. Ці барвники є реактивними, прямими, диспергованими, індиго, сірчаними та чановими. Таким чином, їхня присутність у рідких стічних водах, що утворюються в

результаті прання текстилю, становить серйозну загрозу, за відсутності їх очищення, для якості приймаючих водних середовищ. Автори показали, що присутність цих барвників та пігментів може спричинити значні зміни екологічних умов водної фауни та флори через відсутність їхньої біорозкладності. Це негативно впливає на рівновагу водного середовища, спричиняючи серйозні небезпеки, а саме: очевидні (евтрофікація, недостатня оксигенація, колір, каламутність та запах), довгострокові небезпеки (стійкість, біоаккумуляція канцерогенних ароматичних продуктів та утворення побічних продуктів хлорування), мутагенність та канцерогенність.

Оглядова стаття інших авторів [26] також зосереджена на впливі текстильних барвників у водному середовищі, зокрема на водорості, риб і, зрештою, на людину.

Через високу шкодочинність синтетичних барвників все більшу увагу дослідників привертають натуральні барвники як більш стійкі альтернативи синтетичним. У огляді [30] обговорюється тема натуральних барвників, надається опис їхніх основних характеристик та відмінностей порівняно із синтетичними барвниками, а також викладаються останні дослідження в галузі натуральних барвників з особливим акцентом на такі галузі екологічно чистих інновацій: методи екстракції, підготовка субстратів, процес травлення та процес фарбування. Підсумовуючі огляд літератури з питань застосування натуральних барвників, автори відзначають перспективні нові технології та методи успішно застосовані для покращення продуктивності та сталості процесів натурального фарбування, але кілька обмежень, таких як низька стійкість натуральних барвників, їхня низька спорідненість з текстильними субстратами, труднощі з відтворюваністю відтінків, а також інші фактори, такі як міркування економічної ефективності, все ще заважають промисловості впроваджувати натуральні барвники у більших масштабах і вимагатимуть подальших досліджень, щоб розширити їх використання за межі нішевих застосувань.

Водночас, не всі автори розділяють думку про небезпеку синтетичних барвників і необхідність їх заміни натуральними. Так М. Vide зазначає «Нещодавно «сталий розвиток» та помилкові припущення про те, що натуральне = нешкідливе, а синтетичне = токсичне, спонукали до появи великої кількості дослідницької літератури, яка (пере)досліджує натуральні барвники. У літературі ігноруються фактори, які спочатку призвели до їх відмови. Крім того, натуральні барвники не можуть виробляти кількість барвника, необхідну для фарбування кількості волокна, що виробляється щороку. Натомість, синтетичні барвники всіх класів та процеси, що використовуються для їх нанесення, стають дедалі ефективнішими та чистішими, а також пропонують безпечне та економічно вигідне фарбування для текстилю в усьому світі» [9].

І все ж, однією з можливих екобезпечних і економічно ефективних альтернатив синтетичним барвникам можуть стати бактеріальні пігменти, оскільки вони швидше розкладаються та є більш екологічно чистими. Автори [20] вважають, що цей тип пігментів з одного боку відповідає запитам у суспільстві щодо натуральних барвників, а з іншого – демонструє антиоксидантні та протиракові властивості, а також здатність підвищувати товарний вигляд товарів.

Оцінка забруднення водних екосистем синтетичними барвниками за допомогою біоіндикаторів

В. Adomas [1] та ін. дослідили вплив **конго** червоного (КР) на шлях біосинтезу біогенних амінів (БА) у *Lemna minor* L. (ряски звичайної). Автори встановили, що барвник пригнічує ріст, вихід біомаси та біосинтез хлорофілу *a* у ряски звичайної. Дослідники показали, що активність декарбоксилази в біосинтезі БА у рясці звичайній також є корисним показником для оцінки токсичності барвника.

Метою дослідження М. Hernandez-Zamora та ін. [21] стала оцінка впливу барвника Конго Червоного на виживання та розмноження *Ceriodaphnia dubia*. Автори визначили 48-годинну медіанну летальну концентрацію (LC₅₀) та

оцінили вплив сублетальних концентрацій при субхронічному впливі, використовуючи як їжу або свіжі водорості, або водорості, попередньо оброблені барвником. LC_{50} становила 13,58 мг/л. У субхронічних дослідженнях виживання знизилося до 80 та 55%, а фертильність - до 40 та 70% порівняно з контролем у *C. dubia*, яку годували інтоксикованими клітинами або сумішшю інтоксикованих та свіжих водоростей відповідно, тому кількість та тип їжі мали значний вплив. Було зроблено висновок про те, що Конго Червоний є високотоксичним для *C. dubia*, оскільки він пригнічує виживання та фертильність у концентраціях, що перевищують 3 мг/л. Результати досліджень засвідчили, що цей барвник має негативний вплив при дуже низьких концентраціях. Автори попереджають про ризик, пов'язаний зі скиданням Конго Червоного у водне середовище.

Р. Mahajan та J. Kaushal [25] дослідили можливості деградація барвника Конго червоного у водному розчині з використанням фіторе mediaційного потенціалу макроводорості *Chara Vulgaris*. Ефективність біологічного знебарвлення досліджували за допомогою УФ-видимої та ІЧ-Фур'є спектроскопії. Було виявлено, що *Chara vulgaris* ефективно деградує барвник Конго червоний у водному розчині за допомогою процесу фітоекстракції.

Нові дані про *Ceratophyllum demersum* L. як біоіндикатор забруднення навколишнього середовища представили автори [22]. За допомогою комбінованих фізичних методів (спектроскопії перетворення Фур'є (FTIR), скануючої електронної мікроскопії (SEM) та рентгенівського мікроаналізу) вони довели, що *Ceratophyllum demersum* L. має здатність активно реагувати на зміни хімічного складу води збільшенням інтенсивності смуг поглинання, пов'язаних із забруднювачами.

Робота К. Nemeth та ін. [28] може бути цікавою для тих, хто використовує *Ceratophyllum demersum* L. як модельний вид для біоіндикаційних чи інших досліджень. Після дослідження морфологічного різноманіття цієї рослини в різних водних середовищах існування та точного вимірювання її загальної

площі поверхні, автори запропонували методи для легкого розрахунку або оцінки цієї ознаки: або на основі змінних, які можна записати в польових умовах, не пошкоджуючи рослини, або на основі даних, отриманих з літератури. Найбільша морфологічна різноманітність у *C. demersum* була зумовлена мінливістю кількості та загальної довжини міжвузлів, тоді як діаметр міжвузлів та площа мутовки листка змінювалися менше.

В іншій роботі *Ceratophyllum demersum*, повсюдно поширена занурена водна рослина, була випробувана як пасивний біоіндикатор забруднення мікрометалами. Автори дійшли висновку, що *C. demersum* може бути використаний як відповідний біомонітор забруднення слідами металів у районах з диверсифікованим та багатофакторним техногенним впливом [31].

Стічні води з текстилю негативно впливають на водойми через наявність барвників. Системи ставків, засаджені *Lemna minor*, рекомендуються як дешева та ефективна альтернатива для видалення барвників. Метою цього дослідження є оцінка впливу накопичення барвників на швидкість росту рослин за допомогою методу обробки зображень [46]. Експеримент зі ставками проводився в контрольованих умовах шляхом підготовки імітованих стічних вод. Швидкість росту *L. minor* контролювалася залежно від відносної швидкості росту, площі покриття та кольору рослин за допомогою програмного забезпечення Aletheia Lemna Edition та кольорової діаграми Munsell. Результати чітко показують, що барвник basic red 46 значно ефективніше обробляється порівняно з іншими барвниками. Крім того, наявність барвників негативно впливає на рослини. Крім того, програмне забезпечення змогло кількісно визначити параметри росту, що забезпечує краще розуміння рослини в довгостроковій системі обробки.

Метою дослідження [21] було вивчення видалення барвника метиленового синього за допомогою ряски малої (*Lemna minor*). *L. minor* піддавали впливу 50 мг/л метиленового синього протягом 24 годин. Значення поглинання вимірювали через 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 та 24 години з максимальною

довжиною хвилі 665 нм. Спостерігали відсоток видалення барвника та відносну швидкість росту *L. minor* під час впливу метиленового синього. Відсоток видалення становив $80,56 \pm 0,44\%$ протягом 24 годин з відносною швидкістю росту 0,006/год. Автори дійшли висновку, що *L. minor* має потенціал як фіторе mediaційний агент для видалення барвників зі стічних вод.

Дослідження [19] було проведено з метою оцінки потенціалу водного макрофіта *Pistia stratiotes* до накопичення слідів металів, перспектив фіторе mediaції та ймовірності його використання як біоіндикатора для різних типів забруднення. Автори встановили, що значна позитивна кореляція Ni та Cd у воді з такими ж вмістами в коренях і листках рослин, а також реакція росту цієї рослини на різні забруднювачі можуть свідчити про її потенційне використання як біоіндикатора цих забруднювачів у воді.

V.Soni та ін. [42] дослідили вплив синтетичних та рослинних барвників на фотосинтез та активність ферментів, що поглинають активні форми кисню (АФК) у такого водного макрофіта як *Spirodela polyrhiza*. Отримані результати підтверджують, що *S. polyrhiza* є ефективним біоіндикатором для моніторингу забруднення сульфатними фарбами у водному середовищі. Це дослідження підкреслює нагальну потребу заміни синтетичних барвників екологічно чистими альтернативами, оскільки притаманні їм гідроксипропілцелюлози не лише зменшують екологічні ризики, але й покращують ріст і продуктивність водних рослин. Дослідження надає нове розуміння різних фізіологічних реакцій водних рослин на синтетичні та рослинні барвники, підкреслюючи важливість просування стійких, нетоксичних барвників для захисту водних екосистем.

Фіторе mediaція – екологічно чистий та неруйнівний метод видалення барвників з води та ґрунту

Фіторе mediaція – це перспективна зелена технологія для очищення різних промислових стічних вод. Зокрема, водні рослини широко використовуються для видалення барвників та токсичних металів із забрудненого середовища.

Очищення промислових та побутових стічних вод за допомогою водних макрофітів вважається перспективною технологією, а також альтернативним методом традиційним методам очищення в останні роки. Деякі характеристики цієї природної технології очищення, такі як низькі капітальні та експлуатаційні витрати, простота експлуатації та низька енергоємність, роблять системи на основі водних макрофітів дуже привабливими для очищення стічних вод.

К. G. Ahila та ін. [2] дослідили фіторе mediaційну здатність таких водних макрофітів, як *Pistia stratiotes* L., *Salvinia adnata* Desv. та *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle до видалення забруднюючих речовин зі стічних вод фарбувальних установок. *P. stratiotes* L. ефективно видаляла 86% кольору, 66% загальної кількості сухої речовини, 61,33% хлориду. Результати дослідження довели, що серед досліджених водних рослин *P. stratiotes* L. демонструє найвищий потенціал ремедіації, який може бути використаний як екологічно безпечний метод очищення промислових стічних вод та водойм, забруднених стічними водами фарбувальних підприємств.

Y. Uysal та ін. [43] дослідили потенціал ще одного водного макрофіта – ряски малої (*Lemna minor* L.), вирощеної в лабораторній системі ставків, для видалення кольору з промислових стічних вод. Згідно з результатами, відсоток видалення кольору системою постійно зменшувався з часом. Максимальна ефективність видалення для системи з часом гідравлічного утримування 3 дні становила 66,1% для Pt-Co (платино-кобальтової кольорової одиниці) та 68,2% для DFZ (європейської норми кольору для трьох довжин хвиль).

Характеристику та очищення текстильних стічних вод водними рослинами (макрофітами) та водоростями дослідили також С. Roу та ін. [37]. Як макрофіти, так і водорості демонстрували значну тенденцію до поглинання важких металів, але *Eichhornia crassipes* була визначена як найефективніша у видаленні барвників та важких металів завдяки своїй розгалуженій кореневій системі. Для видалення кольору зі стічних вод було підготовлено адсорбент на основі ейхорнії, який виявився здатним видалити 58% кольору.

Видалення метиленового синього з водного розчину неживою біомасою морських водоростей та прісноводних макрофітів дослідили X. S. Wang та ін. [45]. Автори довели, що досліджені адсорбенти можуть служити недорогими адсорбентами для видалення метиленового синього з водного розчину.

V. V.Chandanshive та ін. [12] запропонували технологію фіторе mediaції барвників з текстильних стічних вод *in situ* з використанням садових декоративних рослин (*Tagetes patula*, *Aster amellus*, *Portulaca grandiflora*, *Gaillardia grandiflora*). На думку авторів, «загальне спостереження свідчить про те, що використання садових декоративних рослин на грядках штучних водно-болотних угідь для очищення барвників від стічних вод разом з консорціумами ґрунтової мікробної флори є мудрою та естетично приємною стратегією».

У статті [14] обговорюються різні методи обробки стічних вод від фарбування текстилю. Методи очищення, представлені в цьому дослідженні, включають методи окислення, фізичні та біологічні методи. Також у статті зібрано всі оновлені дані про характеристику стічних вод фарбування текстилю та їх вплив на навколишнє середовище з різних журналів та веб-сайтів, а також деякі з особистого спілкування з деякими фабриками. Автори, вважають, що оскільки в текстильній промисловості використовується широкий спектр синтетичних барвників, а саме азобарвник, кубовий барвник, реактивний барвник, дисперсний барвник, то деякі фізико-хімічні параметри стічних вод фарбування вже перевищили свої стандартні межі. Наприкінці зроблено висновок про те, що в наші дні належний моніторинг та коригувальні заходи, такі як процес усунення, стали найнеобхіднішими завданнями в усьому світі, особливо в країнах, що розвиваються, та країнах з перехідною економікою. Автори закликають вжити негайних заходів для мінімізації викидів в навколишнє середовище внаслідок скидання необроблених відходів фарбування текстилю.

A. Negi [27] запропонував економічно ефективні методи мікробної деградації відходів текстильної промисловості, в тому числі непрореагованих

барвників. На думку дослідника, інтеграція мікробів не лише пропонує рішення для управління великими обсягами текстильних відходів, але й прокладає шлях для сталих технологій.

Критичний огляд очищення стічних вод, що містять барвники: екотоксикологічні та медичні проблеми, пов'язані з текстильними барвниками, та можливі підходи до відновлення для екологічної безпеки здійснили R. Al-Tohamy та ін. [3].

Було протестовано чимало інших підходів до біоре mediaції, що включають водорості, гриби, бактерії, методи біомембранної фільтрації тощо, а деякі інші гібридні системи наразі досліджуються для обробки стічних вод текстильних барвників. Однак багато таких підходів перебувають на стадії випробувань і потребують подальших досліджень для розробки більш ефективних, економічно вигідних та простих у використанні методів.

РОЗДІЛ 2 ОБЄКТИ, МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкти дослідження

Гідромакрофіти як біологічні індикатори водного середовища дозволяють оцінити токсикологічний стан екосистем через морфологічні та фізіологічні зміни у їхній структурі. Для проведення експериментального дослідження впливу синтетичних барвників на водні рослини було обрано два види гідрофітів з різними екологічними характеристиками та адаптаційними можливостями. Кушир занурений (*Ceratophyllum demersum* L.) належить до занурених макрофітів, які постійно перебувають у водному середовищі та характеризуються високою чутливістю до змін хімічного складу води. Пістія шарувата (*Pistia stratiotes* L.) представляє групу плаваючих гідромакрофітів, які контактують як з водним середовищем через кореневу систему, так і з атмосферним повітрям через листову поверхню.

Кушир як модельний об'єкт екотоксикологічних досліджень демонструє швидку реакцію на присутність поллютантів у водному середовищі через відсутність кореневої системи та повну залежність від процесів дифузії речовин через епідерміс. Морфологічна будова куширу зануреного характеризується наявністю тонко розсічених листків, які забезпечують велику площу контакту з водним середовищем та інтенсивний газообмін. Фотосинтетичний апарат роголистника містить хлорофіли а і б у співвідношенні, типовому для занурених водних рослин, що забезпечує ефективне використання світлової енергії в умовах обмеженої освітленості. Вибір цього виду обумовлений його широким розповсюдженням у природних водоймах України та здатністю акумулювати токсичні речовини у тканинах, що робить його перспективним тест-об'єктом для біоіндикації.

Пістія шарувата характеризується специфічною морфологією, що включає розетку опушених листків та розгалужену кореневу систему, яка виконує функції механічного фільтра та біохімічного сорбенту. Фізіологічні особливості пістії включають інтенсивний транспіраційний процес через

листову поверхню та активне поглинання мінеральних речовин з водного середовища через корені. Адаптаційні механізми цього виду дозволяють йому витримувати значні коливання температури та хімічного складу води, однак тривалий вплив токсичних сполук викликає незворотні морфологічні зміни. Біологічна продуктивність пістії у природних умовах може досягати високих показників, що свідчить про активний метаболізм та чутливість до факторів довкілля. У табл 2.1 наведена стисла ботанічна характеристика досліджуваних видів.

Таблиця 2.1 – Ботанічна характеристика модельних видів рослин

Модельний вид рослин	Морфо-фізіологічні особливості виду	Вигляд
Кушир занурений (<i>Ceratophyllum demersum</i> L.) – модель зануреного гідромакрофіта	Справжніх коренів у куширу немає. Його роль виконують особливі бліді, майже безбарвні гілки в нижній частині стебла. Вони проникають в мул і, як якорі, утримують рослину. Поживні (мінеральні) речовини поглинає вся поверхня рослини: і стебло, і листя, а не коріння, як у більшості інших рослин. Розмножується шляхом поділу стебла або живцювання. Для цього відрізають частину стебла з листям, яку потім можна залишити плавати у воді або прикріпити до каменя, щоб вона швидко вкорінилася та почала рости.	
Пістія шарувата (<i>Pistia stratiotes</i> L.) – модель плаваючого гідромакрофіта	Розетка товстого м'якого листя пістії шаруватої вільно плаває на поверхні води, в той час як корені звисають у її товщу. Пістія дуже ефективно розмножується, розкидаючи stoloni, різновид стебла, по поверхні води. Рослини швидко розвиваються на кінці цих столонів і залишаються прикріпленими до материнської рослини, доки не утвориться коріння.	

У таблиці 2.2 представлені морфометричні характеристики об'єктів дослідження на початку експерименту.

Таблиця 2. 2 Морфометричні характеристики об'єктів дослідження на початку експерименту

Показник	<i>Ceratophyllum demersum</i>	<i>Pistia stratiotes</i>
Довжина пагонів/діаметр розетки, см	15-20	8-12
Кількість листкових мутовок/листіків	8-12	6-10
Довжина коренів, см	відсутні	4-7
Маса однієї рослини, г	$2,5 \pm 0,3$	$4,8 \pm 0,6$
Колір листків	темно-зелений	світло-зелений

Підготовка рослинного матеріалу до експерименту включала ретельне промивання дистильованою водою для видалення можливих забруднень та епіфітних організмів. Кушир розділявся на фрагменти довжиною 5 см з однаковою кількістю листкових мутовок для забезпечення порівнянності результатів між дослідними варіантами. Пістія використовувалася у вигляді цілих рослин без пошкоджень розетки та кореневої системи. Маркування кожної експериментальної одиниці проводилося за допомогою водостійких етикеток з вказівкою виду рослини, номера варіанта та дати початку експерименту. Розміщення рослин у експериментальних ємностях здійснювалося таким чином, щоб забезпечити рівномірний доступ до світла та мінімізувати взаємне затінення.

Контрольна група рослин утримувалася у відстояній водопровідній воді з фізико-хімічними параметрами: температура $22 \pm 2^\circ\text{C}$, рН $7,2 \pm 0,3$, вміст розчиненого кисню $6,5 \pm 0,5$ мг/л. Стабільність контрольних умов забезпечувалася щоденним моніторингом основних параметрів водного середовища та заміною води кожні три доби. Кількість рослин у контрольних ємностях відповідала кількості в дослідних варіантах для забезпечення коректності порівняння результатів. Спостереження за контрольною групою

дозволило встановити базові показники життєдіяльності гідромакрофітів за відсутності токсичного впливу.

Дослідні варіанти включали експозицію рослин у водних розчинах синтетичних барвників різних концентрацій протягом визначеного періоду часу. Градація концентрацій барвників була обрана на основі попередніх літературних даних про токсичність азобарвників та тіазинових сполук для водних організмів. Тривалість експерименту становила 14 діб, що відповідає рекомендованому періоду для виявлення хронічної токсичної дії на вищі рослини. Повторність дослідів забезпечувалася триразовим дублюванням кожного варіанта з використанням окремих експериментальних ємностей та різних партій рослинного матеріалу.

2.2. Характеристика синтетичних барвників та обладнання

Конго червоний (Congo Red) належить до класу азобарвників з молекулярною формулою $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$ та молекулярною масою 696,66 г/моль, що визначає його фізико-хімічні властивості та токсикологічні характеристики. Хімічна структура барвника включає дві азогрупи ($-N=N-$), які забезпечують характерне червоне забарвлення та здатність до утворення комплексів з біологічними макромолекулами. Розчинність Конго червоного у воді становить приблизно 10 г/л за температури 20°C, що дозволяє готувати робочі розчини необхідних концентрацій без використання додаткових розчинників. Максимум поглинання світла спостерігається у видимій частині спектру при довжині хвилі 497 нм, що використовується для спектрофотометричного визначення концентрації барвника у розчині. Токсикологічні дослідження показали, що азобарвники здатні порушувати функціонування фотосинтетичного апарату рослин через інгібування електронно-транспортного ланцюга та деструкцію пігмент-білкових комплексів.

Метиленовий синій (Methylene Blue) представляє клас тіазинових барвників з молекулярною формулою $C_{16}H_{18}ClN_3S$ та молекулярною масою

319,85 г/моль, що обумовлює його специфічні взаємодії з біологічними системами. Молекулярна структура включає гетероциклічне кільце з атомом сірки та позитивно зарядженими азотними групами, які забезпечують катіонні властивості та здатність до електростатичних взаємодій. Розчинність метиленового синього у воді є високою і становить близько 40 г/л за кімнатної температури, що дозволяє готувати концентровані маточні розчини. Спектральні характеристики барвника включають максимум поглинання при 664 нм у видимій області та характерну синьо-зелену флуоресценцію при опроміненні ультрафіолетовим світлом. Механізм токсичної дії метиленового синього на рослинні організми пов'язаний з його здатністю втручатися у процеси окисно-відновних реакцій та генерувати активні форми кисню.

У табл. 2.3 подано фізико-хімічні характеристики досліджуваних синтетичних барвників, а в табл. 2.4 історія їх синтезу поряд з деякими хімічними відмінностями.

Таблиця 2.3 Фізико-хімічні характеристики досліджуваних синтетичних барвників

Параметр	Конго червоний	Метиленовий синій
Молекулярна формула	$C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$	$C_{16}H_{18}ClN_3S$
Молекулярна маса, г/моль	696,66	319,85
Розчинність у воді (20°C), г/л	10	40
Максимум поглинання, нм	497	664
Клас хімічних сполук	азобарвник	тіазиновий барвник
Забарвлення розчину	червоне	синє
pH робочих розчинів	6,8-7,2	6,5-7,0

А табл. 2.4 містить інформацію про історію синтезу досліджуваних барвників.

Таблиця 2.4 Історія синтезу та хімічні особливості досліджених барвників

Текстильний барвник	Історія синтезу та хімічні властивості	Вигляд
Конго червоний	Вперше був синтезований у в 1883 р. німецьким хіміком Полом Беттігером. Червоний азобарвник та індикатор рН: в нейтральному та лужному середовищі має червоний колір, а в кислому — синій. Виявляє канцерогенні властивості. Хімічна формула $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$. Аніонний (негативно заряджений барвник). Містить дві азогрупи ($-N=N-$) між ароматичними кільцями.	
Метиленовий синій	Вперше був синтезований у 1876 р. німецьким хіміком Генріхом Каро. Він належить до групи тіазинових барвників, які містять гетероциклічне кільце з атомами сірки та азоту. Хімічна формула $C_{16}H_{18}ClN_3S$. Катіонний (позитивно заряджений) барвник.	

Приготування маточних розчинів барвників здійснювалося шляхом розчинення точної наважки реактиву у дистильованій воді з подальшим доведенням до необхідного об'єму у мірних колбах. Концентрація маточного розчину Конго червоного становила 1000 мг/л, що дозволяло готувати робочі розчини шляхом послідовних розведень. Для метиленового синього маточний розчин готувався концентрацією 500 мг/л з урахуванням його більшої токсичності порівняно з азобарвниками. Стабільність приготованих розчинів контролювалася спектрофотометрично через регулярні проміжки часу протягом усього періоду експерименту. Зберігання маточних розчинів здійснювалося у темних скляних ємностях за температури 4°C для запобігання фотохімічній деградації барвників.

Робочі розчини барвників різних концентрацій готувалися безпосередньо перед використанням шляхом розведення маточних розчинів дистильованою водою за методикою послідовних розведень. Для Конго червоного було приготовлено п'ять концентрацій: 10, 25, 50, 75 та 100 мг/л, які охоплювали діапазон від підпорогових до токсичних концентрацій. Метиленовий синій використовувався у концентраціях 5, 15, 30, 50 та 75 мг/л з урахуванням його вищої біологічної активності (табл. 2.5).

Таблиця 2.5 Концентрації барвників у експериментальних варіантах

Варіант	Конго червоний, мг/л	Метиленовий синій, мг/л
Контроль	0	0
Варіант 1	10	5
Варіант 2	25	15
Варіант 3	50	30
Варіант 4	75	50
Варіант 5	100	75

Експериментальне обладнання включало скляні ємності об'ємом 2 л для утримання рослин, які забезпечували достатній простір для розвитку гідромакрофітів та підтримання стабільних умов водного середовища. рН-метр Milwaukee MW102 з точністю вимірювання $\pm 0,01$ одиниці рН забезпечував контроль кислотності водного середовища протягом експерименту. Термометр лабораторний ртутний зі шкалою від 0 до 50°C та ціною поділки 0,1°C використовувався для моніторингу температурного режиму.

Освітлення експериментальних ємностей здійснювалося за допомогою люмінесцентних ламп денного світла потужністю 36 Вт, розміщених на відстані 30 см над поверхнею води. Інтенсивність освітлення на рівні води становила 3000-3500 люкс, що відповідає оптимальним умовам для фотосинтезу водних рослин. Фотоперіод підтримувався на рівні 14 годин світла та 10 годин темряви з використанням автоматичного таймера.

Лабораторний посуд включав мірні колби класу А об'ємом 50, 100, 250 та 1000 мл з точністю відмірювання об'єму $\pm 0,1\%$, піпетки градуйовані на 1, 5 та 10 мл з класом точності А. Чашки Петрі діаметром 90 мм використовувалися для розміщення рослинного матеріалу під час морфометричних вимірювань. Скляні палички та шпателі застосовувалися для перемішування розчинів та маніпуляцій з рослинами.

Допоміжне обладнання включало лінійки міліметрові довжиною 30 см для вимірювання морфометричних параметрів рослин, штангенциркуль з точністю вимірювання 0,1 мм для визначення товщини тканин.. Холодильник побутовий з температурою зберігання $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ використовувався для зберігання маточних розчинів барвників та рослинних екстрактів.

2.3. Методика постановки експерименту

Експериментальне дослідження проводилося за контрольованих умов, що забезпечували можливість ізольованого вивчення впливу кожного фактору на фізіологічний стан гідромакрофітів. Схема експерименту (табл.2.6) передбачала одночасне тестування двох видів рослин на шести концентраційних варіантах кожного барвника з триразовою повторністю, що становило загалом 72 експериментальні одиниці. Розміщення експериментальних ємностей здійснювалося методом рандомізації для мінімізації систематичних похибок, пов'язаних з градієнтами освітлення або температури у приміщенні. Кожна ємність містила по три рослини куширу або пістії, що забезпечувало достатню біомасу для проведення аналітичних визначень без повного вилучення рослин з експерименту. Об'єм розчину барвника в кожній ємності становив 1,5 л, що створювало оптимальне співвідношення біомаси рослин до об'єму середовища.

Початкова фаза експерименту включала акліматизацію рослин до умов лабораторії протягом семи діб у відстояній водопровідній воді за параметрів, аналогічних контрольному варіанту. Акліматизація дозволила рослинам адаптуватися до нових умов існування та відновити потенційну життєдіяльність після стресу, пов'язаного з транспортуванням та маніпуляціями. Під час

акліматизації проводився щоденний візуальний моніторинг стану рослин з фіксацією ознак пошкодження або хвороб. Рослини з видимими дефектами замінювалися на здорові екземпляри з резервного фонду. Після завершення акліматизації проводилося вихідне вимірювання морфометричних параметрів кожної рослини з занесенням даних до протоколу експерименту.

Таблиця 2.6 Схема експериментального дослідження

Фактор	Рівні варіювання	Кількість повторностей K=2	Тривалість експозиції
Вид рослини	<i>Ceratophyllum</i> , <i>Pistia</i>	3	14 діб
Тип барвника	Конго червоний, Метиленовий синій	3	14 діб
Концентрація	0, 10/5, 25/15, 50/30, 75/50, 100/75 мг/л	3	14 діб
Температура	22±2°C	постійно	14 діб
Освітленість	3000-3500 люкс	постійно	14 діб
Фотоперіод	14 год світло / 10 год темрява	постійно	14 діб

Внесення барвників у експериментальні ємності проводилося одноразово на початку експерименту шляхом додавання розрахованого об'єму маточного розчину до дистильованої води. Розрахунок необхідного об'єму маточного розчину здійснювався за формулою:

$$V_1 = \frac{C_2 \times V_2}{C_1} \quad (2.1)$$

Де: V_1 - об'єм маточного розчину, мл; C_1 - концентрація маточного розчину, мг/л; C_2 - необхідна концентрація робочого розчину, мг/л; V_2 - загальний об'єм робочого розчину, мл.

Для прикладу, приготування 1500 мл робочого розчину Конго червоного концентрацією 50 мг/л з маточного розчину 1000 мг/л вимагало:

$$V_1 = \frac{50 \times 1500}{1000} = 75 \text{ мл (2.2)}$$

Після внесення барвників розчини ретельно перемішувалися скляною паличкою протягом 2 хвилин для забезпечення гомогенності. Рослини переносилися у підготовлені розчини за допомогою пінцету з м'якими наконечниками для запобігання механічним пошкодженням тканин. Розміщення рослин у ємностях здійснювалося таким чином, щоб забезпечити вільне положення без контакту зі стінками посудин. Кушир занурювався у товщу води на глибину 5-7 см від поверхні, тоді як пістія вільно плавала на поверхні розчину. Момент внесення рослин у розчини барвників вважався нульовою точкою експерименту та фіксувався у протоколі з точністю до хвилини.

Контрольний варіант включав утримання рослин у відстояній водопровідній воді без додавання барвників за всіх інших умов, ідентичних дослідним варіантам. Відстоювання водопровідної води тривало 48 годин для повного видалення хлору та встановлення рівноважного вмісту розчинених газів. Фізико-хімічні параметри контрольної води визначалися перед початком експерименту та включали: рН $7,2 \pm 0,1$, температура $22 \pm 1^\circ\text{C}$, вміст розчиненого кисню $6,8 \pm 0,3$ мг/л, електропровідність 420 ± 15 мкСм/см. Контрольні ємності розміщувалися поруч з дослідними для забезпечення однакових умов освітлення та температури. Спостереження за контрольними рослинами проводилися з тією ж періодичністю та за тими ж параметрами, що й за дослідними варіантами.

Підтримання стабільних умов експерименту передбачало щоденний моніторинг температури води у ємностях з реєстрацією показників о 9:00 та 18:00 годині. Вимірювання рН проводилося тричі на тиждень з корекцією у разі відхилення більше ніж на 0,3 одиниці від початкового значення. Інтенсивність освітлення контролювалася люксометром кожні три доби на рівні водної поверхні у кожній ємності. Випаровування води компенсувалося щоденним

додаванням дистильованої води до початкового об'єму з урахуванням зміни концентрації барвників.

Заміна розчинів у експериментальних ємностях не проводилася протягом усього періоду експозиції для моделювання умов хронічної дії токсиканта, що наближається до реальних ситуацій у забруднених водоймах.

Фіксація змін морфологічних параметрів здійснювалася на 14 добу експерименту, а LD_{50} на 30 добу експерименту. Детальні морфометричні вимірювання проводилися на 14 добу з визначенням довжини пагонів куширу, кількості листкових мутовок, діаметра розетки пістії, кількості листків та довжини коренів. Будь-які відхилення від нормального розвитку фіксувалися у протоколі з детальним описом характеру змін. Загиблі рослини вилучалися з експерименту негайно після виявлення з реєстрацією часу загибелі та морфологічних ознак.

Морфометричний аналіз включав вимірювання лінійних параметрів рослин з використанням міліметрової лінійки та штангенциркуля з точністю до 0,1 мм. У куширу зануреного визначали такі морфологічні параметри: приріст довжини стебла, %, кількість мутовок на 5 см, забарвлення в балах, некрози у % площі. У пістії шаруватої визначали: приріст діаметра розетки у %, кількість нових листків, приріст довжини коренів у %, забарвлення у балах, некрози у % площі. При цьому пістія аналізувалася за діаметром листкової розетки у двох взаємно перпендикулярних напрямках,

Колориметрична оцінка забарвлення листків проводилася візуально за спеціально розробленою шкалою, що включала п'ять градацій від насиченого зеленого до повністю знебарвленого стану. Бальна система оцінки забарвлення: 5 балів - темно-зелений колір без ознак хлорозу, 4 бали - зелений з незначним посвітлінням, 3 бали - світло-зелений з ділянками хлорозу, 2 бали - жовто-зелений з некротичними плямами, 1 бал - жовтий або білий з повною втратою хлорофілу (табл. 2.7).

Таблиця 2.7 Шкала візуальної оцінки стану гідромакрофітів

Бал	Забарвлення	Тургор	Некрози	Загальний стан
5	темно-зелене	високий	відсутні	відмінний
4	зелене	нормальний	поодинокі	добрий
3	світло-зелене, блакитне	знижений	до 25% площі	задовільний
2	жовто-зелене,	слабкий	25-50% площі	незадовільний
1	жовте/біле	відсутній	понад 50% площі	критичний

Індекси зміни (ІЗ) окремих морфофізіологічних показників визначали за формулою:

$$ІЗ_{показника} = \frac{\text{Контроль} - \text{Дослід}}{\text{Контроль}} \quad (2.3)$$

Інтегральний індекс зміни морфофізіологічних показників (ІЗ_{МФП}) для кожного виду рослин визначали за формулою:

$$ІЗ_{МФП} = \frac{1}{n} \sum ІЗ_1 + ІЗ_2 + \dots + ІЗ_n \quad (2.4)$$

При проведенні пробіт-аналізу проценти загибелі рослин перетворювали в пробіти за допомогою спеціальної таблиці, а дози перетворювали в десяткові логарифми. Пробіти відкладали по осі ординат, а логарифми доз – по осі абсцис. Через знайдені точки проводити пряму лінію, для якої визначали рівняння регресії. Показник У в цьому рівнянні замінювали на 5, оскільки для 50- відсоткової загибелі пробіт дорівнює 5. Знаходили логарифм концентрації, а потім на основі антилогарифму – концентрацію розчину, яка зумовлює 50- відсотку загибель рослин.

2.4. Статистична обробка результатів

Статистична обробка експериментальних даних проводилася з використанням методів параметричної статистики після перевірки вибірок на відповідність нормальному розподілу за критерієм Шапіро-Вілка. Первинні дані заносилися у електронні таблиці Microsoft Excel з подальшим експортом до спеціалізованого статистичного пакету STATISTICA 10.0 для проведення багатофакторного аналізу. Для кожного варіанта експерименту

розраховувалися основні статистичні показники: середнє арифметичне значення, стандартне відхилення, стандартна похибка середнього, коефіцієнт варіації. Обсяг вибірки для кожного варіанта становив $n=9$ (три рослини у трьох повторностях), що забезпечувало достатню статистичну потужність для виявлення значущих відмінностей між варіантами.

Середнє арифметичне значення показника розраховувалося за формулою:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (2.5)$$

Стандартне відхилення, що характеризує розкид значень навколо середнього, визначалося за формулою:

$$SD = \sqrt{\left[\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \right]} \quad (2.6)$$

Стандартна похибка середнього, що відображає точність оцінки середнього значення, розраховувалася як:

$$SE = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (2.7)$$

Нульова гіпотеза про відсутність відмінностей між групами відхилялася при рівні значущості $p < 0,05$.

Інтерпретація статистичних показників здійснювалася за коефіцієнтом детермінації та рівнем значущості (табл. 2.8)

Таблиця 2.8 Інтерпретація статистичних показників

Коефіцієнт детермінації	R^2	якість моделі	$>0,7$ - добра, $0,5-0,7$ - задовільна, $<0,5$ - незадовільна
Рівень значущості	p	вірогідність	$<0,05$ - значуща, $0,05-0,1$ - тенденція, $>0,1$ - незначуща

Графічне представлення результатів включало побудову діаграм, графіків та гістограм з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel та STATISTICA 10.0. Стовпчикові діаграми з планками похибок (стандартна похибка середнього) використовувалися для відображення середніх значень показників у різних варіантах експерименту. Лінійні графіки застосовувалися для ілюстрації динаміки зміни параметрів у часі. Всі графічні матеріали

супроводжувалися підписами осей з зазначенням одиниць виміру та легендою для ідентифікації різних груп даних.

Табличне значення t -критерію визначалося за статистичними таблицями при заданому рівні значущості та числі ступенів свободи. Якщо розрахункове значення t перевищувало табличне, нульова гіпотеза про рівність середніх відхилялася, що свідчило про статистично значущі відмінності між групами.



РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Вплив Конго червоного на морфофізіологічні показники куширу зануреного (*Ceratophyllum demersum* L.).

Експозиція *Ceratophyllum demersum* L. у розчинах Конго червоного різних концентрацій протягом 14 діб виявила дозозалежний характер токсичної

дії азобарвника на морфологічні та фізіологічні показники рослин. У контрольному варіанті кушир демонстрував стабільний ріст з приростом довжини стебла $23,4 \pm 2,1\%$ та формуванням нових листових мутовок, що свідчить про оптимальні умови культивування (табл. 3.1).

За концентрації Конго червоного 10 мг/л спостерігалися незначні зміни у забарвленні верхівкових частин пагонів куширу зануреного з появою світло-зелених ділянок, однак загальний приріст стебла становив $18,7 \pm 1,8\%$ і достовірно не відрізнявся від контролю ($p > 0,05$). Не встановлено також достовірних відмінностей від контролю за трьома іншими морфофізіологічними показниками: кількістю мутовок, забарвленням та площею некрозів.

Підвищення концентрації барвника до 25 мг/л викликало помітне посвітління листків на 40-50% довжини пагонів. Загалом за забарвленням та площею некрозів даний варіант достовірно відрізнявся від контролю $p < 0,05$. У цьому варіанті також мало місце достовірне зниження приросту стебла в довжину порівняно з контролем ($p < 0,05$): в контролі – $23,4 \pm 2,1\%$, натомість в даному варіанті – $12,3 \pm 1,5\%$. А ось кількість мутовок на 5 см стебла – єдиний показник, який за концентрації 25 мг/л достовірно не відрізнявся від контролю.

За концентрації Конго червоного 50 мг/л токсичний ефект проявлявся у вигляді масового знебарвлення листків куширу зануреного з переходом кольору від зеленого до жовто-зеленого та появою значних некротичних ділянок на апікальних меристемах. Зміна забарвлення і площа некрозів достовірно відрізнялись від контролю ($p < 0,01$). Приріст стебла в довжину у цьому варіанті становив лише $5,8 \pm 1,2\%$, що було достовірно нижче контрольних значень ($p < 0,01$). Загалом порівняно з варіантом 25 мг/л, за концентрації 50 мг/л морфофізіологічні зміни стають більш значущими. Рівень значущості переходить з розряду $p < 0,05$ до розряду $p < 0,01$, що означає, що ймовірність того, що зафіксовані зміни є випадкові, становить менше 1%. При

цьому слід звернути увагу на такий показник як кількість мутовок на 5 см, який, як і в попередньому варіанті, достовірно не відрізняється від контролю.

Таблиця 3.1 Вплив Конго червоного на морфофізіологічні показники *Ceratophyllum demersum* L.

Концентрація, мг/л	Приріст довжини стебла, %	Кількість мутовок на 5 см	Забарвлення, бали	Некрози, % площі
0 (контроль)	23,4±2,1	5,2±0,3	5,0±0,0	0
10	18,7±1,8 p>0,05	4,9±0,4 p>0,05	4,3±0,3 p>0,05	2±1 p>0,05
25	12,3±1,5 p<0,05	4,3±0,3 p>0,05	3,5±0,4 p<0,05	8±2 p<0,05
50	5,8±1,2 p<0,01	3,7±0,5 p>0,05	2,4±0,5 p<0,01	23±4 p<0,01
75	-3,2±0,8 p<0,001	3,1±0,4 p<0,05	1,6±0,3 p<0,001	45±6 p<0,01
100	-8,5±1,1 p<0,001	2,5±0,3 p<0,0	1,1±0,2 p<0,001	72±8 p<0,001

Концентрація 75 мг/л спричиняла майже повне знебарвлення листків протягом перших семи діб експозиції з подальшою деструкцією тканин та відокремленням окремих листових сегментів від пагонів. Рослини втрачали тургор, пагони набували в'ялого вигляду та опускалися на дно ємностей внаслідок втрати плавучості. Достовірність різниці порівняно з контролем двох з чотирьох досліджених показників (приріст довжини стебла та зміна забарвлення) відповідала вже рівню значущості $p<0,001$, таку різницю слід вважати достовірною з найвищою ймовірністю. Від'ємні значення приросту стебла – результат процесу його розкладання під впливом барвника. Вперше порівняно з попередніми концентраціями, за концентрації 75 мг/л, зафіксоване достовірне зменшення кількості мутовок на 5 см стебла порівняно з контролем ($p<0,05$).

Максимальна концентрація Конго червоного 100 мг/л посилювала процес розкладання рослинних тканин *Ceratophyllum demersum* L., що знайшло відображення у від'ємному значенні приросту стебла ($-8,5 \pm 1,1\%$) у тих рослин, що вижили. Візуальний аналіз показав, що уцілілі частини рослин мали білий або брудно-жовтий колір з численними некротичними плямами, що охоплювали понад 70% загальної площі листків. Зафіксована кількість листових мутовок виявилася найменшою для *Ceratophyllum demersum* L. за дії Конго червоного і становила $-2,5 \pm 0,3$ на 5 см.

У табл. 3.2 та на рис. 3.1 подано Індекси зміни морфофізіологічних показників *Ceratophyllum demersum* L. Ці індекси були розраховані для трьох з чотирьох морфофізіологічних показників, оскільки такий показник як площа некрозів у контролі завжди мав нульове значення, то розрахувати його Індекс зміни у дослідних варіантах тут і в подальших дослідженнях не уявлялося можливим. Найбільш чутливим до дії Конго червоного виявився Індекс зміни приросту довжини стебла ($I_{З_{\text{пдс}}}$). Цей індекс був найбільшим в усіх дослідних варіантах, починаючи з 25 мг/л. На другому місці за чутливістю до Конго червоного опинився Індекс зміни забарвлення ($I_{З_3}$). А ось Індекс зміни кількості листових мутовок ($I_{З_{\text{км}}}$) виявився найменш чутливим показником, оскільки почав фіксуватися лише з концентрації 75 мг/л і демонстрував найменше значення.

Таблиця 3.2 Індекси зміни морфофізіологічних показників *Ceratophyllum demersum* L. за дії Конго червоного

Концентрація, мг/л	$I_{З_{\text{пдс}}}$	$I_{З_{\text{км}}}$	$I_{З_3}$
10	0	0	0
25	0,47	0	0,3
50	0,75	0	0,52
75	1,14	0,41	0,68
100	1,36	0,51	0,78

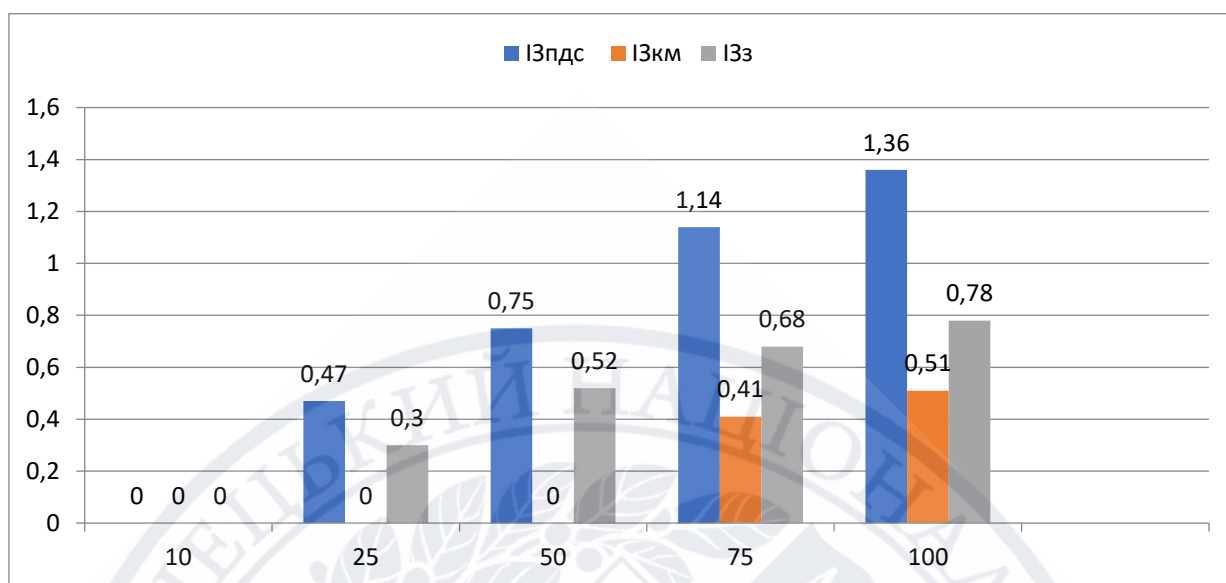
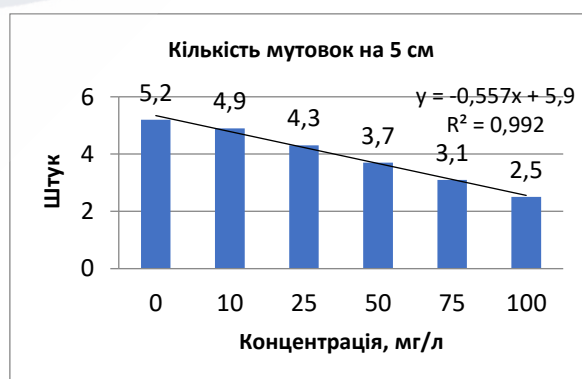
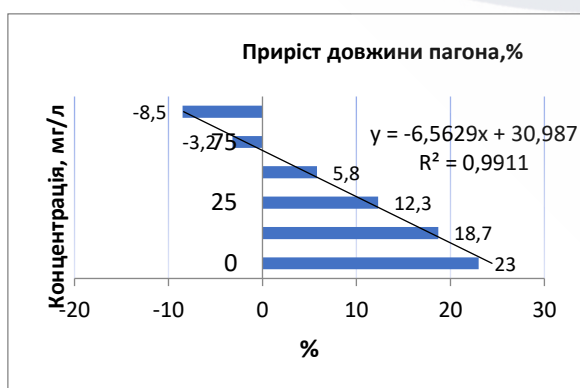


Рис. 3.1 Індеси зміни морфофізіологічних показників *Ceratophyllum demersum* L. за дії Конго червоного.

На рис. 3.2 показано тренди та регресійні рівняння змін морфофізіологічних показників *Ceratophyllum demersum* L. під впливом Конго червоного. Коефіцієнт детермінації трьох з чотирьох одержаних моделей дорівнює 0,99, що означає, що 99% варіації відповідних залежних змінних (тобто морфофізіологічних показників) пояснюється варіацією незалежних змінних (тобто концентрацій). І лише модель, яка описує зміну площі некрозів, характеризується коефіцієнтом детермінації 0,71, тобто лише 71% цієї залежної змінної можна пояснити зміною концентрацій барвника, а решта 29% — це вплив інших факторів, які не враховуються.



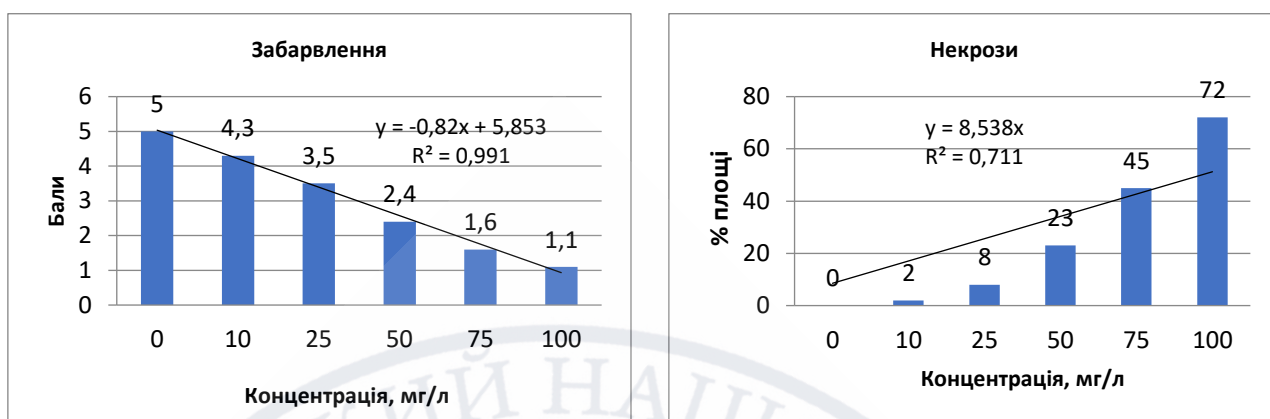


Рис. 3.2 Тренди та регресійні рівняння змін морфофізіологічних показників *Ceratophyllum demersum* L. під впливом Конго червоного

3.2 Вплив Конго червоного на морфофізіологічні показники пістії шаруватої (*Pistia stratiotes* L.)

Результати дослідження впливу Конго червоного на морфофізіологічні показники пістії шаруватої представлені в табл. 3.3. За дії цього барвника у концентрації 10 мг/л, як і у кушніру зануреного, більшість морфофізіологічних показників достовірно не відрізнялась від контролю ($p > 0,05$). Лише слабкі прояви некротизації листків порушили цю загальну тенденцію: на тлі повної відсутності некротизації в контролі, навіть незначна некротизація (3 ± 1) в цьому варіанті виявилася достовірною при $p < 0,05$.

Концентрація барвника 25 мг/л викликала помітні зміни у зовнішньому вигляді пістії з появою хлоротичних плям на листках та зниженням інтенсивності опушення листової поверхні. Приріст діаметра розетки уповільнювався до $18,4 \pm 2,1\%$, а приріст довжини коренів – до $28,6 \pm 3,2\%$. Деякі рослини демонстрували скручування крайових частин листків та втрату тургору центральних листків розетки. Чотири з п'яти досліджених показників демонстрували достовірну відмінність від контролю (приріст діаметра розетки, приріст довжини коренів, забарвлення та площа некрозів) при $p < 0,05$ та $0,01$. Натомість кількість нових листків достовірно не відрізнялася від контролю.

За концентрації 50 мг/л токсичні ефекти проявлялися більш виразно і супроводжувалися масовим знебарвленням листків, особливо старих, які набували жовтого кольору з коричневими некротичними плямами. Приріст діаметра розетки достовірно зменшувався порівняно з контрольним варіантом і становив $9,7 \pm 1,6\%$, а частка некротизованих тканин досягала $18 \pm 3\%$ загальної площі листків (табл.3.3).

За концентрації 75 мг/л усілілі екземпляри демонстрували слабкий ріст з формуванням дрібних деформованих листків блідо-зеленого кольору. Коренева система втрачала розгалуженість, корені набували коричневого забарвлення та ламкості. Приріст діаметра розетки уповільнився в 13,7 рази порівняно з контролем. Рівень значущості різниці усіх показників порівняно з контролем підвищився і відповідав $p < 0,01$ та $p < 0,001$.

Максимальна концентрація 100 мг/л була летальною для 72% рослин пістії, а рослини, що вижили, демонстрували глибоку деградацію з повною втратою декоративності та функціональної активності. Від'ємні значення приросту діаметра розетки та довжини коренів засвідчили процеси розпаду тканин.

Таблиця 3.3 Вплив Конго червоного на морфометричні показники *Pistia stratiotes* L.

Концентрація, мг/л	Приріст діаметра розетки, %	Кількість нових листків	Приріст довжини коренів, %	Забарвлення, бали	Некрози, % площі
0 (контроль)	$31,5 \pm 2,8$	$3,8 \pm 0,4$	$45,2 \pm 4,3$	$5,0 \pm 0,0$	0
10	$26,8 \pm 2,5$ $p > 0,05$	$3,4 \pm 0,5$ $p > 0,05$	$41,3 \pm 3,9$ $p > 0,05$	$4,5 \pm 0,3$ $p > 0,05$	3 ± 1 $p < 0,05$
25	$18,4 \pm 2,1$ $p < 0,05$	$2,6 \pm 0,4$ $p > 0,05$	$28,6 \pm 3,2$ $p < 0,05$	$3,8 \pm 0,4$ $p < 0,05$	12 ± 2 $p < 0,01$
50	$9,7 \pm 1,6$ $p < 0,01$	$1,8 \pm 0,3$ $p < 0,05$	$15,4 \pm 2,5$ $p < 0,01$	$2,9 \pm 0,5$ $p < 0,05$	18 ± 3 $p < 0,01$
75	$2,3 \pm 0,9$ $p < 0,001$	$0,9 \pm 0,3$ $p < 0,01$	$6,2 \pm 1,8$ $p < 0,01$	$2,1 \pm 0,4$ $p < 0,01$	32 ± 5 $p < 0,01$

100	-4,1±1,2 p<0,001	0,3±0,2 p<0,01	-2,7±1,1 p<0,001	1,4±0,3 p<0,001	58±7 p<0,01
-----	---------------------	-------------------	---------------------	--------------------	----------------

У табл. 3.2 та на рис. 3.3. представлені Індeksi зміни морфологічних показників *Pistia stratiotes* L. за дії Конго червоного. Найбільш чутливим показником виявився Індекс зміни приросту діаметру розетки ($I_{\text{пдр}}$). Значення цього індексу були найбільшими у всіх дослідних варіантах, починаючи з концентрації 25 мг/л. Загалом спадний ряд індексів зміни морфологічних показників *Pistia stratiotes* L. за дії Конго червоного виглядав наступним чином:

$I_{\text{пдр}}$ (Індекс зміни приросту діаметру розетки) > $I_{\text{пдк}}$ (Індекс зміни приросту довжини коренів) > $I_{\text{кнл}}$ (Індекс зміни кількості нових листків) > I_3 (Індекс зміни забарвлення). І все ж, слід звернути увагу на те, що зміна кольору фіксується при менших концентраціях Конго червоного, ніж зміна кількості нових листків.

Таблиця 3.4 Індeksi зміни морфологічних показників *Pistia stratiotes* L. за дії Конго червоного

Концентрація, мг/л	$I_{\text{пдр}}$	$I_{\text{кнл}}$	$I_{\text{пдк}}$	I_3
10	0	0	0	0
25	0,42	0	0,37	0,24
50	0,69	0,52	0,66	0,42
75	0,93	0,76	0,86	0,58
100	1,13	0,92	1,06	0,72

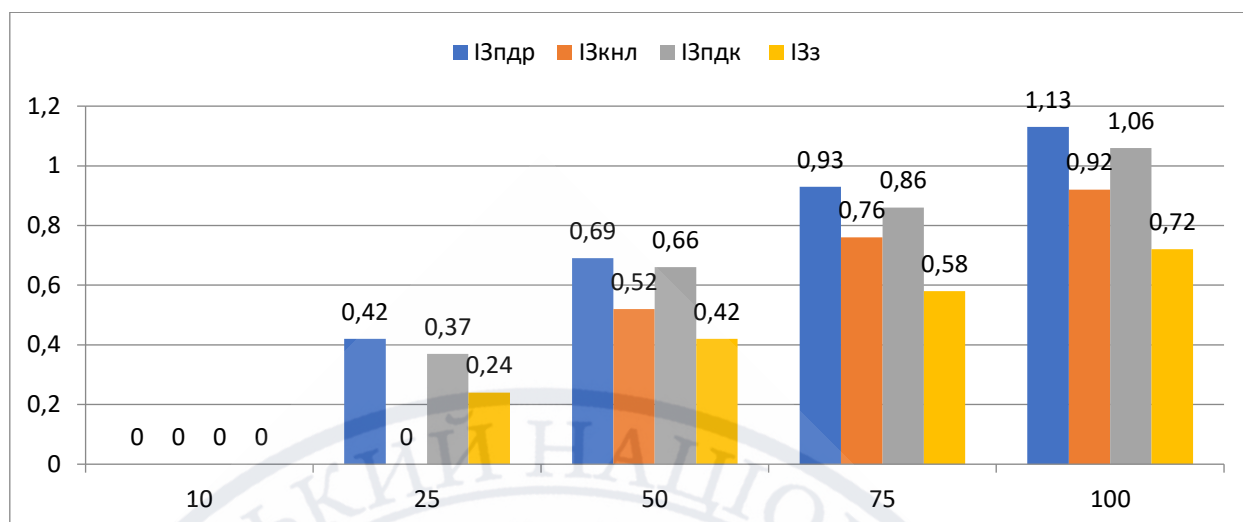
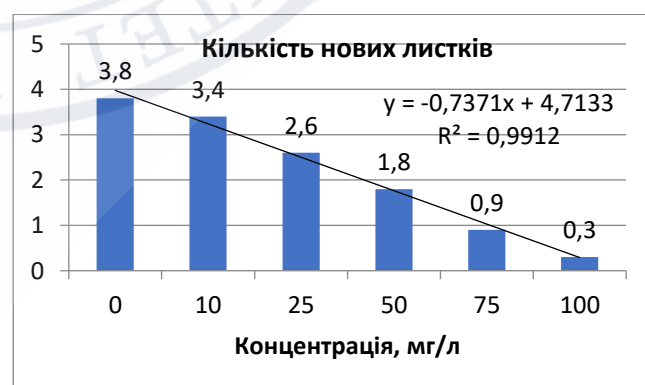
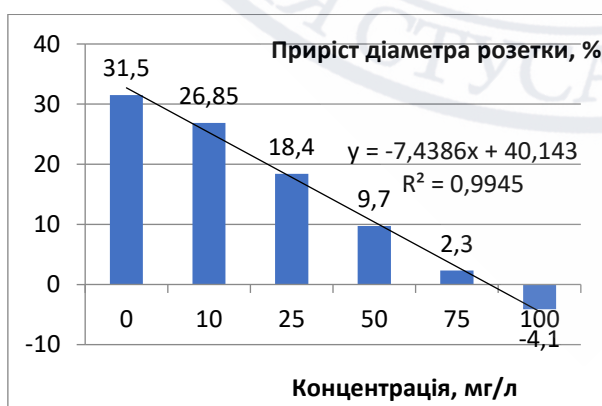


Рис. 3.3 Індекси зміни морфофізіологічних показників *Pistia stratiotes* L. за дії Конго червоного

На рис. 3.4 зафіксовано тренди та регресійні рівняння змін морфофізіологічних показників *Pistia stratiotes* L. під впливом Конго червоного. Коефіцієнт детермінації чотирьох з п'яти одержаних моделей дорівнює 0,98-0,99, що означає, що 98-99% варіації відповідних залежних змінних (тобто показників) пояснюється варіацією незалежних змінних (тобто концентрацій) у регресійній моделі. І лише модель, яка описує зміну площі некрозів, характеризується коефіцієнтом детермінації 0,89, тобто 89% цієї залежної змінної можна пояснити зміною концентрацій барвника, а решта 11% — це вплив інших факторів, які не враховуються.



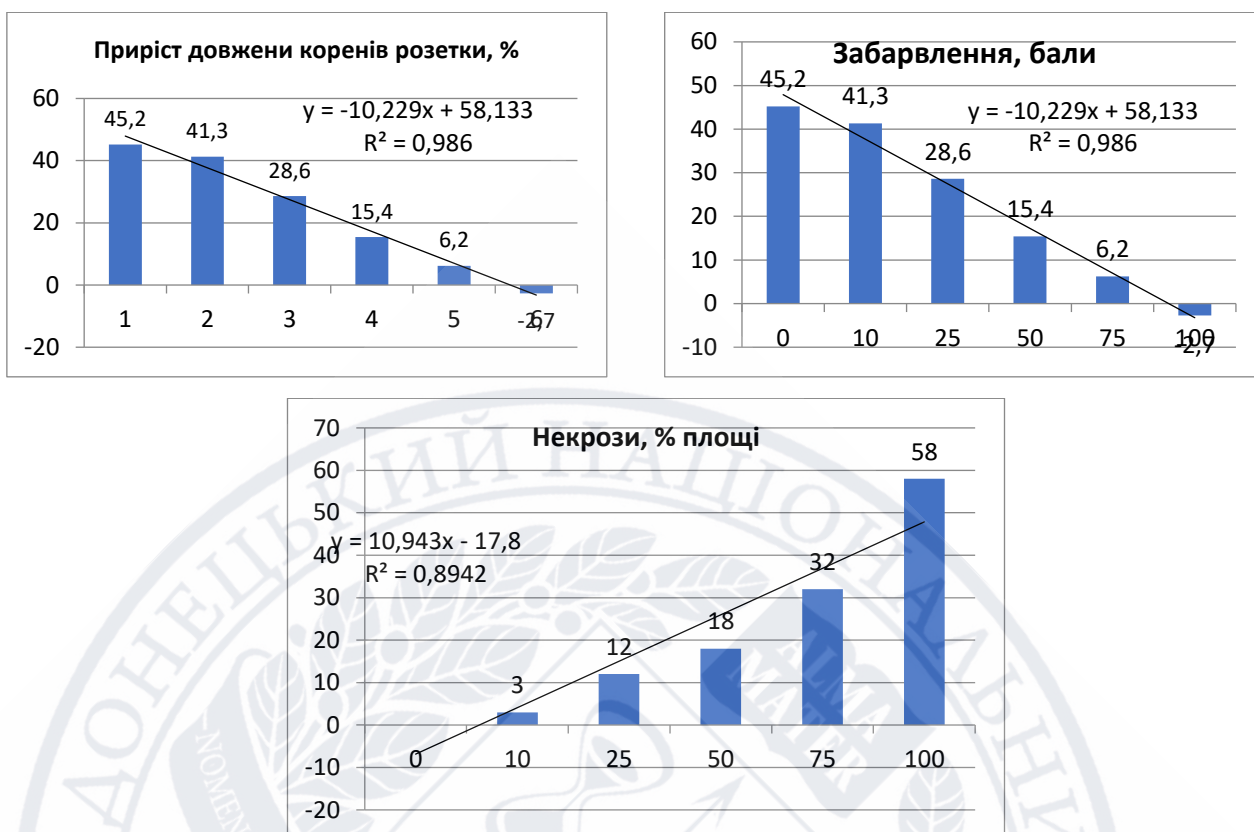


Рис. 3.4 Тренди та регресійні рівняння змін морфофізіологічних показників *Pistia stratiotes* L. під впливом Конго червоного

3.3. Вплив Метиленового синього на морфофізіологічні показники куширу зануреного (*Ceratophyllum demersum* L.).

Метиленовий синій проявляв більш виражену токсичну дію на гідромакрофіти порівняно з Конго червоним, що виявлялося у значніших морфофізіологічних порушеннях за нижчих концентрацій барвника.

Кушир занурений демонстрував перші ознаки токсичного впливу Метиленового синього вже за концентрації 5 мг/л з появою світло-зелених ділянок на апікальних частинах пагонів та зниженням приросту біомаси до $15,2 \pm 1,6\%$ порівняно з $23,4 \pm 2,1\%$ у контролі ($p < 0,05$) (табл. 3.5). Характерною особливістю дії Метиленового синього було швидке накопичення барвника у тканинах рослин, що проявлялося у синьому забарвленні листків та пагонів вже

у перші години експозиції. Лише кількість листкових муток за концентрації 5 мг/л достовірно не відрізнялася від контролю.

Концентрація 15 мг/л викликала помітне інгібування морфологічних показників з приростом довжини стебла лише $8,7 \pm 1,3\%$ та появою численних хлоротичних та некротичних ділянок на листках. Лише кількість листкових муток, як і за концентрації 5 мг/л, достовірно не відрізнялась від контролю.

За концентрації Метиленового синього 30 мг/л спостерігалися глибокі деструктивні зміни у структурі куширу зануреного з масовим знебарвленням листків, втратою тургору та фрагментацією пагонів. Приріст стебла в довжину у цьому варіанті був від'ємним ($-2,4 \pm 0,9\%$), що свідчить про переважання процесів деградації над ростовими процесами. Некротичні зміни охоплювали понад 40% площі листків, при цьому некрози локалізувалися переважно на апікальних меристемах та молодих листках. Відсоток виживання рослин становив лише 44%, а загиблі екземпляри демонстрували повну деструкцію тканин з відокремленням листкових сегментів. Кількість листкових муток на відміну від попередніх дослідних варіантів стала достовірно меншою порівняно з контролем при $p < 0,05$.

Концентрації 50 та 75 мг/л виявилися летальними для більшості рослин роголистника з виживанням 22% та 0% відповідно.

Таблиця 3.5 Вплив Метиленового синього на морфологічні показники *Ceratophyllum demersum* L.

Концентрація, мг/л	Приріст довжини стебла, %	Кількість муток на 5 см	Забарвлення, бали	Некрози, % площі
0 (контроль)	$23,4 \pm 2,1$	$5,2 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,0$	0
5	$15,2 \pm 1,6$ $p < 0,05$	$4,7 \pm 0,4$ $p > 0,05$	$4,1 \pm 0,3$ $p < 0,05$	5 ± 1 $p < 0,01$
15	$8,7 \pm 1,3$	$4,1 \pm 0,4$	$3,2 \pm 0,4$	15 ± 3

	p<0,01	p>0,05	p<0,05	p<0,01
30	-2,4±0,9 p<0,001	3,4±0,5 p<0,05	2,0±0,4 p<0,01	42±5 p<0,01
50	-6,8±1,1 p<0,001	2,8±0,4 p<0,01	1,3±0,3 p<0,001	68±7 p<0,001
75	-11,5±1,5 p<0,001	2,1±0,3 p<0,01	0,8±0,2 p<0,001	89±9 p<,001

За дії Метиленового синього в концентрації 50 мг/л поглиблювалася деградація тканин куширу зануреного. Продовжувало фіксуватися явище негативного приросту стебла. Негативний приріст стебла становив уже $6.8 \pm 1,1$, що свідчило про наростання інтенсивності відмирання стебла. Знебарвлення та некрози досягали такого рівня змін, що рівень значущості досяг $p < 0,001$. Зменшення кількості листкових мутовок посилювалося і фіксувалося уже при $p < 0,01$.

За концентрації Метиленового синього 75 мг/л деструкція тканин наростала. Негативний приріст довжини стебла уже досяг $11,5 \pm 1,5$. Рослини набували білого або жовтого кольору. Тургор рослин практично був відсутній. Рослини знаходилися в критичному стані.

У табл. 3.6 та на рис. 3.5 представлені Індeksi зміни морфофізіологічних показників *Ceratophyllum demersum* L. за дії Метиленового синього. Найбільш чутливим показником до дії цього барвника виявився Індекс зміни приросту довжини стебла ($I_{З_{пдс}}$). Значення цього Індeksu, як і за дії Конго червоного, були найбільшими у всіх дослідних варіантах, починаючи з концентрації 5 мг/л. Крім того, так само як і за дії Конго червоного, за дії Метиленового синього, другим за чутливістю індексом виявився Індекс зміни забарвлення ($I_{З_3}$). Індекс зміни кількості мутовок ($I_{З_{км}}$) опинився за чутливістю до Метиленового синього на останній третій позиції і фіксувався лише починаючи з концентрації 30 мг/л.

Таблиця 3.6 Індеси зміни морфофізіологічних показників *Ceratophyllum demersum* L. за дії Метиленового синього

Концентрація, мг/л	Приріст довжини, %	Кількість мутовок на 5 см	Забарвлення, бали
5	0,35	0	0,18
15	0,63	0	0,36
30	1,10	0,35	0,6
50	1,29	0,46	0,74
75	1,49	0,59	0,84

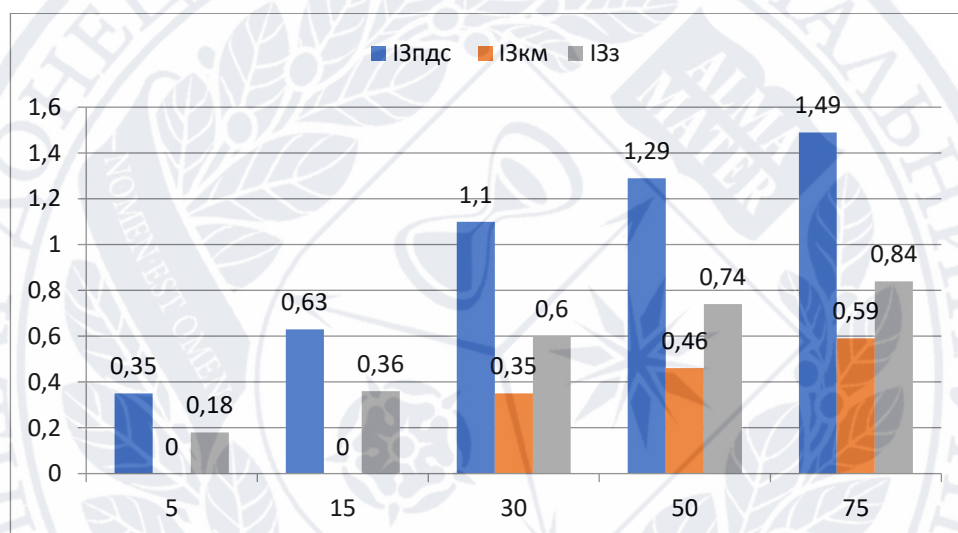


Рис. 3.5 Індеси зміни морфофізіологічних показників *Ceratophyllum demersum* L. за дії Метиленового синього.

На рис. 3.6 зафіксовано тренди та регресійні рівняння змін морфофізіологічних показників *Ceratophyllum demersum* L. за дії Метиленового синього. Коефіцієнт детермінації усіх одержаних моделей знаходяться в діапазоні 0,95-0,99, що означає, що 95-99% варіації відповідних залежних змінних (тобто показників) пояснюється варіацією незалежних змінних (тобто концентрацій) у регресійній моделі.

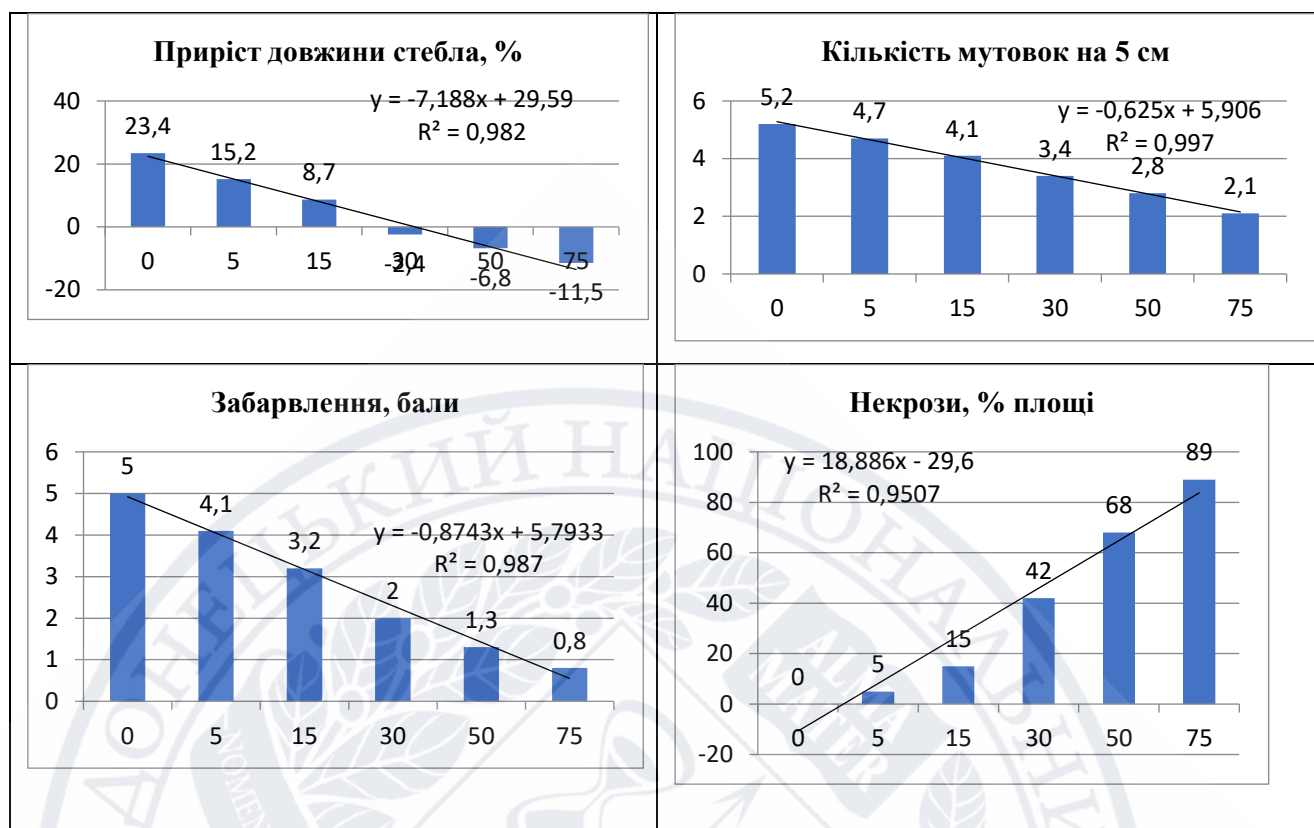


Рис. 3.6 Тренди та регресійні рівняння змін морфофізіологічних показників *Ceratophyllum demersum* L. за дії Метиленового синього

3.4. Вплив Метиленового синього на морфофізіологічні показники пістії шаруватої (*Pistia stratiotes* L.)

Результати оцінки впливу Метиленового синього на морфофізіологічні показники пістії шаруватої (*Pistia stratiotes* L.) представлені в таблиці 3.7. За концентрації 5 мг/л достовірна відмінність від контролю зафіксована лише за таким показником як некрози.

За концентрації 15 мг/л достовірна відмінність від контролю зафіксована уже за чотирма показниками: приростом діаметру розетки, приростом довжини коренів та забарвленням. Відмінності зафіксовані при $p < 0,05$ та $p < 0,01$. Лише показник кількості нових листків перебуває на рівні контролю.

За концентрації 30 мг/л суттєвих змін зазнає забарвлення рослини. Воно стає блакитним. Хоча позитивний приріст діаметра розетки ще зберігається, але він значно уповільнений порівняно з контролем. Кількість нових листків на

відміну від попереднього варіанту зменшується в 2, 7 рази і достовірність цієї різниці відповідає рівню $p < 0,01$. Приріст довжини коренів у цьому варіанті уповільнюється в 4,6 рази ($p < 0,01$). Некрози сягають $35 \pm 5\%$ площі.

За дії Метеленого синього в концентрації 50 мг/л зафіксовані помітні деструктивні процеси в розвитку пістії шаруватої (*Pistia stratiotes* L.). Через початок розпаду тканин спостерігається не збільшення, а зменшення діаметру розетки, а також довжини коренів. Середня кількість нових листків становить $0,6 \pm 0,2$, тобто зменшується більше ніж в 6 раз. Рослини набувають синюватого забарвлення.

Подальше поглиблення деструктивних процесів відмічено за концентрації Метиленового синього 75 мг/л. У цьому варіанті посилюється розпад тканин розетки і коренів, що відображається в зменшенні діаметру розетки та довжини коренів. Інгібується утворення нових листків, їх середня кількість становить $0,2 \pm 0,1$. Некротизація охоплює уже близько 81% поверхні. Забарвлення рослини набуває більш темного відтінку синього.

Таблиця 3.7 Вплив Метиленового синього на морфометричні показники *Pistia stratiotes* L.

Концентрація, мг/л	Приріст діаметра розетки, %	Кількість нових листків	Приріст довжини коренів, %	Забарвлення, бали	Некрози, %
0 (контроль)	$31,5 \pm 2,8$	$3,8 \pm 0,4$	$45,2 \pm 4,3$	$5,0 \pm 0,0$	0
5	$23,6 \pm 2,3$ $p > 0,05$	$3,2 \pm 0,4$ $p > 0,05$	$36,7 \pm 3,6$ $p > 0,05$	$4,3 \pm 0,3$ $p > 0,05$	6 ± 2 $p < 0,05$
15	$14,8 \pm 1,9$ $p < 0,01$	$2,3 \pm 0,4$ $p > 0,05$	$22,4 \pm 2,8$ $p < 0,05$	$3,4 \pm 0,4$ $p < 0,05$	19 ± 3 $p < 0,01$
30	$5,4 \pm 1,2$ $p < 0,01$	$1,4 \pm 0,3$ $p < 0,01$	$9,8 \pm 1,9$ $p < 0,01$	$2,5 \pm 0,4$ $p < 0,01$	35 ± 5 $p < 0,01$
50	$-1,8 \pm 0,8$ $p < 0,001$	$0,6 \pm 0,2$ $p < 0,01$	$-3,2 \pm 1,3$ $p < 0,001$	$1,7 \pm 0,3$ $p < 0,001$	62 ± 7 $p < 0,001$
75	$-7,3 \pm 1,4$ $p < 0,001$	$0,2 \pm 0,1$ $p < 0,001$	$-8,9 \pm 1,8$ $p < 0,001$	$1,1 \pm 0,2$ $p < 0,001$	81 ± 9 $p < 0,001$

У табл. 3.8 та на рис. 3.6 представлені Індеси зміни морфофізіологічних показників *Pistia stratiotes* L. за дії Метиленового синього. Хоча високою чутливістю відрізняється, як і за дії Конго червоного, Індекс зміни приросту діаметру розетки ($I_{З\text{пдр}}$), але Індекс зміни приросту довжини коренів ($I_{З\text{пдк}}$) практично з ним зрівнюється. Індекс зміни кількості нових листків ($I_{З\text{кнл}}$) демонструє більше значення порівняно з Індексом зміни забарвлення ($I_{Зз}$), починаючи від концентрації 30 мг/л. Але Індекс зміни забарвлення фіксується уже за концентрації 15 мг/л, а Індекс зміни кількості нових листків починає фіксуватися лише від концентрації 30 мг/л.

Таблиця 3.8 Індеси зміни морфофізіологічних показників *Pistia stratiotes* L. за дії Метиленового синього

Концентрація, мг/л	Приріст діаметра розетки, %	Кількість нових листків	Приріст довжини коренів, %	Забарвлення, бали	Некрози, %
0 (контроль)	31,5	3,8	45,2	5,0	0
5	0	0	0	0	0
15	0,53	0	0,50	0,32	1,35/0,34
30	0,82	0,63	0,78	0,5	2,73/0,68
50	1,06	0,84	1,07	0,66	3,63/0,91
75	1,23	0,95	1,20	0,78	4,16/1,04

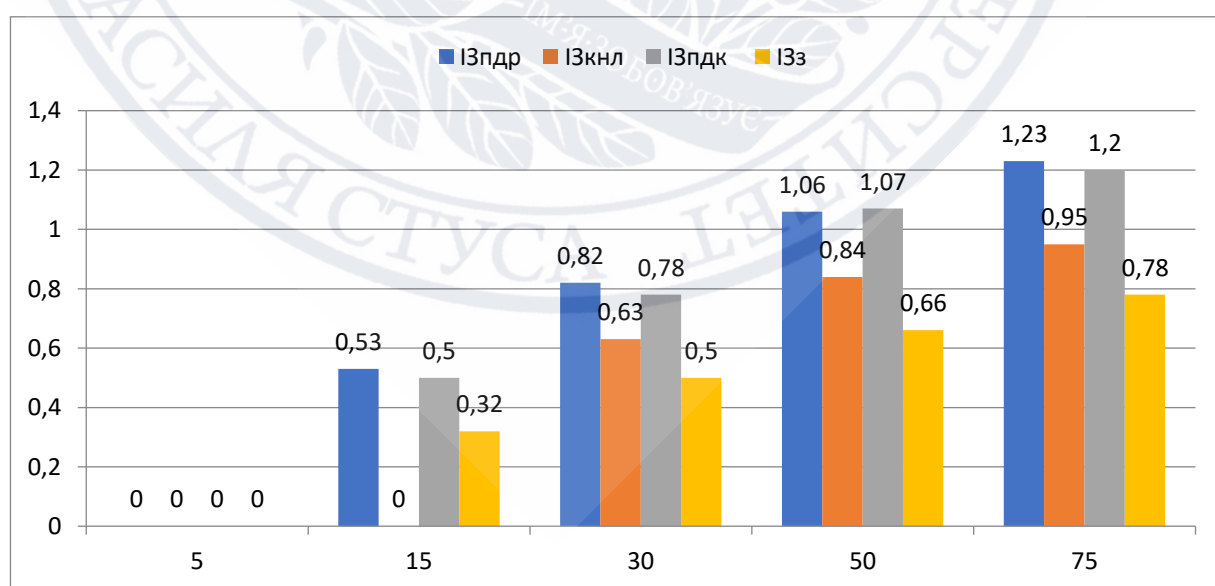


Рис. 3.7 Індеси зміни морфофізіологічних показників *Pistia stratiotes* L. за дії Метиленового синього.

На рис. 3.6 зафіксовано тренди та регресійні рівняння змін морфофізіологічних показників *Pistia stratiotes* L. за дії Метиленового синього. Коефіцієнти детермінації усіх одержаних моделей знаходяться в діапазоні 0,98-0,99, що означає, що 98-99% варіації відповідних залежних змінних (тобто морфофізіологічних показників) пояснюється варіацією незалежних змінних (тобто концентрацій).

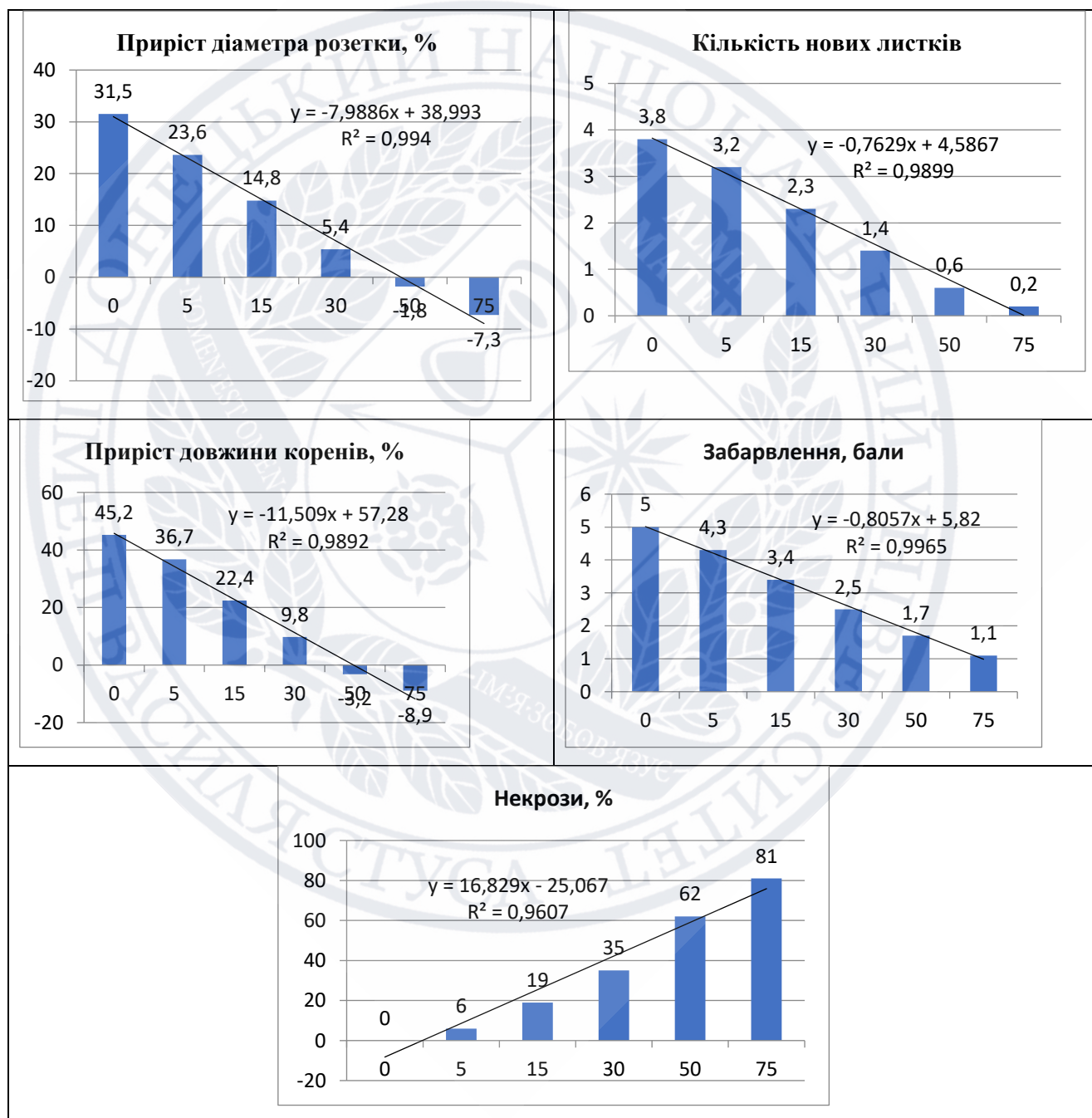


Рис. 3.8 Тренди та регресійні рівняння змін морфофізіологічних показників *Pistia stratiotes* L. за дії Метиленового синього

3.5. Порівняльний аналіз впливу досліджуваних синтетичних барвників на морфофізіологічні показники *Pistia stratiotes* L. та *Ceratophyllum demersum* L.

Одним із способів узагальнення виявлених нами особливостей впливу досліджуваних синтетичних барвників на морфофізіологічні показники модельних гідромакрофітів став порівняльний аналіз Інтегральних індексів зміни морфофізіологічних показників (ІЗ_{МФП}), які розраховувались нами як усереднена сума усіх Індексів зміни окремих морфофізіологічних показників. Такий підхід дозволив вирішити проблему співставлення реакції цих двох видів, незважаючи на суттєві морфологічні відмінності.

Результати співставлення Інтегральних індексів зміни морфофізіологічних показників (ІЗ_{МФП}) досліджених модельних гідромакрофітів за дії Конго червоного представлені в таблиці 3.9. та на рис.3.7. Як видно з представлених даних, за дії концентрацій 10 та 25 мг/л відмінностей у ІЗ_{МФП} між дослідженими видами не виявлено. Натомість, починаючи з концентрації 50 мг/л і до 100 мг/л включно ІЗ_{МФП} для *Pistia stratiotes* L. виявився дещо більшим, ніж для *Ceratophyllum demersum* L.

Таблиця 3.9. Інтегральний індекс зміни морфофізіологічних показників (ІЗ_{МФП}) *Pistia stratiotes* L. та *Ceratophyllum demersum* L. за дії Конго червоного

Концентрація, мг/л	<i>Pistia stratiotes</i> L.	<i>Ceratophyllum demersum</i> L.
10	0	0
25	0,26	0,26
50	0,57	0,42
75	0,78	0,74
100	0,95	0,88

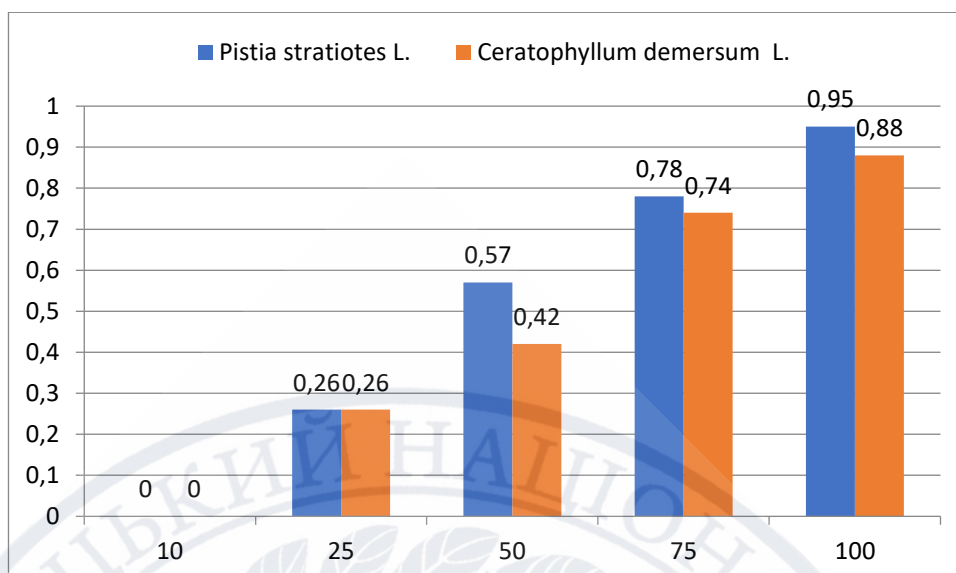


Рис. 3.9 Інтегральний індекс зміни морфофізіологічних показників (ПЗ_{МФП})

Pistia stratiotes L. та *Ceratophyllum demersum* L. за дії Конго червоного

Результати співставлення Інтегральних індексів зміни морфофізіологічних показників (ПЗ_{МФП}) досліджених модельних гідромакрофітів за дії Метиленового синього представлені в таблиці 3.9. та на рис.3.7. Цікаво, що за концентрації 5 мг/л у *Pistia stratiotes* L. взагалі не було зареєстровано змін морфофізіологічних параметрів, а у *Ceratophyllum demersum* L. ПЗ_{МФП} дорівнював 0,18. Подалі до концентрації 30 мг/л включно ПЗ_{МФП} порівнюваних видів практично не відрізнялися. Концентрація 50 мг/л продемонструвала дещо більше значення ПЗ_{МФП} для *Pistia stratiotes* L. порівняно з *Ceratophyllum demersum* L. і ця невелика відмінність зберігалася і за концентрації 75 мг/л.

Таблиця 3.10. Інтегральний індекс зміни морфофізіологічних показників (ПЗ_{МФП}) *Pistia stratiotes* L. та *Ceratophyllum demersum* L. за дії Метиленового синього

Концентрація, мг/л	<i>Pistia stratiotes</i> L.	<i>Ceratophyllum demersum</i> L.
5	0	0,18
15	0,34	0,33
30	0,68	0,68

50	0,91	0,83
75	1,04	0,97

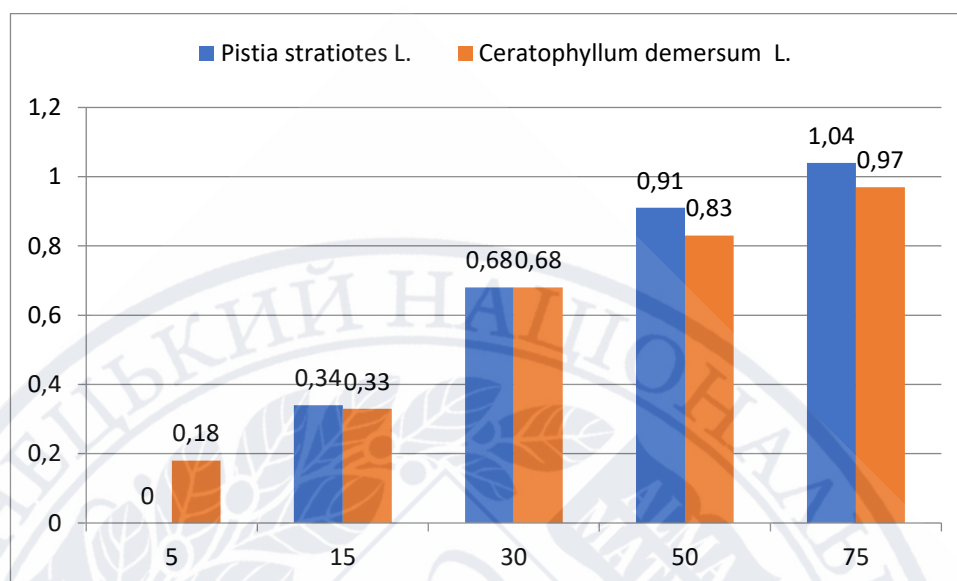


Рис. 3.10 Інтегральний індекс зміни морфофізіологічних показників (ПЗ_{МФП}) *Pistia stratiotes* L. та *Ceratophyllum demersum* L. за дії Метиленового синього

3.6. Розрахунок ЛД₅₀ для модельних гідромакрофітів під впливом Конго червоного та Метиленового синього із застосуванням пробіт-аналізу та лінійної інтерполяції між сусідніми точками

Розрахунок ЛД₅₀ з використанням пробіт-аналізу

Одним із пріоритетних методів визначення ЛД₅₀ у токсикології, екології та гідробіології є пробіт-аналіз. Термін «probit» – складена і водночас скорочена назва з двох слів «probability unit», що в перекладі українською означає «одиниця ймовірності».

Ідею пробіт-аналізу вперше опублікував у журналі «Science» Честер Іттнер Блісс у 1934 році [10]. Досліджуючи вплив інсектицидів та фумігантів на комах-шкідників, вчений помітив, що кумулятивна S-подібна крива «доза-ефект» не віддзеркалювала реальну відповідність між дозою препарату та

смертністю комах через свій асиметричний характер. А досягти симетричності цієї кривої можна лише в тому випадку, якщо рівні додавання дози при всіх концентраціях призводять до рівних приростів летальної дії. Тому вчений став шукати методи, які можуть перетворити S-подібну криву залежності дози від смертності на пряму лінію. Для значень на шкалі абсцис (вісь x), які повинні були відображати концентрацію речовин, він використав десятковий логарифм відповідних концентрацій. А для значень на шкалі ординат (вісь y), які повинні були відображати смертність організмів, він запропонував спеціальне кодування відсотків смертності в одиниці нормалізованих ймовірностей (пробіти). Для цього він використав таблиці Пірсона. У той час як логістична регресія використовує S-подібну криву логістичного розподілу для моделювання ймовірностей, пробіт-регресія використовує кумулятивну функцію розподілу (CDF) стандартного нормального розподілу. Строго кажучи, пробіт-перетворення є оберненою функцією кумулятивного розподілу стандартного нормального розподілу. Пробіт-модель визначається як ймовірнісна модель, яка використовує кумулятивний нормальний розподіл для оцінки ймовірності настання події, де випадкова величина може бути лінійною функцією кількох пояснювальних змінних. Корисність цієї аналітичної методики полягає в тому, щоб повідомляти про нахил нормалізованих ймовірностей (нахил пробітів), який обробляється з погляду десятих логарифмів концентрацій, та слугує ефективним способом порівняння токсичності досліджуваних доз. Т. Postelnicu [32] назвав розроблений Ч.І. Бліссом пробіт-аналіз «найбільш логічним методом» визначення ефективних доз пестицидів. Лінеаризація приносить дослідникам велику зручність, оскільки дозволяє їм моделювати пряму лінію безпосередньо за допомогою лінійної комбінації інших змінних. Запропонований І. Бессом метод був подальше розвинутий Д.Дж.Фінні [18], який до того ж опублікував удосконалені таблиці для трансформації відсотків смертності у пробіти.

Застосована в нашій роботі схема пробіт-аналізу включала ряд послідовних етапів: перетворення концентрацій та відсотка загибелі *гідромакрофітів* в розчині *барвників* у логарифмічно-пробітну розмірність → побудова точкового графіку регресійної залежності пробіт-загибелі *гідромакрофітів* від логарифму концентрації *барвника* → визначення лінії тренду та формули рівняння регресії → заміна показника **y** в рівнянні регресії на 5 пробітів (що відповідає 50% загибелі) та визначення за відповідною пропорцією тієї логарифмічної концентрації, що відповідає ЛД₅₀ → визначення антилогарифма відповідної логарифмічної концентрації для переведення її в абсолютне значення (мг/л).

Для перетворення відсотка загибелі рослин у пробіти нами була використана таблиця Finney (табл. 3.11).

Таблиця 3.11 Таблиця Фінні (Finney) для перетворення відсотка загибелі організмів у пробіти

Загибель (в %)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
99	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	8,09

У табл. 3.12 подано концентрації *конго червоного*, трансформовані в десяткові логарифми та відсотки загибелі *Ceratophyllum demersum* L., трансформовані в пробіти за допомогою табл. 3.11 цієї таблиці видно, що

максимальна загибель, яка була зафіксована при 100 мг/л, у відсотках становить 89%, а у пробітах – 6,23. А ось концентрація конго червоного 10 мг/л не спричиняла загибелі *Ceratophyllum demersum* L.

Таблиця 3.12 Перетворення концентрацій та відсотків загибелі *Ceratophyllum demersum* L. за дії **Конго червоного** у логарифмічно-пробітну розмірність

Концентрація, мг/л	Log(C)	Загибель, %	Пробіти
0 (контроль)	-	-	-
10	1,0	-	-
25	1,397 9	11	3,77
50	1,698 97	33	4,56
75	1,875 061	67	5,44
100	2,0	89	6,23

На основі показників десятикових логарифмів концентрацій та пробіт-загибелі *Ceratophyllum demersum* L. у експозиційних розчинах конго червоного була побудована точкова діаграма (рис. 3.11), на якій зазначено рівняння регресії з високим рівнем детермінації (R^2) та лінія тренду.

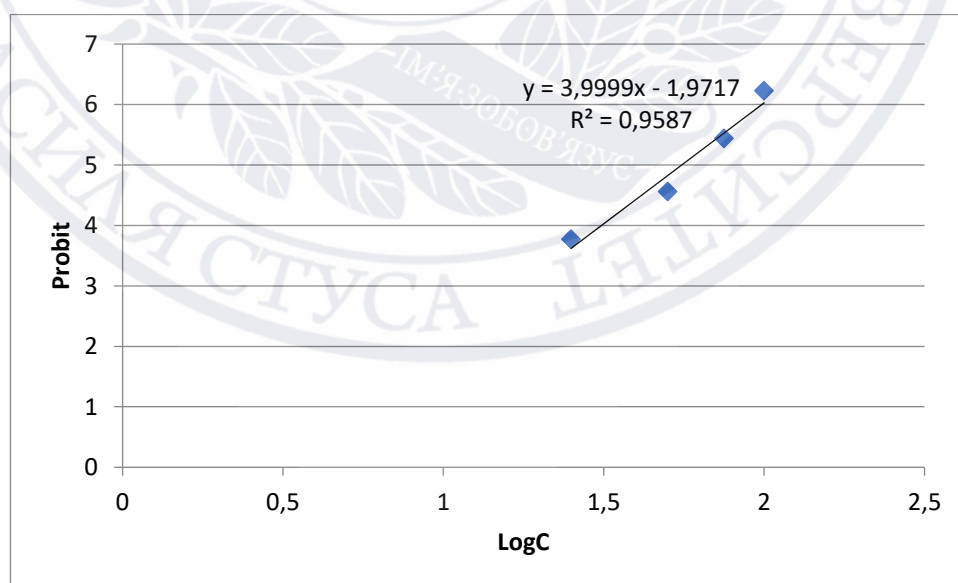


Рисунок 3.11 – Діаграма залежності пробіт-загибелі *Ceratophyllum demersum* L. від десятикового логарифму концентрацій **Конго червоного**

У табл. 3.13 продемонстровано алгоритм визначення ЛД₅₀ для *Ceratophyllum demersum* L. під впливом конго червоного на основі отриманого рівняння регресії. Встановлено, що для даного гідромакрофіта ЛД₅₀ становить 55 мг/л.

Таблиця 3.13 Розрахунок LD₅₀ для *Ceratophyllum demersum* L. за дії **Конго червоного** методом пробіт-аналізу

Рівняння регресії	$y = 3,999x - 1,971$
Пропорція для пробіту 5, який відповідає 50% загибелі	$5 = 3,999x - 1,971$
Визначення x	$x = (5 + 1,971)/3,999 = 1,74$
Визначення антилогарифму x: • якщо $\log_{10} N = x$; • то N є антилогарифмом x по основі 10; • $N = 10^x$	$10^{1,74} = 54,954087 \approx 55 \text{ мг/л}$

Подібно до *Ceratophyllum demersum* L., доза конго червоного 10 мг/л також не спричиняла загибелі *Pistia stratiotes* L. протягом дослідженого періоду. А ось дози 75 і 100 мг/л спричиняли у *Pistia stratiotes* L. загибель відповідно 44 і 72 %, або 4,85 та 5,58 пробіт (табл. 3.14). Натомість для *Ceratophyllum demersum* L. відсоткова загибель за цих же концентрацій конго червоного становила 67% та 89%, а пробітна – 5,44 та 6,33 відповідно (див. табл. 2), що сигналізує про дещо більшу чутливість *Ceratophyllum demersum* L. до цього барвника.

Таблиця 3.14 Перетворення концентрацій та відсотків загибелі *Pistia stratiotes* L. за дії **Конго червоного** у логарифмічно-пробітну розмірність

Концентрація, мг/л	Log(C)	Загибель, %	Пробіт
0 (контроль)	-	-	-
10	1,0	-	-
25	1,3979	6	3,45
50	1,69897	22	4,23
75	1,875061	44	4,85
100	2,0	72	5,58

На основі рівняння регресії (табл. 3.12), було визначено, що ЛД₅₀ для *Pistia stratiotes* L. під впливом конго червоного становить 76, у той час як для *Ceratophyllum demersum* L. – 55, що ще раз підтверджує більшу чутливість *Ceratophyllum demersum* L. до впливу конго червоного порівняно з *Pistia stratiotes* L. (табл. 5).

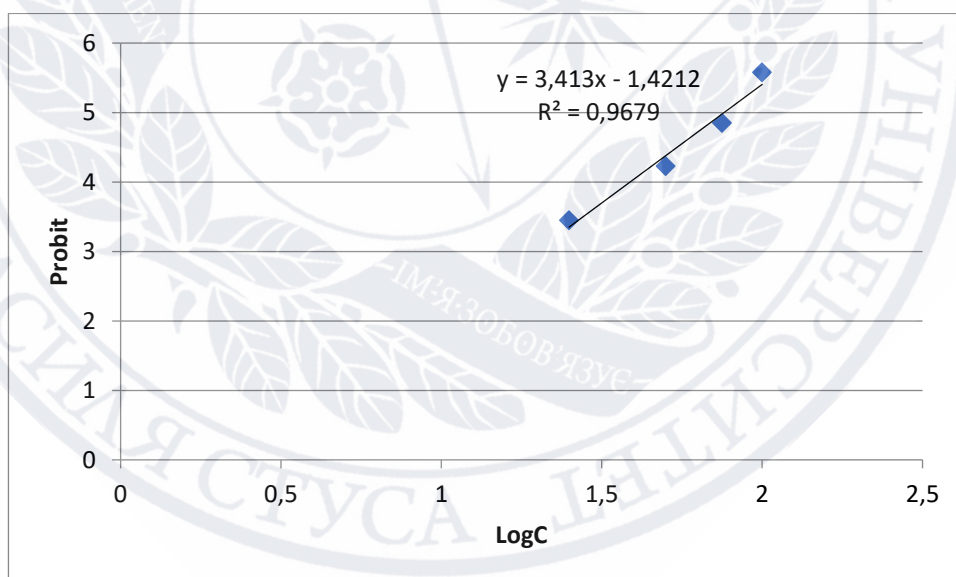


Рисунок 3.12 – Діаграма залежності пробіт-загибелі *Pistia stratiotes* L. від десятичного логарифму концентрацій **конго червоного**

Таблиця 3.15 Розрахунок LD_{50} для *Pistia stratiotes* L. за дії **Конго червоного** методом пробіт-аналізу

Рівняння регресії	$y = 3,413x - 1,421$
Пропорція для пробіту 5, який відповідає 50% загибелі	$5 = 3,413x - 1,421$
Визначення x	$x = (5 + 1,421) / 3,413 = 1,88$
Визначення антилогарифму x : - якщо $\log_{10} N = x$; - то N є антилогарифмом x по основі 10; $N = 10^x$	$10^{1,88} = 75.857758 \approx 76 \text{ мг/л}$

Якщо *Конго червоний* не викликає загибелі обох гідромакрофітів при концентрації 10 мг/л, то *Метиленовий синій* спричиняє загибель 6% рослин *Ceratophyllum demersum* L. уже при концентрації 5 мг/л. А під впливом дози 75 мг/л має місце вже 100-відсоткова загибель *Ceratophyllum demersum* L. (табл. 3.16), що відповідає значенню 8,09 пробіт.

Таблиця 3.16 Перетворення концентрацій та відсотків загибелі *Ceratophyllum demersum* L. за дії **Метиленового синього** у логарифмічно-пробітну розмірність

Концентрація, мг/л	Log(C)	Загибель, %	Пробіти
0 (контроль)	-	-	-
5	0,698 970	6	3,45
15	1,176 091	22	4,23
30	1,477 121	56	5,15
50	1,698 970	78	5,77
75	1,875 061	100	8,09

Цікаво, що в рівнянні регресії, яке демонструє залежність загибелі *Ceratophyllum demersum* L. від логарифмічної концентрації **метиленового**

синього, біля вільного члена рівняння зафіксовано позитивний знак, чого не спостерігалось у варіантах з використанням конго червоного (рис.3).

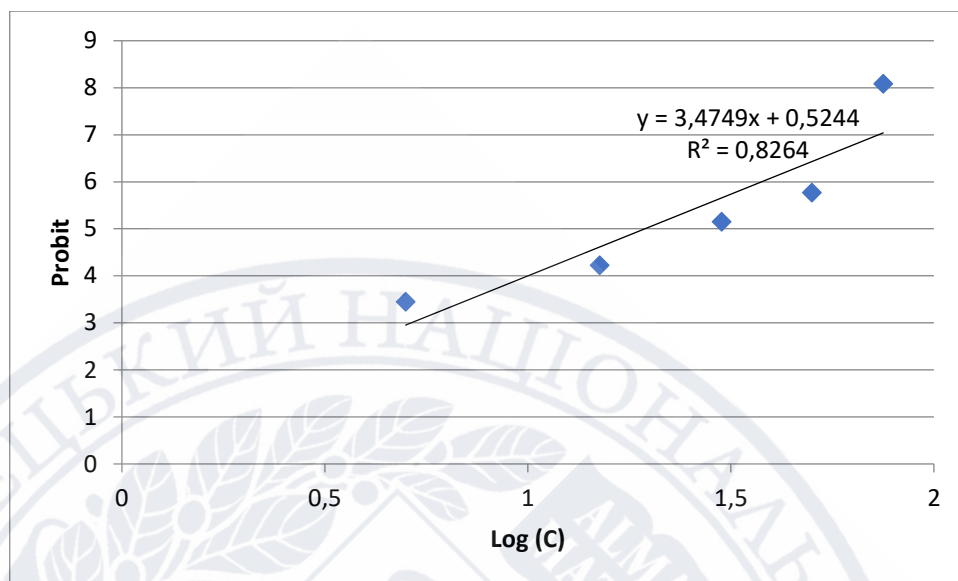


Рисунок 3.13 Діаграма залежності пробіт-загибелі *Ceratophyllum demersum* L. від десятичного логарифму концентрації **метиленового синього**

Особливістю впливу **метиленового синього** на *Ceratophyllum demersum* L. є найнижча ЛД₅₀ в нашому експерименті – 20 мл/л (табл.7), тобто для того, щоб даний барвник проявив свою смертоносну дію достатньо значно меншої його концентрації порівняно з конго червоним.

Таблиця 3.17 Розрахунок LD₅₀ для *Ceratophyllum demersum* L. за дії **Метиленового синього** методом пробіт-аналізу

Рівняння регресії	$y = 3,474x + 0,524$
Пропорція для пробіту 5, який відповідає 50% загибелі	$5 = 3,474x + 0,524$
Визначення x	$x = (5 - 0,524) / 3,474 = 1,29$
Визначення антилогарифму x:	$10^{1,29} = 19.50 \approx 20$
• якщо $\log_{10} N = x$; • то N є антилогарифмом x по основі 10; • $N = 10^x$	

Вид *Pistia stratiotes* L. показав себе стійкішим до впливу і цього барвника. Зокрема, це видно по менших значеннях відсоткової та пробітної загибелі *Pistia stratiotes* L. порівняно з *Ceratophyllum demersum* L. за однакових концентрацій *Метиленового синього* (табл.6 , табл.8).

Таблиця 3.18 Перетворення концентрацій та відсотків загибелі *Pistia stratiotes* L. за дії *Метиленового синього* у логарифмічно-пробітну розмірність

Концентрація, мг/л	Log(C)	Загибель, %	Пробіти
0 (контроль)		-	
5	0,698 970	6	
15	1,176 091	17	4,05
30	1,477 121	39	4,72
50	1,698 970	72	5,58
75	1,875 061	94	6,55

І знову рівняння регресії демонструє позитивний знак при вільному члені (рис.4). Цікаво, що ця особливість супроводжується низьким значенням ЛД₅₀. При цьому, хоча у *Pistia stratiotes* L. цей показник дещо вищий, ніж у *Ceratophyllum demersum* L., але все ж таки є доволі низьким – 27 (табл. 9).

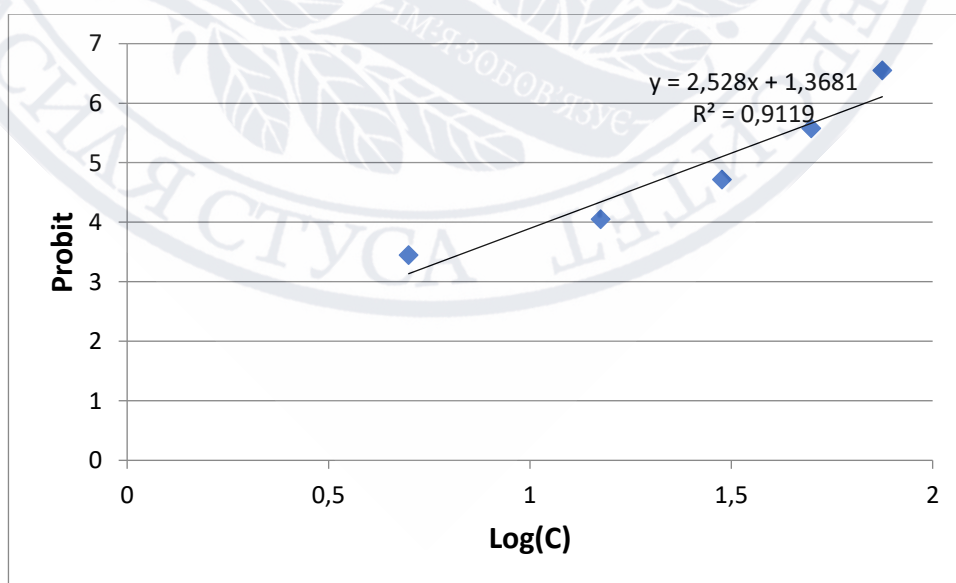


Рисунок 3.14 Діаграма залежності пробіт-загибелі *Pistia stratiotes* L. від десятичного логарифму концентрації *Метиленового синього*

Таблиця 3.19 Розрахунок LD₅₀ для *Pistia stratiotes* L. за дії **Метиленового синього** методом пробіт-аналізу

Рівняння регресії	$y = 2,528x + 1,368$
Пропорція для пробіту 5, який відповідає 50% загибелі	$5 = 2,528x + 1,368$
Визначення x	$X = (5 - 1,368) / 2,528 = 1,4367$
Визначення антилогарифму x: • якщо $\log_{10} N = x$; • то N є антилогарифмом x по основі 10; • $N = 10^x$	$10^{1,4367} = \mathbf{27.333799} \approx \mathbf{27 \text{ мг/л}}$

Розрахунок LD₅₀ шляхом лінійної інтерполяції між сусідніми точками

Досить простим альтернативним підходом визначення LD₅₀ є метод інтерполяції між сусідніми точками [44].

Інтерполяція – це метод знаходження значення між відомими точками даних. Наприклад, якщо у нас є дві відомі точки даних (x_0, y_0) та (x_1, y_1), і ми хочемо оцінити будь-яке значення у для заданого значення x, що знаходиться десь між цими двома точками даних. Для інтерполяції знаходять інтервал, у якому лежить шукане значення x, та використовують відповідну функцію для інтерполяції. Лінійно інтерпольована оцінка для у — це функція прямої лінії, яку можна виразити через формулу 3.1.

$$y = F(x) = y_0 + (x - x_0) \times \frac{y_1 - y_0}{x_1 - x_0} \quad (3.1)$$

Хоча автори публікацій, присвячених токсикологічним дослідженням застосовують як пробіт-аналіз [38; 40], так і інтерполяцію між сусідніми точками [24; 33], проте відсутні порівняння цих підходів в одному експерименті. Ми вирішили надолужити цю прогалину і порівняти результати

оцінки ЛД₅₀ за допомогою цих двох підходів в нашому експерименті на модельних гідромакрофітах.

Для *Ceratophyllum demersum* L. концентрація ЛД₅₀ за інтоксикації під впливом **Конго червоного** при розрахунку методом інтерполяції становила 63 мг/л (табл. 3.20), тоді як пробіт-аналіз показав значно менше значення – 55 мг/л (див. табл. 3.13).

Таблиця 3.20 – Визначення ЛД₅₀ для *Ceratophyllum demersum* L. за дії **Конго червоного** методом лінійної інтерполяції

Концентрація, мг/л у	Загибель, % х
0 (контроль)	-
10	-
25	11
50	33
75	67
100	89
$y = F(x) = y_0 + (x - x_0) \times \frac{y_1 - y_0}{x_1 - x_0}$ $y = F(x) = 50 + (50 - 33) \times \frac{75 - 50}{67 - 33} = 50 + 17 \times \frac{25}{34} = 62,5 \approx 63 \text{ мг/л}$	

Для *Pistia stratiotes* L. за впливу **конго червоного** метод інтерполяції оцінив ЛД₅₀ на рівні 80 мг/л (табл. 3.21), тоді як пробіт-аналіз – на рівні 76 мг/л (див. табл. 3.15). Хоча пробіт-аналіз, як і в попередньому варіанті, засвідчив менше значення ЛД₅₀, але в даному варіанті різниця в оцінці цього показника альтернативними методами виявилася значно меншою.

Таблиця 3.21 – Визначення ЛД₅₀ для *Pistia stratiotes* L. за дії **конго червоного** методом лінійної інтерполяції

Концентрація, мг/л y	Загибель, % x
0 (контроль)	-
10	-
25	6
50	22
75	44
100	72
$y = F(x) = y_0 + (x - x_0) \times \frac{y_1 - y_0}{x_1 - x_0}$ $y = F(x) = 75 + (50 - 44) \times \frac{100 - 75}{72 - 44} = 75 + 6 \times \frac{25}{28} = \mathbf{80,35} \approx 80 \text{ мг/л}$	

Метод інтерполяції засвідчив ЛД₅₀ для *Ceratophyllum demersum* L. під впливом **метиленового синього** на рівні 27 мг/л (табл. 3.22), натомість пробіт – аналіз – на рівні 20 мг/л (див. табл.3.17).

Таблиця 3.22 Визначення ЛД₅₀ для *Ceratophyllum demersum* L. за дії **Метиленового синього** методом лінійної інтерполяції

Концентрація, мг/л x	Загибель, % y
0 (контроль)	-
5	6
15	22
30	56
50	78
75	100
$y = F(x) = y_0 + (x - x_0) \times \frac{y_1 - y_0}{x_1 - x_0}$ $y = F(x) = 15 + (50 - 22) \times \frac{30 - 15}{56 - 22} = 15 + 28 \times \frac{15}{34} = \mathbf{27,35} \approx 27 \text{ мг/л}$	

ЛД₅₀ для *Pistia stratiotes* L. за дії **метиленового синього** при розрахунку методом інтерполяції становила 37 мг/л (табл.3.23), а при розрахунку за допомогою пробіт-аналізу – 27 мг/л (див. табл. 3.19).

Таблиця 3.23 Визначення ЛД₅₀ для *Pistia stratiotes* L. за дії *Метиленового синього* методом лінійної інтерполяції

Концентрація, мг/л y	Загибель, % x
0 (контроль)	-
5	6
15	17
30	39
50	72
75	94

$$y = F(x) = y_0 + (x - x_0) \times \frac{y_1 - y_0}{x_1 - x_0}$$

$$y = F(x) = 30 + (50 - 39) \times \frac{50 - 30}{72 - 39} = 30 + 11 \times \frac{20}{33} = 36,66 \approx 37 \text{ мг/л}$$

Гістограма на рис. 3.24 наочно ілюструє як різницю між значеннями ЛД₅₀ дослідних варіантів, так і між підходами щодо оцінки цього показника.

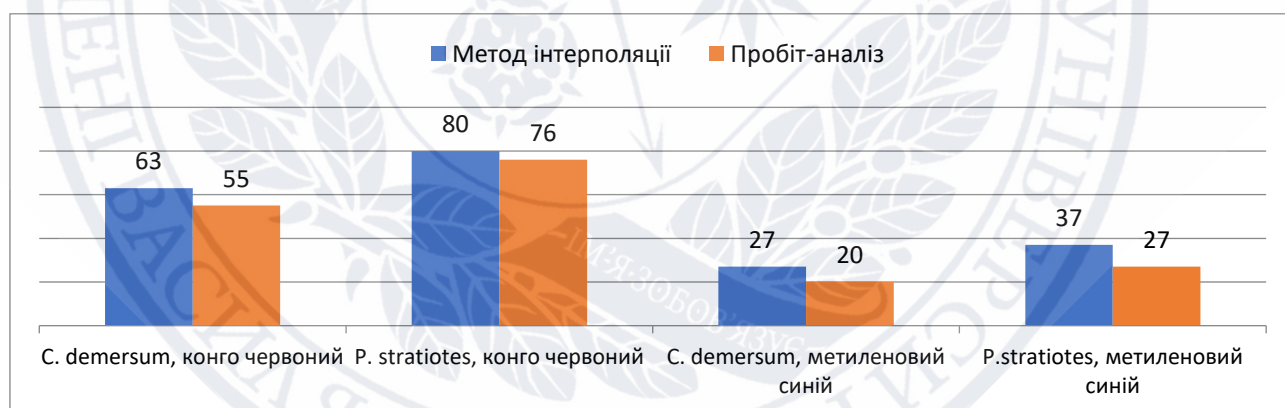


Рис. 3.24 ЛД₅₀, визначені для досліджених видів гідромакрофітів за дії *Конго червоного* та *Метиленового синього* методами пробіт-аналізу та інтерполяції.

Загалом, значення ЛД₅₀ для *Ceratophyllum demersum* L. виявилося меншим порівняно з *Pistia stratiotes* L. за дії обох барвників і не залежно від методу його оцінки. Це свідчить про більшу чутливість і меншу резистентність *Ceratophyllum demersum* L. порівняно з *Pistia stratiotes* L. до штучних барвників.

Для обох модельних гідромакрофітів *метиленовий синій* виявився більш токсичним барвником порівняно з *конго червоним*.

Метод пробіт-аналізу в усіх дослідних варіантах давав менше значення LD_{50} порівняно з методом лінійної інтерполяції. Різниця у значеннях LD_{50} , одержаних цими підходами, коливалася в межах від 4 до 10 мг/л. Водночас, загальні закономірності щодо чутливості модельних видів і щодо токсичності барвників повністю зберігалися.

Рівняння регресійної залежності між десятковими логарифмами концентрацій та пробіт-виживанням характеризуються певною узгодженістю між знаком біля вільного члена та величиною LD_{50} : якщо відповідний знак у рівнянні позитивний, то подальше розраховуване значення LD_{50} буде маленьким, а якщо цей знак від'ємний, то слід очікувати, що значення LD_{50} буде більш високим.

3.7. Співставлення результатів оцінки LD_{50} та морфофізіологічних змін модельних гідромакрофітів

Порівнюючи результати оцінки LD_{50} та морфофізіологічних змін модельних гідромакрофітів в нашому дослідженні можна помітити одну невідповідність – морфофізіологічні зміни дещо сильніше виражені (хоча і незначні) у пістії шаруватої, а LD_{50} нижче у куширу зануреного (див. табл. 3.9, 3.10, 3.24). Менші значення LD_{50} (при обох способах розрахунку) у куширу зануреного свідчать про те, що у даного виду загибель рослин починається при менших концентраціях барвників, ніж у пістії шаруватої.

Спробуємо пояснити цей феномен.

По-перше, звернемо увагу на різні життєві форми цих рослин і відповідно на різні реакції на токсикантів.

Пістія шарувата (*Pistia stratiotes* L.) – плаваюча рослина, корені якої у воді, а листові розетки на поверхні води. *Pistia stratiotes* є плаваючим макрофітом, що поєднує підводну кореневу систему з надводною листовою

розеткою. Це забезпечує розподіл навантаження між різними органами та дозволяє рослині довший час протистояти дії токсиканта, проходячи послідовні стадії сублетального стресу, які проявляються у вигляді хлорозу, некрозу, зменшенні діаметру розетки та довжини коренів. Вона отримує стрес одночасно через кореневу систему і через листову поверхню. Пістія довше «тримається», але показує виразні морфофізіологічні зміни.

Кушир занурений (*Ceratophyllum demersum* L.) – повністю під водою і постійно контактує з барвником усією поверхнею. Це призводить до швидшої акумуляції токсичних речовин та гострішої стресової відповіді, що нерідко завершується загибеллю до того, як встигають сформуватися виражені морфологічні або анатомічні зміни. Таким чином, у більш чутливого виду інтенсивніший летальний ефект може передувати сублетальним проявам. Це може приводити до швидшої загибелі, навіть до того, як морфофізіологічні зміни встигнуть сформуватися.

Тобто більша смертність не означає сильніші зміни, а лише більшу чутливість.

Оцінка морфофізіологічних змін проводилася лише на тих рослинах, що вижили. І це *справді може спотворювати порівняння між видами*.

У куширу слабші екземпляри просто загинули раніше і не потрапили до групи, де фіксували ступінь морфологічних порушень. Під час дослідження ми аналізували лише «виживших чемпіонів», які витримали токсикант найбільш стійко.

У пістії ж рослини виживали частіше, тому встигали пройти стадії виразних морфофізіологічних змін.

У результаті: у кушира — більше загибелі, але менше видимих змін у «виживших»; у пістії — менше загибелі, але більші морфофізіологічні прояви стресу.

Чутливий вид просто «випадає» до появи морфофізіологічних симптомів у нього смертність зростає раніше, ніж розвиваються сублетальні

зміни. Це чіткий сигнал про різну толерантність і різні механізми стрес-відповіді у досліджених модельних видів.

По-друге, необхідно враховувати особливості процедури оцінювання морфофізіологічних показників. Аналіз сублетальних змін здійснювався лише на рослинах, що вижили на момент спостереження. У випадку *Ceratophyllum demersum* значна частина більш чутливих до токсиканта екземплярів випадала з вибірки через загибель на ранніх етапах. Унаслідок цього морфофізіологічна оцінка спиралася переважно на стійкіші особини, що закономірно знижувало видиму вираженість змін. Водночас у *Pistia stratiotes* більша частка рослин зберігала життєздатність протягом усього експерименту, що давало змогу зафіксувати повний спектр сублетальних порушень.

Отже, отримані результати не лише не суперечать логіці токсикологічних реакцій, але й відображають типовий для гідробіонтів патерн: види з нижчим порогом толерантності демонструють вищу смертність, тоді як види з більшою стійкістю — ширший спектр морфофізіологічних змін. Поєднання специфіки життєвої форми, диференційованого впливу токсиканта на органи та вибіркової вибірки під час оцінювання дозволяє цілком переконливо пояснити встановлені міжвидові розбіжності.

ВИСНОВКИ

1. Доведено, що для обох модельних гідромакрофітів Метиленовий синій виявився більш токсичним барвником порівняно з Конго червоним як за результатами морфофізіологічного аналізу, так і за оцінкою ЛД₅₀.

2. Показано, що найчутливішим показником до впливу синтетичних барвників у *Pistia stratiotes* L. слугує приріст діаметру листових розеток, а у *Ceratophyllum demersum* L. – приріст стебла в довжину. Нотомість найстійкішим показником у *Pistia stratiotes* L. виступає кількість нових листків, а у *Ceratophyllum demersum* L. – кількість листових мутовок в розрахунку на фіксований відрізок стебла.

3. Доведена ефективність запропонованої в роботі методики визначення Інтегрального індексу зміни морфофізіологічних показників, який дозволяє звести до одного знаменника зміни усіх морфофізіологічних показників модельного виду. Показано, що такий підхід спрощує порівняльний аналіз видів, які мають різну морфологію і навіть різну життєву форму.

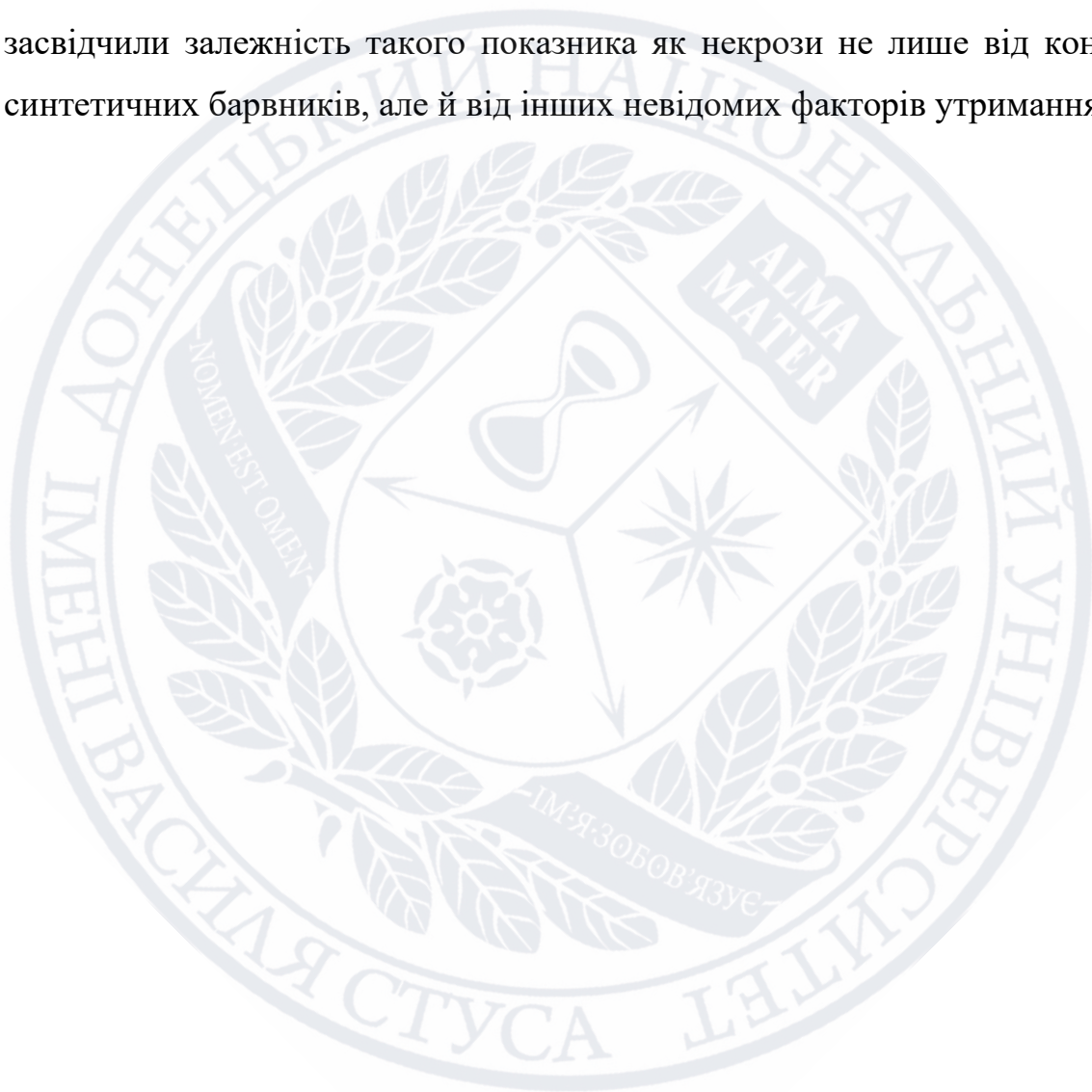
4. Зафіксовано, що морфофізіологічні зміни дещо сильніше виражені (хоча і незначні) у пістії шаруватій, а ЛД₅₀ нижче у куширу зануреного. Цей феномен пояснено тим, що морфофізіологічні зміни фіксувалися лише у рослин, що вижили, тому у більш чутливого виду (кушира), який демонстрував вищу смертність, вираженість цих змін у вибірці була нижчою, тоді як менш чутлива пістія виявляла ширший спектр сублетальних порушень.

5. З'ясовано, що метод пробіт-аналізу в усіх дослідних варіантах дає менші значення ЛД₅₀ порівняно з методом лінійної інтерполяції. Різниця у значеннях ЛД₅₀, одержаних цими підходами, коливалася в межах від 4 до 10 мг/л. Водночас, загальні закономірності щодо чутливості модельних видів і щодо токсичності барвників повністю зберігалися.

6. Встановлено, що ЛД₅₀ для *Ceratophyllum demersum* L. має менше значення, ніж для *Pistia stratiotes* L. за дії обох синтетичних барвників і не залежно від способу розрахунку цього показника. Методом пробіт-аналізу

встановлено, що ЛД₅₀ для *Ceratophyllum demersum* L. за дії Конго червоного становить 55 мг/л, а за дії Метиленового синього – 20 мг/л. Натомість ЛД₅₀ для *Pistia stratiotes* L. за дії Конго червоного становить 76 мг/л, а за дії Метиленового синього – 27 мг/л.

7. Коефіцієнти детермінації, визначені для регресійних рівнянь залежності морфофізіологічних показників рослин від концентрації барвників, засвідчили залежність такого показника як некрози не лише від концентрації синтетичних барвників, але й від інших невідомих факторів утримання рослин.



СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ПОСИЛАНЬ

1. Adomas B., Sikorski Ł., Beś A., Warmiński K. Exposure of *Lemna minor* L. to gentian violet or Congo red is associated with changes in the biosynthesis pathway of biogenic amines. *Chemosphere*. 2020. Vol. 254. P. 126752.
2. Ahila K. G., Ravindran B., Muthunarayanan V., Nguyen D. D., Nguyen X. C., Chang S. W., ... & Thamaraiselvi, C. Phytoremediation potential of freshwater macrophytes for treating dye-containing wastewater. *Sustainability*. 2020. Vol. 13(1). P. 329.
3. Al-Tohamy R., Ali S. S., Li F., Okasha K. M., Mahmoud Y. A. G., Elsamahy T, & Sun J. A critical review on the treatment of dye-containing wastewater: Ecotoxicological and health concerns of textile dyes and possible remediation approaches for environmental safety. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2022. Vol. 231. P. 113160.
4. Ardila-Leal L. D., Poutou-Piñales R. A., Pedroza-Rodríguez A. M., Quevedo-Hidalgo B. E. A brief history of colour, the environmental impact of synthetic dyes and removal by using laccases. *Molecules*. 2021. Vol. 26(13). P. 3813.
5. Asses N., Ayed L., Hkiri N., & Hamdi M. Congo red decolorization and detoxification by *Aspergillus niger*: removal mechanisms and dye degradation pathway. *BioMed Research International*. 2018. Vol. P. 3049686.
6. Baker R. M. *Nineteenth century synthetic textile dyes. Their history and identification on fabric*. Doctoral dissertation. University of Southampton, 2011.
7. Benkhaya S., M'rabet S., El Harfi A. Classifications, properties, recent synthesis and applications of azo dyes. *Heliyon*. 2020. Vol. 6(1). P. e03271.
8. Berradi M., Hsissou R., Khudhair M., Assouag M., Cherkaoui O., El Bachiri A. & El Harfi A. Textile finishing dyes and their impact on aquatic environs. *Heliyon*. 2019. Vol. 5(11). P. e02711.
9. Bide M. Sustainable dyeing with synthetic dyes. In *Roadmap to sustainable textiles and clothing: eco-friendly raw Materials, technologies, and processing methods* (pp. 81-107). Singapore: Springer Singapore, 2014. P. 81–107.

10. Bliss Ch. I. The method of probits. *Science*. 1934. Vol. 79(2037). P. 38–39.
11. Brüscheweiler B. J., Merlot C. Azo dyes in clothing textiles can be cleaved into a series of mutagenic aromatic amines which are not regulated yet *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2017. Vol. 88. P. 214–226.
12. Chandanshive V. V., Kadam S. K., Khandare R. V., Kurade M. B., Jeon B. H., Jadhav J. P., & Govindwar S. P. In situ phytoremediation of dyes from textile wastewater using garden ornamental plants, effect on soil quality and plant growth. *Chemosphere*. 2018. Vol. 210. P. 968–976.
13. Chung K. T. Azo dyes and human health: A review. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*. 2016. Vol. 34(4). P. 233–261.
14. Dutta P., Rabbi M., Sufian M., Mahjebin S. Effects of textile dyeing effluent on the environment and its treatment: A review. *Engineering and Applied Science Letters*. 2022. Vol. 5. P. 1–17.
15. Dutta S., Adhikary S., Bhattacharya S., Roy D., Chatterjee S., Chakraborty A., ... & Rajak P. Contamination of textile dyes in aquatic environment: Adverse impacts on aquatic ecosystem and human health, and its management using bioremediation. *Journal of Environmental Management*. 2024. Vol. 353. P. 120103.
16. El-Sadaawy M. M., Agib N. S. Removal of Textile dyes by ecofriendly aquatic plants From wastewater: A review on Plants Species, Mechanisms, and Perspectives. *Blue Economy*. 2024. Vol. 2(2). P. 1.
17. European Parliament resolution of 1 June 2023 on an EU Strategy for Sustainable and Circular Textiles (2022/2171(INI)). C/2023/1222.
18. Finney D. J. *Probit Analysis*. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1971.
19. Galal T. M., Farahat E. A. The invasive macrophyte *Pistia stratiotes* L. as a bioindicator for water pollution in Lake Mariut, Egypt. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2015. Vol. 187(11). P. 701.

20. Gita S., Hussan A., Choudhury T. G. Impact of textile dyes waste on aquatic environments and its treatment. *Environment and Ecology*. 2017. Vol. 35(3C). P. 2349–2353.
21. Hernandez-Zamora M., Martínez-Jeronimo F., Cristiani-Urbina E., Canizares-Villanueva R. O. Congo red dye affects survival and reproduction in the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. Effects of direct and dietary exposure. *Ecotoxicology*. 2016. Vol. 25(10). P. 1832–1840.
22. Ilyashenko N. V., Petrova M. B., Pavlova N. V., Kharitonova E. A., & Kurbatova L. A. New data on the *Ceratophyllum demersum* L. as an environmental pollution bioindicator. *Research & Review in Biology*. 2014. Vol. 4(2). P. 366–377.
23. Islam M. T., Islam T., Islam T., Repon M. R. Synthetic dyes for textile colouration: Process, factors and environmental impact. *Textile and Leather Review*. 2022. Vol. 5. P. 327–373.
24. Karaduman G., Çelik F. K. A multivariate interpolation approach for predicting drug LD50 value. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*. 2024. Vol. 48(1). P. 20–33.
25. Mahajan P., Kaushal J. Degradation of congo red dye in aqueous solution by using phytoremediation potential of *chara vulgaris*. *Chitkara Chemical Review*. 2013. Vol. 1(1). P. 67–75.
26. Mehra S., Singh M., Chadha P. J. T. I. Adverse impact of textile dyes on the aquatic environment as well as on human beings. *Toxicology International*. 2021. Vol. 28(2). P. 165–176.
27. Negi A. Environmental impact of textile materials: challenges in fiber–dye chemistry and implication of microbial biodegradation. *Polymers*. 2025. Vol. 17(7). P. 871.
28. Nemeth K., Engloner A. I. Methods to Explore Changes in the Extent of Habitat Provided by *Ceratophyllum demersum* Shoots for Epiphytic Organisms in Changing Environments. *Ecology and Evolution*. 2025. Vol. 15(7). P. e71612.

29. Oladoye P. O., Bamigboye M. O., Ogunbiyi O. D., Akano M. T. Toxicity and decontamination strategies of Congo red dye. *Groundwater for Sustainable Development*. 2022. Vol. 19. P. 100844.
30. Pizzicato B., Pacifico S., Cayuela D., Mijas G., & Riba-Moliner M. Advancements in sustainable natural dyes for textile applications: a review. *Molecules*. 2023. Vol. 28(16). P. 5954.
31. Polechonska L., Klink A., Dambiec M., Rudecki A. Evaluation of *Ceratophyllum demersum* as the accumulative bioindicator for trace metals. *Ecological Indicators*. 2018. Vol. 93. P. 274–281.
32. Postelnicu T. Probit analysis. In: *International Encyclopedia of Statistical Science*. Berlin: Springer, 2025. P. 1991–1994.
33. Qu R., Xiong Y., Li R., Hu J., Liu H., & Huang Y. Comparison of three spatial interpolation methods in predicting time-dependent toxicities of single substances and mixtures. *Journal of Hazardous Materials*. 2024. Vol. 480. P. 136029.
34. Rani K. C., Naik A., Chaurasiya R.S., Raghavarao K.S.M.S. Removal of toxic Congo red dye from water employing low-cost coconut residual fiber. *Water Science and Technology*. 2017. Vol. 75. P. 2225–2236.
35. Ranson B. The true cost of colour: The impact of textile dyes on water systems. 2021. [Электронный ресурс].
36. Riza M., Ehsan M. N., Hoque S. Portrayal of textile based pollutants and its impact on soil, plants and fisheries. *Nature Environment and Pollution Technology*. 2021. Vol. 20(3). P. 1269–1275.
37. Roy C., Jahan M., Rahman S. Characterization and treatment of textile wastewater by aquatic plants (macrophytes) and algae. *European Journal of Sustainable Development Research*. 2018. Vol. 2(3). P. 29.
38. Ryzhenko N. O., Kavetsky K. Probit analysis for Cd, Pb, Cu, Zn phytotoxicity assessment. *Biotechnologia Acta*. 2017. Vol. 10(2). P. 67–74.

39. Sharma J., Sharma S., Soni V. Classification and impact of synthetic textile dyes on Aquatic Flora: A review. *Regional Studies in Marine Science*. 2021. Vol. 45. P. 101802.
40. Shevchuk O., Vlasova O., Shevchuk I., Stefkivska Y.). Determination of pesticide toxicity parameters using probit-analysis. *Quarantine and Plant Protection*. 2023. No. 2. P. 14–19.
41. Siddiqui S. I., Allehyani E. S., Al-Harbi S. A., Hasan Z., Abomuti M. A., Rajor H. K., & Oh S. Investigation of Congo red toxicity towards different living organisms: a review. *Processes*. 2023. Vol. 11(3). P. 807.
42. Soni V., Bhatt U., Tailor P., Strasser R. J. Impact of synthetic and herbal dyes on photosynthesis and ROS scavenging enzyme activities in *Spirodela polyrhiza*. *Scientific Reports*. 2025. Vol. 15(1). P. 24775.
43. Uysal Y., Aktas D., Caglar Y. Determination of colour removal efficiency of *Lemna minor* L. from industrial effluents. *Journal of Environmental Protection and Ecology*. 2014. Vol. 15. P. 1718–1726.
44. Wahab M. A. Interpolation and extrapolation *Proc. Topics Syst. Eng. Winter Term*. 2017. Vol. 17. P. 1–6.
45. Wang X. S., Zhou Y., & Jiang J. Removal of Methylene Blue from aqueous solution by non-living biomass of marine algae and freshwater macrophyte. *Adsorption Science & Technology*. 2008. Vol. 26(10). P. 853–863.
46. Yaseen D., Scholz M., Christian C., Antonacopoulos A. Assessing the impact of dyes accumulation on the growth of *Lemna minor* L. using image processing technique. In *Annual PGR Symposium (CSE-PGSym17)*. Salford: University of Salford, 2017.