

УДК 595.7

Методика досліджень

Р.Й. Годунько

МЕТОДИКИ ЗБОРУ, ФІКСАЦІЇ ТА ЗБЕРІГАННЯ АМФІБІОТИЧНИХ КОМАХ

Годунько Р.И. Методики сбора, фиксации и хранения амфибиотических насекомых // Науч. зап. Гос. природоведч. музея. – Львов, 2003. – 18. – С. 209-214.

Кратко изложены основные методы сбора личинок и взрослых насекомых 4-х отрядов амфибиотических насекомых (Ephemeroptera, Plecoptera, Odonata, Trichoptera). Описаны и проанализированы существующие методики фиксации материала в полевых и лабораторных условиях.

Godunko, R. Methods of collecting, fixation and conservation of aquatic insects // Proc. of the State Nat. Hist. Museum. – L'viv, 2003. – 18. – P. 209-214.

The basic methods of collecting larvae and adult insects of 4 orders (Ephemeroptera, Plecoptera, Odonata, Trichoptera) are briefly stated. The existing methods of material fixation in the field and laboratory conditions are described and analyzed.

Збір матеріалу. Збір личинок одноденок, веснянок, бабок та волохокрильців здійснюють за допомогою стандартних методик. Вибір методики збору залежить від гідрологічних характеристик водотоку.

Кам'янисте дно. Кількісні та якісні проби відбирають за допомогою скребків, бентометрів, сит та дрефтових сіток. Конструкція зазначених приладів різноманітна і детально описана в літературі [4, 8-10]. В гірських та передгірських гідроенозах з незначною глибиною та швидкістю течії збір матеріалу проводять вручну з поверхні крупних каменів та занурених у воду предметів. На великих ріках цей спосіб застосовують в літоральній зоні водотоку на глибині від 10 до 50 см або на перекатах. Однак, втрати матеріалу при цьому, особливо молодих личинок, значні.

В гірських ріках із швидкою течією використовують бентометри та скребки [4, 7]. Якісні збори безхребетних проводять шляхом “витоптування” – перекопуванням та перемішуванням руками і ногами каміння на дні перед виставленням проти течії скребком або сачком. При цьому, підняті в товщу води комахи підхоплюються течією і зносяться в садок. Додатково, щоб запобігти ушкодженню матеріалу, збір личинок волохокрильців та їх хатинок проводять окремо сачком, скребком або вручну з каменів та занурених у воду предметів.

Кількісні збори амфібіотичних комах здійснюють за допомогою скребків та бентометрів. Збираючи скребком, застосовують метод трансект, кількість, довжина та розміщення яких залежить від конкретних цілей дослідження. Також використовують тотальний збір комах з окремих каменів, що виймаються з потоку, з відповідними застереженнями проти змиву фауни течією, з подальшим вирахуванням їх проєкції на дно за методикою Шредера [1, 2, 4].

Зібрані за кількісними та якісними методиками проби безхребетних ретельно промивають. Видаляють дрібні камінці, залишки рослин і грубий детрит, наявність яких у пробі призводить до ушкодження матеріалу.

Осади, піщаний та глинистий субстрати. Збір личинок означених рядів, що населяють сильно замулені ділянки рік або трапляються в донних осадах та глинистих берегах, проводять разом з субстратом, з подальшим його фільтруванням

та просіюванням за допомогою сит різного діаметру. Проби відбирають металічним ситом або лопаткою та промивають у значній кількості води. Крупні частинки детриту, дрібне каміння та рослинні рештки видаляють з проби. Форма та розмір сит можуть бути різними і залежать від цілей дослідження. Донні організми перед дослідженням слід очистити від мулу.

Водяні рослини. Методику “витоптування” використовують також при тотальному зборі безхребетних з макрофітів, або збирають комах вручну.

Збір личинок у глибоких рівнинних ріках, незалежно від характеру річища, здійснюють драгами або дрифтовими сітками, які встановлюють на тросі, що натягують поперек водотоку в кількох горизонтах (переважно поверхневому та придонному) [4, 5].

Вибір ділянок збору матеріалу в межах досліджених гідроценозів залежить від конкретних напрямів дослідження. На досліджуваних локалітетах встановлюють характерний відрізок водотоку та місце збору матеріалу в його межах. Характерним відрізком водотоку вважають такий, на основі котрого визначають величини деяких факторів середовища (висота над рівнем моря, нахил течії, характер річища, температура води, тип прибережної рослинності та ін.). Довжина характерного відрізка становить переважно 30-60 м. У межах цієї ділянки повинні бути представлені різноманітні мікростації досліджуваного локалітету. При визначенні біотичних індексів або ступеня сапробності вод користуються спеціальними методичними вказівками [9].

Екзувії одноденок, веснянок та бабок, що становлять значну цінність, оскільки дають змогу легко встановити видову належність, збирають вручну з каміння та занурених у воду предметів.

Збір субімаго та імаго одноденок та імаго веснянок, бабок та волохокрильців проводять сачками різного діаметру. Субімаго одноденок збирають вручну з поверхні каміння та прибережної рослинності. Для імаго Ephemeroptera, на відміну від інших розглянутих тут рядів, характерне скупчення в рої, що можуть складатись з поодиноких особин, або досягати значних розмірів (наприклад, масові вильоти *Palingenia*). Імаго веснянок та волохокрильців збирають безпосередньо біля потоку або косінням сачком з прибережної рослинності. Добрі результати досягаються при використанні світлових пасток.

Фіксація матеріалу в польових умовах. Великі кількісні та якісні проби, що містять представників амфібіотичної фауни, фіксують за допомогою 4% розчину формальдегіду в пластикових (рідше скляних) ємностях із щільно притертими корками та супроводжують докладною етикеткою з зазначенням дати, місця та автора збору. Слід також вказувати характер проби (якісна чи кількісна), площу дослідженого субстрату та гідрологічні характеристики водотоку в місцях збору. Етикетки з цупкого білого паперу або кальки підписані олівцем, вкладають до матеріальної банки або пробірки.

Якісні проби зообентосу фіксують 90% розчином етилового або метилового спирту, крилатих комах – 80%. При фіксації матеріалу в польових умовах рекомендується використовувати спирт вищої концентрації, оскільки зібрані живі личинки мають на поверхні тіла певну кількість поверхневої води. Крім того, замороження матеріалу у спирті вищої концентрації відбувається швидше, що запобігає його ушкодженню. Для відбору якісної проби рекомендується, перед фіксацією загального об'єму матеріалу, зібраного скребком або іншим знаряддям лову, перекинути його до кювети з невеликою кількістю чистої води. Потрапивши в

натуральне середовище, личинки безхребетних стають помітнішими і їх можна легко перенести пінцетом у фіксатор. Зафіксовані таким чином екземпляри становлять значну цінність при проведенні таксономічних досліджень. Пробірки або матеріальні банки, об'ємом до 100 мл, повинні містити гумові або пластикові корки, що надійно фіксуються, запобігаючи випаровуванню спирту. Для фіксації дорослих особин (переважно одноденок, крила, черки та ноги яких легко ушкоджуються) краще використовувати пробірки невеликого діаметру, в яких матеріал закріплений в одному положенні. Фіксуюча рідина повинна на 90-95% заповнювати пробірку або матеріальну банку, що запобігає ушкодженню матеріалу при транспортуванні. Щоб запобігти руйнуванню матеріалу, його знебарвленню або втраті природного забарвлення, через 6-8 годин після фіксації слід повністю замінити пожовклий спирт. У випадку матеріалу, що зібраний з метою подальшого його вивчення з використанням електронного скануючого мікроскопу (наприклад, самиці та личинки самиць, що містять яйця і зібрані для проведення оологічних досліджень), рекомендується замінювати спирт двічі через рівні проміжки часу (кожних 2 год. протягом перших 8 год. фіксації).

Оскільки в систематиці амфібіотичних комах однаково використовуються комплекси ознак личинок та імаго, особливу наукову цінність становлять дорослі особини, що були виведені з личинок, із збереженням личинкової і субімагінальної (для одноденок) шкірки. Тільки такі екземпляри найпридатніші для описів нових таксонів [3]. Для виведення відділяють личинок останнього віку, готових до линьки, на субімаго або імаго (у одноденок та веснянок вони мають темні крилові чохлаки) і до перетворення в дорослу особину утримують у вивідних садках (не слід вміщувати в садки личинки різних видів). Конструкція садків різноманітна і детально описана в працях [3, 10]. В окремих випадках (наприклад, потамофільні види) годівлю личинок здійснюють в акваріумах з постійною аерацією. Субімаго одноденок перед линькою на імаго вміщують в невеликі сухі ємності, які зберігають в темному, прохолодному місці, без доступу сонячного проміння. При перенесенні субімаго в ємність рекомендується уникати контактів з крилами комах, що може привести до їх травмування та подальшого унеможливлення перетворення на імагінальну стадію. У цей період (він триває переважно до 48 год.) рекомендується уникати переміщень ємностей з субімаго. Фіксацію вивідного матеріалу (імаго, субімагінальних та личинкових шкірок) здійснюють на загальних засадах, викладених вище.

Кожна пробірка забезпечується детальними етикетками з зазначенням дати та місця збору матеріалу, а також прізвища колектора.

Імаго бабок та крупних волохокрильців заморюють етилацетатом, ефіром чи хлороформом та зберігають окремо в паперових конвертах.

Фіксація та довготривале зберігання матеріалу в лабораторних умовах. Вміст кількісних та якісних проб, що були зафіксовані 4% розчином формальдегіду, перед подальшим опрацюванням витримують 24 год. у воді, об'єм якої у 10-15 разів перевищує об'єм проби. Цією процедурою досягається зменшення концентрації первинного фіксатора. Після визначення вміст проби можна повторно залити розчином 4% формальдегіду. Зафіксовані таким чином проби можуть зберігатись тривалий час. Двічі на рік проводиться доливка фіксатора по мірі його випаровування. З огляду на шкідливий вплив формальдегіду на здоров'я людини, зберігати зафіксовані формальдегідом проби слід в спеціально обладнаних приміщеннях, що добре провітрюються при температурі 20°C та вологості повітря 70% [9].

Спиртовий матеріал безхребетних, зафіксований у польових умовах, промивають чистою дистильованою водою, сепарують та фіксують у 80% розчині етанолу або метанолу (використовуючи метанол як фіксатор, слід відповідним чином позначити ємності де він зберігається, з огляду на отруйність цієї речовини). Добрі результати при зберіганні крупних личинок та імаго комах (наприклад, великі личинки та імаго Perlidae, личинки та хатинки волохокрильців) дає фіксатор Буен-Дюбоск-Бразилія (БДБ) [6]:

пiкринова кислота	1 г
80% етиловий спирт	150 мл
40% формальдегiд	60 мл
льодова оцтова кислота	15 мл

У нашій практиці, крім зберігання матеріалу у 80% спирті, використовуємо розчин, що є найпридатнішим для фіксації крупних личинок. Рецептuru його приготування така:

96% етиловий спирт	150 мл
дистильована вода	75 мл
40% формальдегiд	5 мл

Для пом'якшення хiтинових покривiв великих комах (особливо у випадку фіксації веснянок та волохокрильцiв), а також у тих випадках, коли здiйснено переведення змонтованих на голках екземплярiв у спирт, рекомендується додавати до спиртового розчину глицерин, котрий повинен становити 0,3-0,5% об'єму фіксатора.

Перед дослідженням та визначенням комах слід промити чистою дистильованою водою. Підготовлений таким чином матеріал придатний для виготовлення тимчасових та постійних мікроскопічних препаратiв. Після визначення безхребетних заливають спиртом.

Для довготривалого зберігання амфiбіотичних комах вміщують у пробiрки та матеріальні банки (переважно, об'ємом не більше 100 мл). Використовуються пробiрки як із щiльно притертими гумовими та пластиковими корками, так і ватними. Вміст пробiрки повністю заповнюють фіксатором, при цьому 35-40% об'єму пробiрки або матеріальної банки всмоктується ватним корком. Таким чином, витрати спирту при заливці матеріальної банки, об'ємом 50 мл з ватним корком, становлять близько 67,5-70 мл.

Пробiрки та матеріальні банки, незалежно від типу корка, вміщують у матеріальні банки більшого об'єму. Рекомендується використовувати невисокі, скляні або пластикові матеріальні банки об'ємом не більше 1 літра з добре притертими, щiльними металічними або пластиковими кришками. В залежності від об'єму та форми матеріальної банки пробiрки, що містять амфiбіотичних комах, розміщують в один або кілька рядiв. Дно матеріальної банки покривають невеликим шаром вати. При розміщенні пробiрок корками вверх, об'єм матеріальної банки заливають так, щоби повністю покрити їх фіксатором (мінімальна висота шару фіксатора над пробiрками повинна становити не менше 2 см). У разі розміщення пробiрок корками донизу, фіксатором заповнюють об'єм матеріальної банки, що відповідає 2/3 довжини пробiрок останнього ряду. Зверху на пробiрки кладуть шар вати. При використанні ватних прокладок, які оберігають пробiрки від ушкоджень, витрати спирту зростають за рахунок всмоктування фіксатора. Оскільки щiльність прокладок, у порiвнянні з ватними корками, значно менша, додаткові витрати фіксатора становлять 10-15% від зального об'єму матеріальної банки. Кожна

пробірка повинна містити етикетку з інформацією про дату та місце збору матеріалу (по можливості коротку характеристику біотопу та гідрологічних показників), прізвище колектора, таксономічну належність матеріалу, прізвище автора визначення матеріалу. У випадку зберігання матеріалу в музейних колекціях долучаються відповідні етикетки з зазначенням інвентарних номерів. Етикетки бажано виготовляти з цупкого білого паперу або кальки, друкуючи їх на лазерному принтері. Підписи на етикетках також наносять тушшю або олівцем.

В окремих випадках допускається фіксування матеріалу 4% розчином формальдегіду, проте цей спосіб малоефективний через високу крихкість хітинових покривів комах, що зберігаються таким чином.

Кожна матеріальна банка нумерується і етикетується. Інформація з етикеток, а також час заливки, об'єм та характер фіксатора вноситься до відповідного облікового журналу. Вид фіксуючої речовини та її концентрація повинні бути ідентичні в пробірках та матеріальних банках.

Доливання фіксатора у матеріальні банки здійснюють по мірі його випаровування. При використанні якісних гумових, пластикових та щільних ватних корків, випаровування фіксатора з пробірок у матеріальних банках не відбувається. Доливають фіксатор у загальні матеріальні банки, де містяться пробірки, а також у матеріальні банки з щільними корками, де зберігаються комахи. Практика нашої роботи показала, що втрати спирту на випаровування протягом року становлять до 15-20% від загального об'єму залитої суміші. При використанні спеціальної, якісної тари для зберігання безхребетних ці втрати ще менші.

Заміна поживного фіксатора (особливо у випадку використання спирту) здійснюється в пробірках та матеріальних банках. Рекомендується здійснювати повну заміну фіксатора, а також ватних корків (у пробірках та матеріальних банках), двічі, протягом першого року зберігання через рівні проміжки часу. В подальшому щорічно замінюють фіксатор тільки в загальних матеріальних банках, де зберігаються пробірки з безхребетними. Всі роботи пов'язані з доливанням фіксатора та заміною поживного спирту заносяться до відповідного облікового журналу, де містяться відомості про рецептуру використаних сумішей, дату заливки (перезаливки), об'єм залитої суміші.

У практиці ентомологічних досліджень допускається також зберігання амфібіотичних комах змонтованих на голках. Так зберігають імаго бабок та в окремих випадках крупні екземпляри волохокрильців. Наш досвід роботи із старими колекціями показав, що змонтовані на голках дорослі особини, личинки та екзувії ушкоджуються, що в окремих випадках унеможливає їх точне визначення. Крім того, сухі колекції часто знищуються шкіроїдами. Для переведення до фіксатора (наприклад, спирту) екземплярів, змонтованих на ентомологічних голках, рекомендується наступна процедура: зафіксовані на пінопласті комахи, що вміщені в посуд, обережно заливають теплою дистильованою водою температурою 30-35°C, так, щоби шар води повністю покривав комах; підтримуючи температуру води на постійній позначці, залишають комах в посуді на 24-36 год.; м'які екземпляри обережно знімають з голок та переносять до фіксатора (переважно 80% розчин етанолу з додаванням гліцерину, що складає 0,5% від об'єму фіксатора). В практиці ефемероптерологічних та плекоптерологічних досліджень метод зберігання комах на ентомологічних голках на даний час не використовується.

Імаго бабок зберігають на ентомологічних матрациках або в паперових конвертах, а екземпляри, призначені для демонстраційних колекцій, розправляють на

розправилках чи пінопласті. У великих Anisoptera видаляють кишечник, розрізаючи черевце між III-VII сегментами, та крилові м'язи. Як зазначають [6], металево-блискуче забарвлення бабок забезпечується за рахунок властивостей кутикули і добре зберігається в сухих екземплярах. В інших випадках (крім блакитного нальоту на черевці), коли пігменти сконцентровані в клітинах гіподерми, слід витримувати імаго до 30 хв. в ацетоні, щоб запобігти розкладу пігментів і зберегти природне забарвлення, а потім одразу ж розправити, щоб запобігти ушкодженню кутикули [6]. Екзувії бабок можна зберігати сухими в невеликих коробках або монтувати для колекцій наклеєними на прозорі пластинки та супроводжувати відповідними етикетками.

Визначення більшості таксонів амфібіотичних комах пов'язане з виготовленням тимчасових або постійних мікропрепаратів. Добре загостреними голками відпрепаровують відповідні частини комахи, та, при необхідності, вміщують до 10% розчину КОН де витримують 6-12 год. або більше, до повного розчинення некутикулярних елементів, а пізніше промивають в дистильованій воді [2]. При монтуванні препарату з цілої личинки рекомендується використовувати два покривних скельця: під першим розміщувати голову комахи, ротові органи, трахейні зябра; під другим – елементи тораксу, черевця, церкви, ноги та геніталії. Перед приготуванням препарату покривне та предметне скельця знежирюють 96% розчином етилового спирту з розрахунку 3 мл спирту на кожне використане скельце.

Для нетривалого зберігання виготовляють тимчасові препарати з гліцерину, які можуть зберігатись близько року. В постійному препараті використовують рідину Фора-Берлезе [9] або канадський бальзам. Краї покривних скельць оконтурюють доммарним або безколірним лаком, що забезпечує триваліше зберігання препаратів.

1. Жадин В. И. Фауна рек и водохранилищ. – М. – Л.: Тр. Зоол. ин-та АН СССР. – 1940. – 5, Вып. 3-4. – С. 127-139.
2. Жильцова Л. А. Отряд веснянки. Plecoptera // Определитель пресноводных беспозвоночных России. – С.-П.: Изд-во ЗИН РАН, 1997. – 3. – С. 248-264.
3. Клюге Н. Ю. Отряд поденки. Ephemeroptera // Определитель пресноводных беспозвоночных России. – С.-П.: Изд-во ЗИН РАН, 1997. – 3. – С. 177-200.
4. Леванидова И. М. Амфибиотические насекомые горных областей Дальнего Востока СССР. – Л.: Наука, 1982. – 215 с.
5. Леванидова И. М., Леванидов В. Я. Суточные миграции донных личинок насекомых в ручейной струе. 1. Миграции личинок поденок в реке Хор // Зоол. журн. – 1965. – 44, Вып. 3. – С. 373-385.
6. Матушкіна Н. О., Хрокало Л. А. Визначник бабок (Odonata) України: личинки та екзувії. Учбов. посіб. для студ. біол. спец. – Київ: Фітосоціоцентр, 2002. – 72 с.
7. Садовский А. А. Бентометр – новый прибор для количественного сбора зообентоса в горных реках // Сообщ. АН Груз. ССР. – 1948. – 9, № 6. – С. 365-368.
8. Kołodziejczyk A., Koperski P. Bezkręgowce słodkowodne Polski. Klucz do oznaczania oraz podstawy biologii i ekologii makrofauny. – Warszawa: Wyd. Uniwersytetu Warszawskiego, 2000. – 251 p.
9. Landa V. Jepice - Ephemeroptera. Fauna ČSSR. – Praha: Academia, 1969. – 18. – 369 s.
10. Studemann D., Landolt P., Sartori M., Hefti D., Tomka I. Ephemeroptera. Insecta Helvetica. Fauna. – Genève: Mus. d'his. nat., 1992. – 9. – 179 p.