

Міністерство освіти і науки України
Національний університет водного господарства та
природокористування
Кафедра агрохімії, ґрунтознавства та землеробства

05-01-209

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ
до практичних робіт
з навчальної дисципліни
«Біологічна індикація ґрунтів»
для здобувачів вищої освіти першого
(бакалаврського) рівня усіх освітньо-професійних
програм спеціальностей НУВГП
усіх форм навчання

Схвалено
науково-методичною радою
НУВГП
Протокол № 4 від 17.06.2020 р.

Рівне – 2020

Методичні вказівки до практичних робіт з навчальної дисципліни «Біологічна індикація ґрунтів» для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня усіх освітньо-професійних програм спеціальностей НУВГП усіх форм навчання [Електронне видання] / Солодка Т. М. – Рівне : НУВГП, 2020. – 21 с.

Укладач: Солодка Т. М., кандидат сільськогосподарських наук, доцент кафедри агрохімії, ґрунтознавства та землеробства.

Відповідальний за випуск: Колесник Т. М., кандидат сільськогосподарських наук, доцент, завідувачка кафедри агрохімії, ґрунтознавства та землеробства.

Вчений секретар науково-методичної ради Костюкова Т. А.

© Солодка Т. М., 2020
© НУВГП, 2020

З М І С Т

ВСТУП	4
1. Практична робота №1	5
2. Практична робота №2	8
3. Практична робота №3	13
4. Практична робота №4	18
5. РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА.....	21

ВСТУП

Оцінка стану середовища за допомогою живих об'єктів досить важлива. Живі об'єкти (або системи) — це клітини, організми, популяції, спільноти. З їх допомогою може проводитися оцінка як абіотичних факторів (температура, вологість, кислотність, солоність, вміст політантів тощо), так і біотичних (життєва здатність організмів, їх популяцій і угруповань). Термін «біоіндикація» частіше використовується в європейській науковій літературі, а в американській його зазвичай заміняють аналогічним за змістом назвою «екотоксикологія».

Біоіндикація базується на спостереженні за складом та чисельністю видів-індикаторів.

Метод біоіндикації заснований на вибірковому біологічному накопиченні речовин з навколишнього середовища організмами рослин і тварин. Найбільш небезпечними для біотичних спільнот є антропогенні забруднення ґрунту та водою важкими металами, радіонуклідами, деякими хлорорганічними похідними, оскільки накопичення цих речовин в живих організмах (як усім організмом, так і його окремими частинами) порушує нормальний метаболізм, впливає на біохімічні, цитологічні і фізіологічні процеси, та в цілому погіршує стан і відтворюваність популяції.

Предметом вивчення навчальної дисципліни є теоретичні основи методики та теоретичні навички техніки проведення біоіндикації в агрономії, котра як комплексна наука займається розробкою теоретичних засад і агротехнічних прийомів подальшого підвищення продуктивності культурних рослин і покращення якості врожаю.

Міждисциплінарні зв'язки: навчальна дисципліна «Біологічна індикація ґрунтів» є складовою частиною циклу фундаментальних дисциплін для підготовки студентів за спеціальністю «Агрономія». Вивчення курсу передбачає наявність систематичних та ґрунтовних знань із суміжних курсів: «Землеробство», «Ґрунтознавство», «Агрохімія», «Система застосування добрив», «Філософія».

Вимоги до знань та умінь визначаються галузевими стандартами вищої освіти України.

ПРАКТИЧНА РОБОТА № 1 ВИВЧЕННЯ ОСНОВ МОНІТОРИНГУ ҐРУНТУ

Мета роботи: вивчити особливості відбору зразків об'єктів навколишнього природного середовища для біоіндикаційних досліджень.

Вибір тест-полігонів. Для проведення біологічного моніторингу довкілля на досліджуваній території повинні бути виділені тест-полігони. Тест-полігони вибираються таким чином, щоб першочергово були досліджені найбільш небезпечні та техногенно-навантажені райони. Відбір проб проводять як в промислових зонах, так і в житлових масивах, віддалених від підприємств.

Загальні вимоги до відбору проб ґрунтів. Відбір проб здійснюється згідно «ГОСТ 17.4.3.01–83. Ґрунти. Відбір проб». Такі методи відбору проб ґрунту застосовуються для оцінки загального та локального забруднення навколо підприємств, поблизу автомобільних трас та ін. При загальному забрудненні ґрунтів ділянки для відбору зразків вибирають у відповідності з координатною сіткою (вказують номер і координати). При локальному забрудненні ґрунтів для визначення пробних ділянок використовують систему концентричних кіл, розташованих на диференційованих відстанях від джерела забруднення (вказують номери кіл і азимут місця відбору зразків). При дослідженні забруднень ґрунтів проби відбирають пошарово з глибини 0–5; 5–20; 21–40; 41–60 см, в залежності від мети дослідження. Крім того визначається необхідний розмір досліджуваної ділянки, кількість і вид проби.

Максимально допустимі розміри ділянок визначають в залежності від економічних районів країни: в Поліссі – 8 га, Лісостеповій зоні – 25 га, в Степовій – 40 га. В середньому розмір ділянки в Україні дорівнює приблизно 25 га. Для визначення у ґрунтах хімічних речовин розмір ділянки для відбору зразків коливається від 1 до 5 га, де відбирають не менш однієї об'єднаної проби масою не менше 400 г.

Обстеження земель навколо підприємств-забруднювачів та поблизу автомобільних трас. Навколо підприємств-забруднювачів обстеження земель проводиться за системою концентричних кіл, розташованих на відстані 0,5; 1; 1,5; 2,5; 5; 10 км від джерела забруднення, з урахуванням пануючих вітрів (рис. 1). При відборі проб ґрунту з ділянок уздовж дорожніх смуг враховується те, що газопиловий струмінь автотранспорту викидається в повітря невисоко над ґрунтом, а відстань переносу викидних газів (в тому числі і аерозолів важких металів, сажі та інших речовин) не перевищує 100 м в напрямку пануючих вітрів. Ділянки для відбору зразків довжиною 200–500 м розмічають на відстанях 0–10, 10–50 і 50–100 м від полотна дороги, враховуючи рельєф, ґрунтовий і рослинний покрив, гідрологічні умови місцевості. На кожній з них відбирають 20–25 індивідуальних проб ґрунту для отримання змішаного (середнього) зразка.

Відбір проб ґрунтів для біоіндикаційних досліджень. На першому етапі комплексного моніторингу навколишнього природного середовища із застосуванням біологічних методів оцінки рекомендується проводити великомасштабні рекогносцирувальні дослідження. Вони повинні бути прив'язані до стаціонарних постів спостереження Держкомгідромету та санітарно-епідеміологічної служби, а також включати найбільш екологічно небезпечні і умовно чисті контрольні території (за рекомендаціями обласних управлінь Міністерства екології та природних ресурсів України, санітарноепідеміологічної служби тощо).

Далі переходять до середньо- та маломасштабних досліджень відносно оцінки стану ґрунтів та інших об'єктів навколишнього середовища за сумарним токсико-мутагенним фоном. Такі дослідження, як правило, завершуються картографуванням території за даною ознакою.

Великомасштабне картографування дозволяє встановити орієнтовані рівні мутагенного фону, а середньо- та маломасштабне картографування – диференціювати райони всередині окремих регіонів за ступенем мутагенного впливу та виявити джерела впливу на одиницю площі. При

великомасштабному картографуванні за одиницю площі рекомендується приймати ділянку розміром 10000 км², при середньо- та маломасштабному – 1000 і 100 км², відповідно. На кожній одиниці площі повинно бути не менше 10 пунктів спостережень.

У випадку впливу окремих джерел забруднень (підприємств, електростанцій та ін.) на об'єкти навколишнього середовища, рекомендується застосовувати метод концентричних кіл з шагом через 0,5 км (до 2,5 км). При оцінці екологічного стану міста з населенням 1 млн. чоловік бажано поділити його територію на 20 умовних квадратів з виділенням у кожному від 10 до 20 пунктів спостережень залежно від рівня екологічної напруженості. У кожному пункті проби ґрунту відбирають за правилом «конверта» зі стороною 10–100 м. Об'єднана проба ґрунту формується з 9–12 проб, розміщується у відповідну тару, на яку ставиться печатка та наклеюється етикетка із супровідною відомістю. Періодичність обстеження ґрунтів встановлюється диференційовано (з урахуванням особливостей території) – в середньому через кожні 5 років. Зазначений термін може бути збільшений, якщо різниця між показниками попереднього обстеження не істотна.

Відбір проб з водних джерел. Зразки з водних джерел (річки, озера тощо) відбирають згідно з «ДСТУ ISO 5667-6-2001 Якість води. Відбір проб. Частина 6». Проби води з річок та інших водотоків відбирають на відстані 3–5 м від берега в чисті скляні пляшки та зберігають у холодильнику до проведення дослідів. Якщо проби відбирають зі свердловин, то зразок води наливають у пляшки після 1–2 хвилинного зливу води.

Відбір проб пилку рослин. Відбір пилку кожного досліджуваного виду рослин проводять одночасно в усіх точках спостереження. З кожної моніторингової точки у суху погоду збирають готові до розкриття бутони квітів (від 30-ти рослин кожного виду) У деревинних та чагарникових рослин відбирають біопробы з неушкоджених, здорових паростків середнього ярусу крони південної орієнтації, а у трав – з рослин, зростаючих у територіальному центрі мікропопуляції індикаторів. Рослини повинні бути добре розвинуті і не мати

ознак пригнічення. Досліджують у кожній пробі від 1000 до 3000 клітин, серед яких виділяють стерильні та фертильні.

Контрольне завдання Для обраної території (уздовж дорожніх смуг, навколо промислових підприємств та ін.) визначити місця та періодичність відбору проб об'єктів навколишнього середовища та нанести їх на топографічну карту.

Контрольні запитання 1. Критерії вибору тест-полігонів. 2. Загальні вимоги до відбору проб ґрунтів 3. Як здійснюється обстеження земель навколо підприємств та поблизу автомобільних магістралей? 4. Як здійснюється відбір проб ґрунтів для цитогенетичних досліджень? 5. Як здійснюється відбір проб з водних джерел? 6. Як відбирають зразки пилку рослин?

Рекомендована література 1. ДСТУ ISO 5667-6-2001 Якість води. Відбір проб. Частина 6. Настанови щодо відбору проб води з річок та інших водотоків. 2. ГОСТ 12071-2000 Ґрунти. Відбір, упакування, транспортування і зберігання зразків. 3. ГОСТ 17.2.3.01-86 Охрана природы. Атмосфера. Правила контроля качества воздуха населенных пунктов. 4. ГОСТ 17.2.6.01-86 Охрана природы. Атмосфера. Приборы для отбора проб воздуха населенных пунктов. 5. Долина Л.Ф. Мониторинг окружающей среды и инженерные методы охраны биосферы.: Дн-вск.: Изд-во «Континент», 2002. 208 с.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2 РОЗРОБКА ЕМПІРИЧНИХ МОДЕЛЕЙ ОЦІНКИ ВОДНОГО РЕЖИМУ

Мета роботи: навчитися оцінювати токсичні властивості об'єктів довкілля з використанням «Ростового тесту».

Рослини – це найбільш зручні індикатори забруднення навколишнього середовища, тому що вони є первісними ланками трофічних ланцюгів і відіграють головну роль у

поглинанні різного роду забруднювачів. Унаслідок цього, за допомогою рослин можна достатньо точно оцінити екологічну ситуацію на досліджуваній території.

Сутність ростового тесту полягає в обліку змін показників проростання індикаторної культури, вирощеної на досліджуваних зразках ґрунту, води, водних витяжок ґрунтів тощо. Цей метод дозволяє оцінити не тільки пригноблюючу дію різних забруднювачів на рослини, але і стимулюючий ефект

Перевагу віддають тест-культурам, які швидко проростають та є характерними для даного регіону. Наприклад, у регіонах з дерновопідзолистими ґрунтами в якості тест-культури використовують овес і горох; у регіонах зі степовими ґрунтами – пшеницю, люцерну, боби і квасолу. Найбільш розповсюдженими тест-культурами є пшениця, огірок та салат.

Опис методу. Існує значна кількість варіантів проведення ростового тесту. Деякі з них розглянуті нижче.

1. Пророщування тест-культур у чашках Петрі При оцінці токсичності проб ґрунтів в чашку Петрі кладуть аркуш фільтрувального паперу, на який насипають 1 грам висушеного та подрібненого ґрунту і рівномірно розподіляють по ємності. Потім додають 5–7 мл води (використовують кип'ячену питну воду, яку попередньо відстоюють кілька днів) і на ґрунт висаджують по 30–50 насінин індикаторної рослини (в залежності від крупності). Найбільш зручними культурами для тестування в чашках Петрі є рослини з дрібним насінням – редис, гірчиця, цибуля звичайна. Контрольним субстратом у цьому випадку є ґрунт, відібраний на умовно чистій території (заповідник, заказник, курортна зона та ін.).

2. Пророщування тест-культур на «плаваючих дисках». При дослідженні токсичності проб води і водних витяжок за цим методом в лабораторні склянки наливають досліджувані проби води чи витяжки в об'ємі 250–500 мл. Насіння індикаторної культури (по 20-25 насінин) пророщують на спеціальних плаваючих кільцях з пінопласту, обтягнутих марлею. Для цього дослідження найбільш зручною культурою є пшениця. На перші кілька діб ємності з досліджуваними зразками накривають

склом. Два-три рази на добу скло знімають на 10–15 хвилин для провітрювання.

На четверту добу ємності з насінням поміщають на полицю, де по можливості протягом 14-ти годин (з 6–00 до 20–00) підтримується постійне освітлення.

Витримують рослини в таких умовах ще 2 тижні, фіксуючи наступні показники:

- час появи сходів і їхню кількість (кожну добу);
- довжину надземної частини проростків та їх приріст (кожну добу);
- загальну кількість пророслих насінин (на кінець експерименту).

При цьому звертають увагу на морфологічні особливості рослин (раннє пожовтіння, особливості розвитку кореневої системи та ін.). Дослідження всіх варіантів проводять у трьох повторностях. Контрольним субстратом є кип'ячена відстояна питна вода.

Через 2 тижні молоді рослини обережно звільняють із води та трохи підсушують на фільтрувальному папері. Потім проводять виміри довжини кореневої і стеблової системи та визначають сиру масу десяти найбільш типових проростків. Після цього рослини поміщують у паперові пакети, висушують протягом декількох днів, а потім визначають суху масу.

3. Пророщування тест-культур у ємностях

При дослідженні токсичності проб ґрунту в кожну з посудин вносять по 50–100 г субстрату, зволоженого до 70% (використовують кип'ячену відстояну питну воду), і висівають по 15–20 пророслих насінин тест-культури. У даному випадку індикатором може слугувати будь-яка рослина. Для дослідження використовують лабораторний скляний простерилізований посуд, у разі його відсутності – чисті пластикові стакани, чашки та ін.

На перші кілька діб посудини з досліджуваними зразками накривають склом. Два-три рази на добу скло знімають на 10–15 хвилин для провітрювання. На четверту добу ємності з висадженим в них насінням поміщають на полицю, та створюють для них умови, аналогічні вказаним вище (п. 2).

Неодмінною умовою проведення даного експерименту є підтримка постійної вологості досліджуваного ґрунту (на рівні 70% від повної вологоємності ґрунту), яка досягається наступним:

- перед закладкою досліду ґрунт просушують і зважують;
- підготовлений в такий спосіб ґрунт звожують такою кількістю води, що дозволяє досягти 70%-ї вологості;
- зволожений у такий спосіб ґрунт розносять в експериментальні ємності і визначають загальну вагу.

В ході експерименту зважування періодично повторюють і компенсують утрату вологи шляхом поливу відповідною кількістю води.

Дослідження усіх варіантів проводять в трьох повторностях. Контрольним субстратом у цьому випадку є ґрунт, відібраний в екологічно чистій зоні (заповідник, заказник, курортна зона та ін.).

Обробка результатів ростового тесту. Після проведення вимірювань для кожного з досліджуваних варіантів обчислюють середню довжину надземної і кореневої частин $x \pm m$, де m - помилка середнього арифметичного, яку визначають так:

$$m = \sqrt{q^2} \div N \quad (1)$$

де N – кількість результатів; q^2 – дисперсія, яку визначають за виразом:

$$q^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (x - \bar{x})^2}{N} \quad (2)$$

Достовірність різниці середніх арифметичних t розраховується за критерієм Стьюдента-Фішера:

Якщо фактично встановлена величина t більше або дорівнює критичному (стандартному) значенню t_{st} роблять висновок про існування статистично достовірної різниці між середніми арифметичними у досліджуваному та контрольному варіанті. Якщо ж фактична величина t менша за t_{st} , різницю між середніми вважають статистично недостовірною. Відсутність статистично достовірної різниці між середніми значеннями біопараметра у контрольному та досліджуваному варіанті свідчить про відсутність значних змін ростових процесів у

біоіндикаторів, в порівнянні з контрольним варіантом. Тобто ґрунт або вода у досліджуваному варіанті майже такої ж якості, як і в контрольному досліді та не має токсичних властивостей. І навпаки, статистично достовірна різниця між варіантом та контрольним дослідом вказує на те, що досліджуваний зразок (вода, ґрунт) мають фітотоксичні властивості.

Фітотоксичний ефект визначається у відсотках за будь-яким біопараметром: за масою рослини, довжиною кореневої або стеблової системи, кількістю ушкоджених рослин або кількістю сходів тощо. Розраховується фітотоксичний ефект за формулою:

$$ФЕ = (M_0 - M_x) / M_0 * 100\% \quad (3)$$

де M_0 – значення біопараметра (маса рослин, висота паростків, довжина корінців та ін.) у посуді з контрольним субстратом; M_x – значення аналогічного біопараметра у посуді з досліджуваним субстратом.

Результати оцінки

Контроль (500 м до місяця скиду)		500 м від місяця скиду 1000		1000 м від місяця скиду 1000		1500 м від місяця скиду 1000	
Висота рослин, см	Довжина коренів, см	Висота рослин, см	Довжина коренів, см	Висота рослин, см	Довжина коренів, см	Висота рослин, см	Довжина коренів, см
12	14	9	10	10	8	12	9
13	13	8	8	10	8	14	8
10	12	7	7	6	6	7	6
Суха маса 10 проростків, мг							
237		160		185		203	

Контрольне завдання Оцінити вплив стічних вод промислового підприємства на якість природної води за результатами ростового тесту. Варіанти вихідних даних наведені в додатку 1 і обираються відповідно до порядкового номеру студента в списку академічної групи. Звіт з лабораторної роботи повинен бути оформлений за відповідно з наведеним вище прикладом розрахунку.

Контрольні запитання 1. У чому полягає сутність ростового тесту? 2. Які рослини використовуються у якості індикаторів у ростовому тесті? 3. Які параметри контролюються при проведенні ростового тесту? 4. Про що свідчать достовірні відхилення показників росту рослин від контролю? 5. Яким чином визначається зона впливу стічних вод підприємства на поверхневі водойми? 6. Що таке фітотоксичний ефект і за якими показниками він визначається?

Рекомендована література 1. Федорова А.И., Никольская А.Н. Практикум по экологии и охране окружающей среды: Учебное пос. Воронеж: Воронеж. гос. ун-т, 1997. 305 с. 2. Калінін М.І., Єлісеєв В.В. Біометрія: Підручник для студентів вузів біологічних та екологічних напрямків. Миколаїв: Вид-во МФ НАУКМА, 2000. 204 с. 3. Бурдин К.С. Основы биологического мониторинга.: М.: изд-во МГУ, 1985. 160 с. 4. Руденко С.С., Костишин С.С., Морозова Т.В. Загальна екологія: практичний курс. Частина 1. Чернівці.: Рута, 2003. 320 с. 5. Клименко М.О., Прищепа А.М., Вознюк Н.М. Моніторинг довкілля.: К.: Академія, 2006. 360 с.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3 РОЗРОБКА ЕМПІРИЧНИХ МОДЕЛЕЙ ОЦІНКИ ЯКОСТІ ГРУНТІВ

Мета роботи: навчитися оцінювати якість ґрунтів за допомогою тестів «Аберантність хромосом» та «Величина мітотичного індексу» в меристематичних клітинах індикаторних рослин.

Токсичність — це отрутість, здатність деяких хімічних елементів та сполук, а також речовин біогенної природи, чинити негативний вплив на організм людини, тварин, рослин, грибів і мікроорганізмів. Такі речовини називають токсикантами. Мутагенність – це здатність викликати мутації, тобто спадкові зміни структури молекул ДНК, що змінюють морфологічні та

(або) фізіолого-поводжувальні ознаки організмів. Якщо під впливом деяких речовин у живих організмів виникають мутації – це мутагени. Меристема (від грец. meristos – ділений) – це утворювальна тканина рослин, що довго зберігає здатність до ділення та виникнення нових клітин, а також відрізняється високою метаболічною активністю. Відомо, що 32 меристематичні клітини, які активно поділяються, дуже вразливі до дії будь-яких негативних факторів.

Якщо в ґрунті та воді присутні токсиканти, інтенсивність клітинного поділу в меристемах індикатора пригноблюється. Тобто, зниження величини мітотичного індексу в клітинах рослини свідчить про токсичність ґрунту або води. Якщо в досліджуваних зразках присутні мутагени, у меристематичних клітинах фітоіндикаторів виникають хромосомні аберації (від лат. aberratio – відхилення) – патологічні, анормальні фігури мітозу. Це кільця і фрагменти в метафазах, мости і фрагменти в анафазах і телофазах, а також злипання і пульверизація хромосом у метафазі.

Між величиною мітотичного індексу і частотою зустрічаємості хромосомних аберації існує сильний зворотно пропорційний зв'язок. Тобто, якщо мітотичний індекс знижується, кількість клітин з хромосомними патологіями зростає, і навпаки. Тому низький мітотичний індекс, водночас із високим рівнем зустрічаємості хромосомних аберацій, свідчить про токсикомутагенну активність ґрунту чи води. Під мутагенним фоном розуміється сукупність фізичних, хімічних і біологічних мутагенних факторів природного чи антропогенного походження, від спільного впливу яких залежить рівень мутаційної мінливості організмів на даній території. Токсико-мутагенний фон визначають за загально-токсичними і мутагенними проявами у клітинах біоіндикаторів, що виникають під впливом шкідливих факторів, присутніх в навколишньому середовищі. Для біоіндикації токсикантів та мутагенів в ґрунтах чи водних джерелах найбільш широко застосовується цитогенетичний аналіз клітин таких тестоб'єктів, як сільськогосподарські рослини – *Allium cepa* L. (цибуля звичайна), *Pisum sativum* (горох), *Vicia Faba* (боби), *Sinapis alba*

(гірчиця біла), *Triticum sativum* (пшениця) та ін. Класичним об'єктом для вивчення цитогенетичного впливу фізичних, хімічних та інших факторів навколишнього середовища є меристематичні клітини первинних корінців цибулі звичайної – *Alliium cepa* L.

Опис методу. Для визначення токсико-мутагенної активності зразків різних субстратів (води, мулу, суспендованих у воді зразків ґрунту та ін.), на них проводять пророщування насіння цибулі на фільтрувальному папері в чашках Петрі при температурі 25°C. При оцінці якості проб ґрунтів в чашку Петрі кладуть аркуш фільтрувального паперу, на який насипають 1 грам висушеного та подрібненого ґрунту і рівномірно розподіляють по чашці. Потім ґрунт зволожують 5 мл дистильованої води і на нього висаджують по 50 насінин індикаторної рослини. При оцінці якості водних зразків в чашку Петрі кладуть аркуш фільтрувального паперу, зволожують його 5 мл проби водного зразка і також висаджують по 50 насінин. Через кожні шість годин проводять провітрювання, відкривши на кілька хвилин чашки. Дослід триває 72 години. В якості контролю використовується дистильована вода. При появі первинних корінців довжиною 7-9 мм, їх фіксують в ацетоалкоголі протягом 1 години, а потім переносять у етанол 70° концентрації для зберігання. Фіксатор готують шляхом змішування 96° етилового спирту і крижаної оцтової кислоти у співвідношенні 3:1 безпосередньо перед фіксацією біооб'єктів. Фарбування корінців проводять реактивом Шиффа за Фельгеном з попереднім гідролізом у 0,1 н соляній кислоті при температурі 60°C. Після фарбування біопроби промивають у трьох порціях сірчаних вод і закріплюють фарбування під проточною водою. Пофарбовані корінці зберігають у 70° етиловому спирті. Цитологічні препарати готують із 1 мм кінчиків корінців (меристем), поміщених у краплю 45%-ної оцтової кислоти. Препарат накривають накривним склом для отримання монослою клітин. Краї покривного скла заливають розплавленим парафіном. Препарат готовий до мікроскопічних досліджень. Приготовлений таким чином препарат використовують для мікроскопічного аналізу на мікроскопі

(«Біолам» Р-14) зі збільшенням 15х60. На цитологічних препаратах враховують усі фігури мітозу: профазу, метафазу, анафазу, телофазу, що зустрічаються серед 5-6 тис. переглянутих меристематичних клітин.

Величину мітотичного індексу визначають як відношення кількості клітин, що діляться, до загальної кількості переглянутих клітин, та виражають у промілях

$$MI = m/n * 1000 \quad \% \quad (4)$$

де n – кількість досліджуваних клітин; m – кількість клітин, що діляться.

Абсолютний розкид визначається за формулою Абсолютний розкид = MI A, % (5)

де A – відносна помилка, яка визначається за формулою $A = 1,385 * 2(n-m)/n * m$

де 1,385 – коефіцієнт при вимірах більше 100. Зниження мітотичного індексу, в порівнянні з контролем, вважається результатом загально-токсичної дії забруднювачів ґрунтів.

На цих же препаратах враховуються клітини з аберантними (патологічними) хромосомами:

Загальну аберантність хромосом визначають у відсотках за формулою Абер хром = $G/m * 100$, % (6)

де G – кількість аберантних клітин; m – кількість клітин, що діляться. УПУ = $(MI \text{ зразок} - MI \text{ контроль}) / (10 \text{ Абер.хром. зразка} - MI \text{ контроль})$

Шкала оцінювання екологічної ситуації

Діапазон значень УПП	числових	Рівень ушкодження біосистем	Стан біосистем
0,000 ÷ 0,150		Низький	Сприятливий
0,151 ÷ 0,300		Нижче середнього	Насторожуючий
0,301 ÷ 0,450		Середній	Конфліктний
0,451 ÷ 0,600		Вище середнього	Загрозливий
0,601 ÷ 0,750		Високий	Критичний
0,751 і вище		Максимальний	Небезпечний

Результати досліджень

Місце відбору зразків	Кількість досліджених клітин	Кількість клітин, що діляться за фазами мітозу / з них аберантних		
		метофаза	анафаза	телофаза
Схід	5600	107/18	66/25	291/0
Південь	4800	100/53	43/27	119/4
Контроль (дистильована вода)	9600	256/15	232/10	388/10

Контрольне завдання Виконати оцінку якості ґрунтів , що прилягають до промислового об'єкта, за результатами тестів «Величина мітотичного індексу» та «Аберантність хромосом» у меристематичних клітинах *Allium* сера L.. Вихідні дані приведені в додатку 4

Контрольні запитання 1. Що таке токсичність? 2. Що таке мутагенність? 3. Що таке меристема? 4. Що таке хромосомні аберації? Наведіть приклади. 5. Що таке токсико-мутагенний фон? 6. У чому полягає сутність тестів «Величина мітотичного індексу» та «Аберантність хромосом» у меристематичних клітинах *Allium* сера L.? 7. Про що свідчить зниження або збільшення величини мітотичного індексу, у порівнянні з контролем? 8. Про що свідчить зниження або збільшення частоти зустрічаємості хромосомних аберацій, у порівнянні з контролем? 9. Для чого обчислюється умовний показник ушкодженості УПП? 10. Що характеризує середній інтегральний умовний показник ушкодженості ІУПУ?

Рекомендована література 1. Бурдин, К.С. Основы биологического мониторинга: М.: Изд-во Моск. ун-та, 1985.158 с. 2. Криволуцкий, Д.А. Биоиндикация и биомониторинг: М.: Наука, 1991. 288 с. 3. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Агропромиздат, 1988. 271 с. 4. Горова А.І. Методологічні аспекти оцінки генетичних наслідків техногенезу Зб. наук. праць «Екологія і природокористування». Вип.3, Дніпропетровськ, 2001. С. 143-152. 5. Руденко С.С., Костишин С.С., Морозова Т.В. Загальна екологія: практичний курс. Частина 1. Чернівці.: Рута, 2003. 320 с. 6. Методичні

рекомендації «Обстеження та районування території за ступенем впливу антропогенних чинників на стан об'єктів довкілля з використанням цитогенетичних методів» для студентів напряму підготовки 6.040106 Д.:НГУ, 2007. 25 с.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4 РОЗРОБКА ЕМПІРИЧНИХ МОДЕЛЕЙ ОЦІНКИ ПОЖИВНОГО РЕЖИМУ

Мета роботи: навчитися оцінювати екологічний стан ґрунтового покриву на досліджуваній території за зміною видового біорізноманіття безхребетних тварин. Для дослідження стану ґрунтового покриву використовуються переважно представники мезо- і макрофауни. Мезофауна об'єднує різноманітну і численну частину ґрунтового тваринного населення з розмірами, які дозволяють бачити цих тварин неозброєним оком, або під лупою, і збирати вручну. Основну масу мезофауни складають членистоногі: дрібні види комах, багатоніжки-сімфіли, мокриці, павуки, а також дрібні черви енхітреїди. Живуть вони в ґрунтових порожнинах і здатні до вертикальної міграції по пустотам і крупних порах. Макрофауна представлена в ґрунті дощовими хробаками, багатоніжками і личинками комах. Для них ґрунт виступає у якості щільного середовища, при пересуванні в якому необхідно активно прокладати собі ходи. Ці тварини риють норки, або ж просуваються по природним пустотам, розширюючи їх простір. Опис методу. Вибірка тварин проводиться за методом ґрунтових розкопок. Розміри обраної пробної площадки залежать від ступеня зволоженості ґрунту (найчастіше 0,5×0,5 м, в сухих районах до 1-2 м²). Чим більше закладено ґрунтових розкопок, тим точніше виявлення видового складу та кількості тварин. Відстань між розкопками 5-10 м. Глибина розкопок складає 30-50 см, в сухих місцях на легких ґрунтах – до 100 см і більше. Ґрунт вибирається пошарово. Розкопки проводять наступним чином: визначають розміри майданчика, забивають по кутах

кілочки, натягують між ними мотузку. Потім від кордонів відведених майданчиків прибирають опад та підстилку (якщо проба береться у лісі) або суху землю поверхневого шару. Поруч з майданчиком поміщають клейонку або щільну тканину, на яку кладуть вибраний з розкопки ґрунт. Спочатку з майданчика знімають опад та інші рослинні залишки, які ретельно вручну перебирають, враховуючи всіх знайдених при цьому тварин, а траву вищипують для того, щоб полегшити розбірку ґрунту з верхнього шару. Тварин, знайдених на поверхні ґрунту, враховують окремо від тих, яких вибирають безпосередньо з нього. Після видалення розібраних рослинних залишків приступають до викопування ґрунту лопатою. Невеликі порції ґрунту, що викидаються на розкладену поруч з майданчиком клейонку, ретельно перетираються руками, розбиваються великі грудки, розривається дерновини. Весь ґрунт з шару порція за порцією перетирають між долонями, ретельно вибираючи тварин. Тварин збирають окремо з кожної проби і кожного шару.

57 Видове біорізноманіття – найбільш часто використовуваний показник, що враховує два компоненти – видове різноманіття (кількість видів, які спостерігаються в природних умовах проживання на певній площі або об'ємі) і кількісний розподіл за видами. Кількісно видове різноманіття (ВР) характеризують за допомогою індексів. Найбільш широко використовують індекс Сімпсона, при обчисленні якого використовують чисельність організмів i -го виду n_i , знайдених на майданчику біоіндикації, і загальну чисельність всіх видів N . Методика забезпечує виявлення зон екологічних аномалій на місцевості з імовірною помилкою не більше 20%. Величина похибки гарантується при дотриманні наступних норм біоіндикації: - кількість майданчиків, що обстежуються – 3-5; - розмір площадки біоіндикації ґрунтового покриву не менше 1 м²; - розміри ґрунтової прикопки: 0,25×0,25 м на глибину зустрічальності безхребетних 20 см. Індекс Сімпсона розраховується за формулою $D_i = 1 / (P_1^2 + \dots + P_i^2)$, (8.1) де D_i – індекс Сімпсона, розрахований для кожної площадки біоіндикації; $P_1 \dots P_i$ – частка кожного виду в сумарному біорізноманітті, взятому за одиницю.

Рі розраховують таким чином: $P_i = n_i/N$, де n_i – чисельність i -го виду на майданчику біоіндикації; N – загальна чисельність всіх видів на майданчику біоіндикації. Відносний показник видового біорізноманіття на майданчику біоіндикації досліджуваної території розраховують за формулою: $D_i = D_i / D_{\text{контроль}}$

Для проведення оцінки необов'язково використовувати дані по всій фауні, можна обмежитися аналізом характерних груп видів, за якими отримана надійна інформація. Шляхом порівняння отриманих значень відносного показника видового біорізноманіття з критеріальними параметрами (табл.), отримуємо оціночний показник екологічної обстановки на досліджуваній території.

Критерії оцінки екологічного стану ґрунтового покриву

Показник	Параметр		
Відносні зміни видового біорізноманіття, D_i	Екологічне лихо	Надзвичайна екологічна ситуація	Відносно задовільна ситуація
	менше 25	25-50	більше 50

Результати досліджень

Номер прикопки	Дощові черв'яки		Молюски		Павукоподібні		Комахи	
	к	д	к	д	к	д	к	д
1	9	9	5	2	5	5	5	4
2	10	8	6	2	4	3	4	1
3	8	8	4	1	7	1	1	2

Примітка: К – контроль; Д – дослід.

Контрольні запитання 1. Яких тварин відносять до мезофауни? 2. Яких тварин відносять до макрофауни? 3. Що розуміється під видовим біорізноманіттям? 4. Як проводиться вибірка безхребетних тварин для оцінки стану ґрунтового покриву за видовим біорізноманіттям? 5. Основні положення методики оцінки стану ґрунтового покриву за видовим біорізноманіттям 6. Принцип обробки експериментальних даних.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Биологические методы оценки качества объектов окружающей среды : учеб. пособие. В 2 ч. Ч. 1. Методы биоиндикации С. М. Чеснокова ; Владим. гос. ун-т. Владимир : Издво Владим. гос. ун-та, 2007. 84 с.
2. Биоиндикация и биомониторинг / под ред. Д. А. Криволучкого. М. : Наука, 1991. 288 с. ISBN 5-02-005419-4.
3. Бабьева И. П. Биология почв. М. : Изд-во МГУ, 1989. 336 с.