

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ВОЛОГДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Кафедра химии

# БИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

*Методические указания  
к выполнению лабораторных работ*



ВОЛОГДА  
2016

УДК 57.017:502(076)

**Биологический контроль окружающей среды:** методические указания к выполнению лабораторных работ / сост. Г.А. Тихановская, Ю.В. Машихина. – Вологда: ВоГУ, 2016. – 39 с.

Методические указания предназначены для направлений бакалавриата факультета экологии, объединенных под грифом «Экология и природопользование». Содержит рекомендации к выполнению 9 лабораторных работ и может быть использовано в лабораторном практикуме дисциплины «Биологический контроль окружающей среды» для студентов направления бакалавриата 05.03.06 «Экология и природопользование». Также методические указания могут служить в качестве справочника в учебно-исследовательской работе, для магистрантов и аспирантов, занимающихся вопросами охраны окружающей среды.

Утверждено редакционно-издательским советом ВоГУ

Составители: Г.А. Тихановская, канд., биол. наук, доцент,  
Ю.В. Машихина, зав. лаб. аналит. химии, ассистент

Рецензент: Л.Г. Рувинова, д-р биол. наук, профессор кафедры ГиИГ

## ВВЕДЕНИЕ

Под биологическим контролем окружающей среды понимают систему методов анализа природных сред с помощью организмов определенных экосистем.

Следует различать:

1. **Биоиндикация** – это оценка качества природной среды по состоянию её биоты. Этот метод основан на наблюдении за составом и численностью видов-индикаторов. Т.е. это определение биологически значимых нагрузок на основе реакций на них живых организмов и их сообществ.

2. **Биотестирование** – это процедура установления токсичности среды с помощью тест-объектов, сигнализирующих об опасности независимо от того, какие вещества и в каком количестве вызывают изменения жизненно важных функций у тест-объектов. Существуют два вида биотестирования: морфофизиологический и хемотаксический. Хемотаксический метод более точный, т.к. в нем используется приборное и программное обеспечение. В настоящем лабораторном практикуме предлагаются методы биотестирования морфофизиологического и хемотаксического характера, в соответствии с требованиями, предъявляемыми к биотестированию:

- быть *применимым* для оценки *любых* экологических изменений среды обитания живых организмов;
- характеризовать наиболее *общие* и важные параметры жизнедеятельности биоты;
- достаточная *чувствительность*;
- быть *удобными* для лабораторного моделирования и для полевых исследований;
- достаточная *простота и дешевизна* для широкого использования;
- *универсальность* в отношении как типа воздействия на биоту (химическое, физическое, биологическое), так и типа экосистем.

### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

#### Биодиагностика почв по ферментативной активности

**Цель работы:** определение биологической активности почв на разном удалении от дороги по четырем ферментным системам: дегидрогеназам, каталазе, инвертазе, уреазе.

**Принцип метода:** определение активности почвенных ферментов основано на учете количества переработанного в процессе реакции субстрата или образующегося продукта реакции в оптимальных условиях температуры, pH среды и концентрации субстратов.

## Опыт 1. Определение каталазной активности [6]

**Оборудование и реактивы:** система для газометрии; 10%-й раствор  $H_2O_2$ ;  $CaCO_3$ .

**Подготовка системы для газометрии к работе:** Прибор состоит из: измерительной бюретки 2, соединенной посредством резиновых трубок с уравнильным сосудом 3 и реакционным сосудом 1 (пробирка) (рисунок 1.1). Бюретка имеет два отвода: один отвод соединяет ее с атмосферой, другой - с реакционным сосудом. Регулировка осуществляется краном 4. Бюретка и уравнильный сосуд, заполненный дистиллированной водой. Присоедините пустой реакционный сосуд к измерительной части прибора. Соедините бюретку с помощью крана 4 с отводом и установите с помощью уравнильного сосуда 3 уровень жидкости в бюретке 2 точно на нулевой отметке. Отсоедините бюретку от атмосферы и испытайте прибор на герметичность, для чего опустите уравнильный сосуд так, чтобы уровень жидкости в нем был ниже, чем в бюретке. Укрепите неподвижно уравнильный сосуд и если в течение 1-2 мин. уровень воды в бюретке будет неподвижен, то можно считать, что прибор герметичен. После проверки прибора на герметичность верните уравнильный сосуд в начальное положение и приступайте к выполнению основного эксперимента. Запишите в таблицу температуру окружающей среды и атмосферное давление в начале и в конце опыта. При расчетах используйте среднее значение.

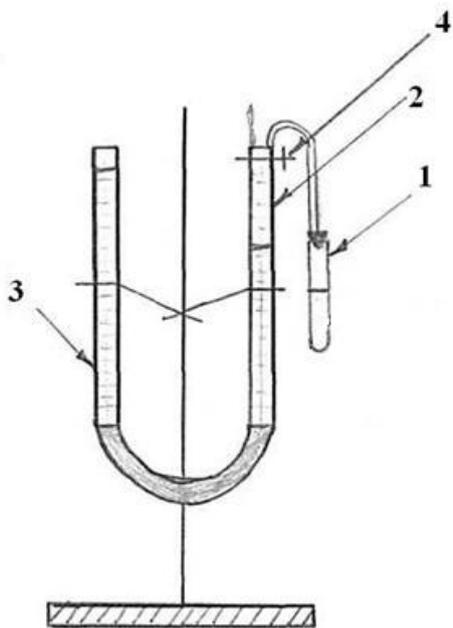


Рисунок 1.1 – Система для газометрии

1. Навеску просеянной почвы 1 г внести в пробирку, добавить 0,5 г  $CaCO_3$  и смочить 4 мл дистиллированной воды.

2. В пробирку с почвой прилить 1,7 мл 10%-го раствора перекиси водорода, быстро присоединить к пробке системы для газометрии и отметить начало опыта по секундомеру.

3. Взбалтывать смесь в пробирке следует во все время опыта, не касаясь непосредственно дна пробирки руками. Выделяющийся кислород вытесняет из бюретки воду, уровень которой отмечают. Количество выделившегося молекулярного кислорода учитывают при температуре 18–20 °С.

4. Измерить уровень воды в измерительной бюретке через 5 минут после начала опыта.

5. Активность каталазы выражают в объеме ( $см^3$ ) кислорода, выделившегося на 1 г почвы в минуту. Ошибка определения до 5%.

$$A = \frac{V_{O_2}}{5}$$

6. Аналогичные процедуры проделать со всеми образцами почв.

## Опыт 2. Определение дегидрогеназной активности [6]

**Оборудование, материалы и реактивы:** фотоколориметр; миллиметровая бумага; 0,1М раствор глюкозы; 1 %-й раствор 2,3,5-трифенилтетразолия хлористого (ТТХ); CaCO<sub>3</sub>; этиловый спирт; трифенилформаза (ТФФ).

1. Навески воздушно-сухой почвы по 1 г из каждого образца поместить в пробирки, добавить по 10 мг (на кончике шпателя) CaCO<sub>3</sub>, по 1 мл 0,1М раствора глюкозы и по 1 мл 1%-го раствора ТТХ; содержимое каждой пробирки тщательно смешать (ТТХ – трифенилтетразоль хлорид).

2. Пробирки поместить в анаэробический аппарат и откачать воздух насосом при разрежении 10–12 мм рт. ст. в течение 2–3 мин. Затем инкубировать при 30<sup>0</sup>С в течение 24 ч.

3. По истечении времени инкубации содержимое пробирок экстрагировать в 3–4 приема 25 мл этилового спирта. Для этого небольшой объем спирта внести в пробирку и встряхивать в течение 5 мин до появления красной окраски. Дать отстояться и надпочвенную жидкость профильтровать через бумажный фильтр. Добавить в пробирку следующую порцию спирта.

4. Полученный окрашенный раствор формаза колориметрировать на ФЭКе с синим светофильтром (500–600 нм).

5. Количество формаза в миллиграммах рассчитать по стандартной кривой. Для этого приготовить стандартный раствор формаза в этиловом спирте в концентрации 0,1 мг в 1 мл. Рабочие растворы для составления кривой приготовить путем разведений стандартного раствора (примерно 5 точек). Стандартную кривую построить на миллиметровой бумаге в системе: оптическая плотность при длине волны 500–600 нм – концентрация формаза в спирте.

6. Активность дегидрогеназы (X) выражают в миллиграммах ТФФ на 10 г почвы за сутки по формуле

$$X = \frac{AV \cdot 10}{v},$$

где V – общий объем фильтрата, 25 мл; 10 – пересчетный коэффициент веса почвы, г; v – произведение объемов субстрата и реагента, 1 мл; A – количество ТФФ, полученное по калибровочной кривой, мг/мл. Ошибка определения – до 8 %.

7. Аналогичные процедуры проделать со всеми образцами почв.

## Опыт 3. Определение инвертазной активности [6]

**Оборудование и реактивы:** фотоколориметр; 5%-й раствор сахарозы; ацетатный буфер (рН 4,7); толуол; раствор Феллинга: а – 40 г CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O растворяют в воде и доводят до 1 л, фильтруют через бумажный фильтр, б – 200 г сегнетовой соли (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>KNa · 4H<sub>2</sub>O) растворяют в дистиллированной воде, прибавляют 150 г КОН и доводят до 1 л.

1. В колбы вместимостью 50 мл поместить по 5 г каждого образца почвы, добавить по 10 мл 5%-го раствора сахарозы, 10 мл ацетатного буфера (рН 4,7) и 5–6 капель толуола.

2. Колбы закрыть пробками, встряхнуть, поместить в термостат при температуре 30 °С на 24 ч и периодически встряхивать их.

3. После инкубации содержимое колб отфильтровать в мерные колбы на 25 мл. Довести до метки.

4. Из фильтратов взять по 6 мл в большие пробирки, добавить по 3 мл раствора сегнетовой соли и 3 мл раствора сернокислой меди, хорошо перемешать и кипятить на водяной бане 10 мин. Получается красный осадок.

5. Пробирки с раствором охладить в воде, содержимое отфильтровать в большие пробирки. Прозрачный фильтрат колориметрировать на ФЭК, используя светофильтр с длиной волны 630 нм, ширина кюветы 1 см.

6. Для получения калибровочной кривой приготовить стандартный раствор: 6 мг глюкозы в 1 мл. Разведением приготовить серию растворов. Фотоколориметрировать и построить кривую: оптическая плотность – концентрация глюкозы в 1 мл.

7. Активность инвертазы (X) выражают в миллиграммах глюкозы

на 1 г почвы за 24 ч по формуле 
$$X = \frac{AV}{mv}$$
,

где  $A$  – количество глюкозы, полученное по калибровочной кривой из оптической плотности, мг/мл;  $m$  – навеска почвы, 5 г;  $V$  – общий объем фильтрата, 25 мл;  $v$  – объем фильтрата, взятого для анализа, 6 мл. Ошибка определения – до 5 %.

8. Аналогичные процедуры проделать со всеми образцами почв.

#### **Опыт 4. Определение уреазной активности почв [6]**

**Оборудование и реактивы:** фотоколориметр; 2%-й раствор мочевины в фосфатном буфере (рН 6,7); 50%-й раствор сегнетовой соли; 50%-й раствор  $CCl_3COOH$  (трихлоруксусная кислота); 1%-й раствор  $KCl$ ; реактив Несслера; стандартный раствор  $NH_4Cl$ .

1. По 5 г воздушно-сухой почвы поместить в колбы емкостью 100 мл, прилить по 20 мл 2%-го раствора мочевины в фосфатном буфере (рН 6,7) и по 200 мкл толуола.

2. Колбы плотно закрыть и поместить в термостат при температуре 37 °С на 4 ч.

3. После экспозиции прилить по 1 мл 50%-го раствора трихлоруксусной кислоты.

4. Для вытеснения из почвы поглощенного аммиака добавить по 50 мл 1 н. раствора хлористого калия.

5. Содержимое колб отфильтровать.

6. По 2 мл фильтрата поместить в мерные колбы объемом 50 мл, развести водой до 30 мл, затем прилить по 2 мл 50%-го раствора сегнетовой соли и по 2 мл реактива Несслера. Колбы долить водой до метки, перемешать и окрашенный раствор колориметрировать при длине волны 400 нм.

7. Содержание аммиака в фильтрате рассчитать по стандартной кривой. Для этого приготовить стандартный раствор  $\text{NH}_4\text{Cl}$  в концентрации 0,005 мг  $\text{N-NH}_4$  в 1 мл. Сделать серию разведений. Построить калибровочную кривую.

8. Активность уреазы ( $X$ ) выражают в миллиграммах  $\text{N-NH}_4$  на 1 г почвы за 4 ч по формуле:

$$X = \frac{AV}{m},$$

где  $A$  – содержание аммиака в фильтрате, полученное по калибровочной кривой, мг/мл;  $V$  – общий объем фильтрата, 50 мл;  $m$  – навеска почвы, 5 г.

9. Аналогичные процедуры проделать со всеми образцами почв.

### Задание:

Группа делится на 4 бригады, каждая из которых выполняет определение ферментативной активности по одному из четырех опытов.

1. Выполнить определение ферментативной активности в указанных образцах почв.

2. Внести полученные данные в таблицы 1.1 и 1.2.

Таблица 1.1

Ферментативная активность почв

№ образца	Каталаза, $\text{O}_2\text{см}^3/\text{г}$ за 1 мин	Дегидрогеназы, мг ТФФ на 10 г за 24 ч	Инвертаза, мг глюкозы на 1 г за 24 ч	Уреаза, мг $\text{NH}_4$ на 10 г за 24 ч
1				
2				

Таблица 1.2

Шкала для оценки степени обогащенности почв ферментами

Степень обогащенности почв	Каталаза, $\text{O}_2\text{см}^3/\text{г}$ за 1 мин	Дегидрогеназы, мг ТФФ на 10 г за 24 ч	Инвертаза, мг глюкозы на 1 г за 24 ч	Уреаза, мг $\text{NH}_4$ на 10 г за 24 ч
Очень бедная	< 1	<1	<5	<3
Бедная	1-3	1-3	5-15	3-10
Средняя	3-10	3-10	15-50	10-30
Богатая	10-30	10-30	50-150	30-100
Очень богатая	>30	>30	> 150	> 100

3. На основании данных таблиц 1.1 и 1.2 сделать вывод о состоянии анализируемых почв с указанием пункта отбора пробы.

4. Сделать выводы об экологическом состоянии системы на основании проведенных исследований.

### **Задание на самостоятельную проработку**

Письменно ответить на вопросы:

1. Требования к методам биотестирования.
2. Преимущества методов биотестирования.
3. На чем основан биохимический подход к биоиндикации?
4. В чем заключаются требования к отбору проб почвы?
5. Какие факторы могут повлиять на полученные результаты?

## **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2**

### **Определение числа аббераций хромосом в клетках корневой меристемы растений под действием мутагенов [3, 5]**

**Цель работы:** балльная оценка качества проросших семян, подвергнутых действию различных факторов.

**Принцип метода,** предложенного в лабораторной работе, основан на учете хромосомных аббераций, возникших в клетках корневой меристемы растений после обработки семян мутагенами.

**Оборудование, материалы и реактивы:** микроскоп; спиртовка; пинцет; держатель для предметного стекла; предметные и покровные стекла; чашка Петри или кювета для окрашивания; фильтровальная бумага; препаровальные наборы; красители – ацетоорсеин или ацетокармин, дистиллированная вода; этанол; 45 %-й раствор уксусной кислоты; корешки (2–3 мм), пророщенные в течение 3 сут. после обработки и фиксированные в уксусном алкоголе семян ячменя (14 хромосом), ржи (14 хромосом), гороха (14 хромосом) и лука (16 хромосом).

#### ***Порядок выполнения лабораторной работы***

1. Получить у преподавателя фиксированные корешки растений, подвергнутые воздействию фактора среды.

2. Приготовить «давленные» препараты из апикальной меристемы и окрасить ацетоорсеином (ацетокармином). Для этого корешки поместить на предметное стекло в каплю красителя и подогреть над пламенем спиртовки, доводя до легкого кипения несколько раз, особенно в том случае, если не была проведена мацерация в HCl.

**Внимание!** Корешки злаков труднее окрашиваются и мацерируются, поэтому приходится увеличивать время их окрашивания. Например, корни ячменя, пшеницы, ржи иногда выдерживают в ацетоорсеине от одних до полутора суток при комнатной температуре.

3. На предметное стекло, где расположен объект, нанести каплю 45%-го раствора уксусной кислоты, отделить конус нарастания, удалить лишние ткани, накрыть покровным стеклом и фильтровальной бумагой и постукивать сверху, например тупой стороной карандаша, чтобы уложить клетки конуса нарастания в виде монослоя.

4. В каждом препарате анализировать все метафазы, учитывая долю клеток с абберациями хромосом. Анализ спектра аббераций провести по известной классификации с выделением хроматидных (одиночных) и хромосомных (двойных) фрагментов.

5. Составить таблицу для записи данных. В отчете представить рисунки аббераций.

6. Сделать вывод о влиянии конкретного фактора на цитогенетические характеристики клеток корневой меристемы растений.

7. Рассчитать частоту хромосомных аббераций ( $\mathcal{C}$ , %), учитывая общее число клеток и клетки с хромосомными абберациями, по формуле

$$\mathcal{C} = \frac{A \cdot 100}{B},$$

где  $A$  – число клеток с нарушениями;  $B$  – общее число просмотренных клеток.

**Внимание!** Если в одной клетке обнаружено несколько типов нарушений, число клеток с нарушениями будет меньше общего числа аббераций. Число аббераций на клетку (или 100 клеток) устанавливают, разделив общее число аббераций ( $C$ ) на число просмотренных клеток ( $B$ ).

8. Рассчитать спектр аббераций ( $K$ ) по формуле

$$K = \frac{D \cdot 100}{B},$$

где  $D$  – число аббераций определенного типа;  $B$  – число просмотренных клеток.

9. Определить долю аббераций каждого типа от общего числа всех аббераций, разделив число аббераций одного типа ( $D$ ) на общее число аббераций ( $C$ ). Поврежденность клетки определить как отношение общего числа аббераций ( $C$ ) к числу абберантных клеток ( $A$ ) и выразить в процентах.

10. Оценить в баллах влияние мутагена на проростки.

Для получения интегральной характеристики цитогенетического состояния живых организмов (помимо человека) В.М. Захаровым предложена балльная шкала:

1 балл – условно нормальное состояние, частота абберантных клеток до 5% (в лимфоцитах человека 1–2 %);

2 балла – низкая степень изменения, частота абберантных клеток в пределах 6–10 %;

3 балла – средняя степень изменения, частота абберантных клеток в пределах 11–15%;

4 балла – высокая степень изменения, частота абберантных клеток в пределах 16–20 %;

5 баллов – критическое состояние, частота абберрантных клеток выше 20%.

Условно нормальный уровень находится в пределах колебаний спонтанной частоты абберрантных клеток. Этот показатель изменяется в зависимости от вида, возраста, физиологического состояния, генетических особенностей организма. Однако многолетними исследованиями показано, что он не превышает 5 % (по некоторым источникам – для человека не выше 2 %).

### **Задание на самостоятельную проработку**

Письменно ответить на вопросы:

1. Сущность генетического метода биотестирования?
2. Что такое хромосома? Перечислить типы хромосом.
3. Дать характеристику понятия кариотип.
4. Виды мутаций.
5. Дать определение термину – митоз.
6. Перечислить фазы митоза.
7. Морфологические картины аномалий митоза.
8. Из каких структурных единиц состоит хромосома?
9. Дать определение термина абберрации хромосом.

### **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3**

#### **Влияние внешних условий на интенсивность фотосинтеза [1]**

**Цель работы:** установить методом счета пузырьков зависимость интенсивности фотосинтеза элодеи от солей тяжелых металлов, растворенных в воде.

**Оборудование и материалы:** веточки элодеи; растворы солей кадмия (5 мкг/л), свинца (1,0 мг/л), меди (0,01 мг/л) и железа (1,0 мг/л); пробирки; цилиндр со стоком внизу; штатив; лезвие; песочные часы.

Для определения интенсивности фотосинтеза водных растений можно использовать метод счета пузырьков кислорода. На свету в листьях происходит процесс фотосинтеза, продуктом которого является кислород, накапливающийся в межклетниках. При срезании стебля избыток газа начинает выделяться с поверхности среза в виде непрерывного тока пузырьков, быстрота образования которых зависит от интенсивности фотосинтеза. Данный метод дает представление о тесной зависимости процесса фотосинтеза от внешних условий.

## ХОД РАБОТЫ

Поместить веточку элодеи с неповрежденной верхушечной почкой в кювету с водой и обновить срез острой бритвой для устранения возможной закупорки путей при выходе газа. Погрузить веточку срезом вверх в пробирку с водой, предварительно обогащенной углекислым газом путем растворения небольшого количества соды (перед погружением веточки внести в пробирку на кончике ножа  $\text{NaHCO}_3$  и взболтать).

Поместив пробирку с веточкой элодеи в те или иные условия, подождать пока установится равномерный ток пузырьков, перевернуть песочные часы и подсчитать количество пузырьков, выделенных за определенное время. Используя в качестве источника света настольную лампу мощностью 100-200 Вт, сделать следующие опыты.

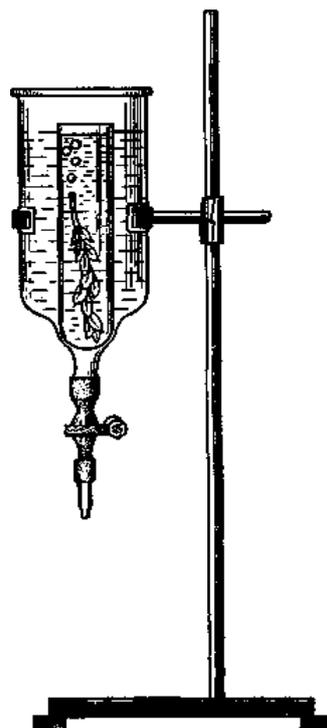


Рис. 3.1. Установка для учета фотосинтеза методом счета пузырьков

### ОПЫТ 1. Влияние солей кадмия

Налить раствор с солями кадмия в колбу или стеклянный цилиндр со стоком внизу (рис. 3.1) и вставить в этот сосуд пробирку с веточкой элодеи. Подсчитать количество пузырьков кислорода при различных концентрациях солей кадмия. Данные записать в таблицу 3.1.

Таблица 3.1.

Концентрация кадмия в растворе	Количество пузырьков $\text{O}_2$ за 5 мин
0,5 мкг/л (ПДК <sub>р.х.</sub> )	
1,0 мкг/л (2 ПДК <sub>р.х.</sub> )	
2,5 мкг/л (5 ПДК <sub>р.х.</sub> )	
5 мкг/л (10 ПДК <sub>р.х.</sub> )	

### ОПЫТ 2. Влияние солей свинца

Налить раствор с солями свинца в колбу или стеклянный цилиндр со стоком внизу (рис. 3.1) и вставить в этот сосуд пробирку с веточкой элодеи. Подсчитать количество пузырьков кислорода при различных концентрациях солей свинца. Данные записать в таблицу 3.2.

Таблица 3.2.

Концентрация свинца в растворе	Количество пузырьков $\text{O}_2$ за 5 мин
0,1 мг/л (ПДК <sub>р.х.</sub> )	
0,2 мг/л (2 ПДК <sub>р.х.</sub> )	
0,5 мг/л (5 ПДК <sub>р.х.</sub> )	

1,0 мг/л (10 ПДК <sub>р.х.</sub> )
------------------------------------

### ОПЫТ 3. Влияние солей меди

Налить раствор с солями меди в колбу или стеклянный цилиндр со стоком внизу (рис. 3.1) и вставить в этот сосуд пробирку с веточкой элодеи. Подсчитать количество пузырьков кислорода при различных концентрациях солей меди. Данные записать в таблицу 3.3.

Таблица 3.3.

Концентрация меди в растворе	Количество пузырьков O <sub>2</sub> за 5 мин
0,001 мг/л (ПДК <sub>р.х.</sub> )	
0,002 мг/л (2 ПДК <sub>р.х.</sub> )	
0,005 мг/л (5 ПДК <sub>р.х.</sub> )	
0,01 мг/л (10 ПДК <sub>р.х.</sub> )	

### ОПЫТ 4. Влияние солей железа

Налить раствор с солями железа в колбу или стеклянный цилиндр со стоком внизу (рис. 3.1) и вставить в этот сосуд пробирку с веточкой элодеи. Подсчитать количество пузырьков кислорода при различных концентрациях солей железа. Данные записать в таблицу 3.4.

Таблица 3.4.

Концентрация железа в растворе	Количество пузырьков O <sub>2</sub> за 5 мин
0,1 мг/л (ПДК <sub>р.х.</sub> )	
0,2 мг/л (2 ПДК <sub>р.х.</sub> )	
0,5 мг/л (5 ПДК <sub>р.х.</sub> )	
1,0 мг/л (10 ПДК <sub>р.х.</sub> )	

Сделать вывод о влиянии солей тяжелых металлов на интенсивность фотосинтеза элодеи.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

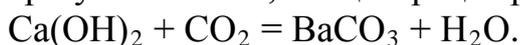
### Определение интенсивности дыхания по количеству выделенной углекислоты [1]

**Цель работы:** определить интенсивность дыхания семян, проросших в растворах солей тяжелых металлов разных концентраций.

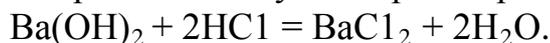
**Оборудование и материалы:** семена растений; колбы конические 250 мл; пробки; марля; раствор Ba(OH)<sub>2</sub>; растворы солей кадмия (5 мкг/л), свинца (1,0 мг/л), меди (0,01 мг/л) и железа (1,0 мг/л); 0,1 н раствор HCl; фенолфталеин.

Для определения интенсивности дыхания по количеству выделенной CO<sub>2</sub> в замкнутый сосуд помещают навеску исследуемого материала (проросшие семе-

на) и определенное количество раствора щелочи (рис. 4.1). Выделяемый  $\text{CO}_2$  реагирует со щелочью, в результате чего, концентрация раствора уменьшается



Через определенное время оставшуюся в растворе щелочь титруют:



Сравнивают полученную величину с результатом титрования такого же количества исходного раствора щелочи.

### ХОД РАБОТЫ

Группа делится на четыре бригады по 2-3 человека. Каждая из бригад определяет интенсивность дыхания семян, проросших в растворах солей тяжелых металлов разных концентраций в соответствии с лабораторной работой №3.

Положить навеску исследуемого материала (семена, проросшие в растворах солей тяжелых металлов) в марлевый мешочек и поместить в колбу с децинормальным раствором  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  (10 мл), предварительно добавив в него две капли фенолфталеина. Плотнo заткнуть пробку. Время от времени колбу надо покачивать, чтобы разрушить пленку  $\text{BaCO}_3$  на поверхности жидкости.

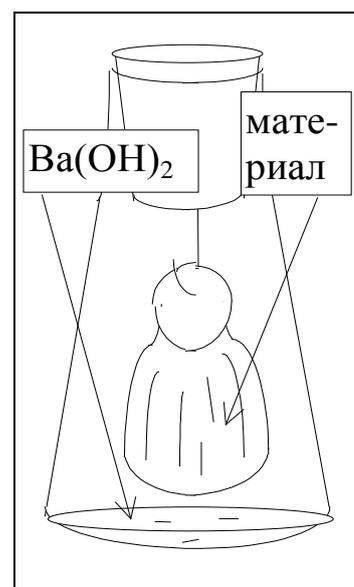


Рис.4.1 Колба для определения интенсивности дыхания

Одновременно ставится контрольный опыт (такая же колба, но без материала). Через 1-2 ч вынуть материал, плотно закрыть пробку. Провести титрование оставшейся щелочи, приливая из бюретки 0,1 н соляную кислоту до исчезновения розового окрашивания. Результат записать в таблицу 4.1.

Таблица 4.1

Объект	Вес пробы, г	Налито $\text{Ba}(\text{OH})_2$ , мл	Время			Прилито $\text{HCl}$ , мл		Поправочный коэффициент $\text{HCl}$	Интенсивность дыхания $\text{мг/г}\cdot\text{ч}$
			Начало опыта	Конец опыта	Продолжительность	Контроль	Опыт		
Контроль									

Проба 1									
---------	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Интенсивность дыхания вычисляется по формуле:

$$X = \frac{(a - b) \cdot K \cdot 2,2}{P \cdot t},$$

где а - результат титрования содержимого контрольной пробы;

в - результат титрования содержимого опытной пробы;

К - поправочный коэффициент к  $T_{HCl}$ ;

2,2 - количество (мг)  $CO_2$ , эквивалентное 1 мл 0,1 н HCl;

P - вес пробы (г);

t - продолжительность опыта, ч.

Сделать вывод, сопоставив интенсивность дыхания разных объектов.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5

### Использование микрогаметофитного поколения *Tussilago Farfara* для биоиндикации окружающей среды [3, 5]

**Цель работы:** *ознакомление с методиками палиноиндикации (пыльцевого анализа).*

#### Методы исследования

##### *Ацетокарминовый метод*

Предварительно зафиксированный материал (фиксатор Карнуа) промывают и хранят в 80% спирте. Из спирта пыльник переносят на предметное стекло и раздавливают в капле ацетокармина. Убрав лишние ткани, препарат накрывают покровным стеклом и осторожно нагревают на спиртовке. У фертильных пыльцевых зерен зернистая цитоплазма и спермии окрашены в густой карминово-красный цвет. Стерильные пыльцевые зерна почти не окрашиваются кармином или окрашиваются неравномерно. Их содержимое часто отходит от оболочки и находится на разных этапах гибели. Спермиев в таких пыльцевых зернах нет. Для анализа просчитывалось число фертильных и стерильных пыльцевых зерен на  $10^1$  полях зрения микроскопа препарата с каждого бутона.

*Определение жизнеспособности пыльцы по активности пероксидазы – метод Шардакова*

Пыльцу помещали на предметное стекло в каплю смеси, состоящей из четырех растворов:

- 0,2 г бензидина основного на 100 мл 50%-го этанола;
- 0,15 г  $\alpha$ -нафтола на 100 мл 50% этанола;

- 0,25 г  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  на 100 мл дистиллированной воды;
- 0,3% раствор перекиси водорода.

В присутствии бензидина живая пыльца, содержащая пероксидазу, окрашивается в ярко-розовый или темно-красный цвет. Погибшая пыльца не окрашивается.

Для анализа подсчитывается число окрашенных пыльцевых зерен на десяти полях зрения микроскопа при увеличении  $10\times 20$ .

#### *Проращивание пыльцевых зерен в камере Ван-Тигема*

Камеру Ван-Тигема легко приготовить. Для этого стеклянную трубку диаметром 10–12 мм режут на кольца длиной 5–7 мм. Кольцо с отшлифованными краями приклеивают парафином в центре предметного стекла. Верхние края кольца смазывают вазелином, а внутрь него на дно наносят каплю воды. Сверху кольцо закрывают покровным стеклом, в центр которого помещена капля искусственной среды с пыльцой (рис. 5.1).

Для приготовления искусственной среды агар-агар заливают в колбе небольшим количеством воды для набухания, а затем колбу ставят на теплую водяную баню. Когда агар-агар растворится, добавляют сахарозу. В 100 мл готового раствора должно быть растворено 1 г агар-агара и 5–40 г сахарозы (в зависимости от объекта). Для гороха, кукурузы, картофеля и других растений используют 10–15%-й раствор сахарозы. Иногда добавляют 0,008%-й раствор борной кислоты.

На чистое покровное стекло наносят каплю горячей искусственной среды и сверху быстро сеют пыльцу, предварительно набрав ее пинцетом, который держат в левой руке. Другой рукой берут скальпель, которым слегка ударяют сверху по пинцету, чтобы пыльца сеялась равномерно. Покровное стекло переворачивают и накрывают им кольцо камеры Ван-Тигема. Пыльца оказывается внутри влажной камеры.

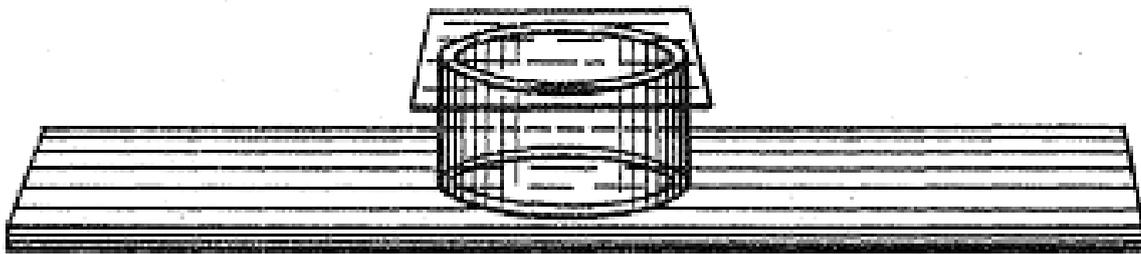


Рис. 5.1. Камера Ван-Тигема для проращивания пыльцы (по В. Н. Юрцеву, 1963)

Камеры переносят в термостат с температурой 20–30°C. Через каждый час пыльцу нужно просматривать под микроскопом, чтобы установить начало ее прорастания. Подсчитывают прорастающие пыльцевые зерна в пяти – десяти полях зрения. Процент жизнеспособной пыльцы устанавливают по числу

проросших пыльцевых зерен. Пыльцевые трубки должны иметь длину, не меньшую, чем диаметр пыльцевых зерен.

Удобный объект для проращивания пыльцы в камерах Ван-Тигема – примула.

При проращивании пыльцы кукурузы можно добавлять к питательной среде свежий куриный желток. Среду готовят из растворов 1%-го агар-агара и 17%-го сахарозы. На 10 мл этой среды добавляют 1 каплю желтка. На дно камеры помещают 0,5 см<sup>2</sup> влажной фильтровальной бумаги. Проращивают пыльцу при 24–26 °С [9].

**Задание:**

1. Приготовить препараты по:

- ацетокарминовому методу;
- методу Шардакова (активность пероксидазы);
- проращиванию пыльцы в камере Ван-Тигема.

2. Рассчитать процент фертильных, жизнеспособных и проросших пыльцевых зерен (табл.5.1) по ацетокарминовому методу, методу Шардакова и по проращиванию пыльцы в камере Ван-Тигема.

*Примечание:* т.к. анализ препаратов и проведение подсчетов фертильных и стерильных пыльцевых зерен занимает значительное время и не укладывается в часы, отведенные для лабораторной работы, то следующее задание необходимо выполнить по заранее определенным данным.

Таблица 5.1

Жизнеспособность пыльцы растений *Tussilago Farfara* вдоль автотрассы  
Вологда – Архангельск

Расстояние до автотрассы	I				II				III			
	Всего клеток (шт)	Фертильные (шт)	Фертильные %	И Т Ф	Всего клеток (шт)	Жизнеспособные (шт)	Жизнеспособные %	И Т Ф	Всего клеток (шт)	Проросшие, (шт)	Проросшие, %	И Т Ф
1	1000	340			1000	372			1000	301		
50	1000	321			1000	481			1000	348		
100	1000	456			1000	512			1000	411		
150	1000	601			1000	588			1000	625		
200	1000	735			1000	621			1000	832		
250	1000	721			1000	799			1000	841		
300	1000	833			1000	831			1000	850		
К-ль	1000	859			1000	890			1000	850		

I – ацетокарминовый метод; II – по активности пероксидазы; III – проращивание в камере Ван-Тигема.

3. Рассчитать ИТФ (индекс токсичности фактора) по фертильности, жизнеспособности и прорастанию пыльцы

$$\text{ИТФ} = \text{ТФ}_o / \text{ТФ}_k,$$

где  $\text{ТФ}_o$  – значение регистрируемой тест-функции в опыте;

$\text{ТФ}_k$  – значение тест-функции в контроле.

4. Внести недостающие данные в таблицу 5.1.

5. Заполнить таблицу 5.2 и определить уровень токсичности территории исходя из следующего:

<b>ИТФ</b>	<b>Токсичность</b>
< 0,5	Сверхвысокая
0,5-0,65	высокая
0,65 – 0,8	средняя
0,8 – 0,9	низкая
> 0,9	норма

Таблица 5.2

Средний индекс токсичности фактора по анализу качества зрелых пыльцевых зерен *Tussilago Farfara* в районе автотрассы Вологда –Архангельск

Расстояние до автомагистрали	ИТФ ацетокармин	ИТФ пероксидазы	ИТФ Ван-Тигема	ИТФ средняя	Характеристика уровней токсичностей
1					
50					
100					
150					
200					
250					
300					

6. Начертить график зависимости фертильности пыльцы (y) в зависимости от расстояния до автотрассы (x) для трех способов (ацетокарминовый метод, активность пероксидазы, камера Ван-Тигема).

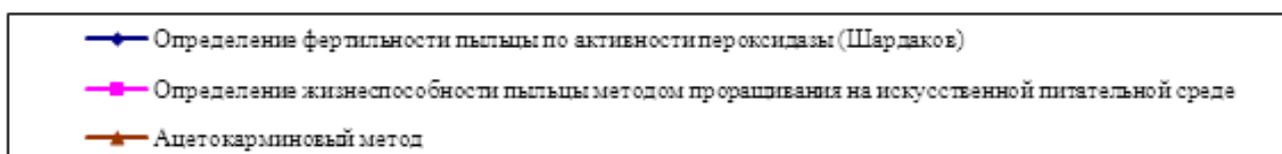
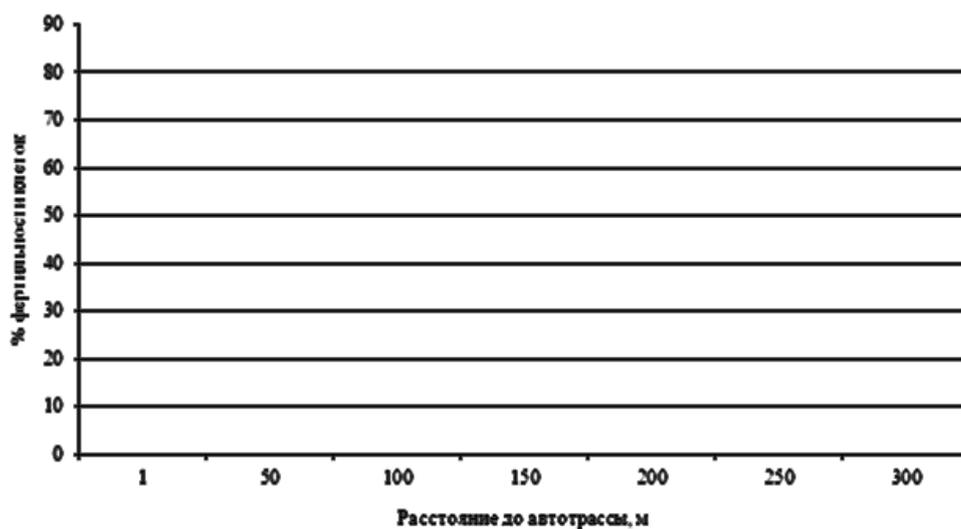


Рис. 5.2. График зависимости жизнеспособности пыльцы от расстояния до автодороги

7. Сделать выводы на основе результатов исследования.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6

### Анализ хода мейоза при микроспорогенезе *Tussilago Farfara* в районе автомагистрали [3, 5]

**Цель работы:** изучение аномалий хода мейоза при микроспорогенезе.

В качестве неблагополучной экосистемы были выбраны участки вдоль федеральной трассы М-8 «Холмогоры» Вологда - Архангельск. В качестве объекта исследований – растения *Tussilago Farfara* (мать-и-мачеха), постоянно произрастающие в данной экосистеме. Выбор объекта обуславливался большой распространенностью данного вида, ранним цветением, изобилием семян, легкостью сбора материала.

#### **Задание**

1. Приготовить ацетокарминовые микропрепараты для проведения анализа хода мейоза на примере бутонов разного возраста *Tussilago Farfara* (методика приготовления – лабораторная работа № 5).

2. Рассмотреть и зарисовать отдельные стадии образования микроспор (рисунок).

3. Для количественного анализа влияния факторов среды использовать имеющиеся экспериментальные данные, сведенные в таблицы 6.1 и 6.2. С этой целью определить в процентном выражении количество нормальных мейозов (табл. 6.1) и число нормальных тетрад (табл. 6.2). Внести данные в соответствующие таблицы.

Таблица 6.1

Анализ хода мейоза при микроспорогенезе *Tussilago Farfara*  
в районе автомагистрали Вологда – Архангельск

Расстояние от дороги (м)	Всего микро-спороцитов	Выбросы хромосом шт.	Мосты шт.	Прочие аномалии шт.	Нормал. мейоз, %	ИТФ
1	90	9	2	52		
50	91	8	15	40		
100	101	5	10	42		
150	98	7	7	19		
200	89	6	6	11		
250	91	5	3	16		
300	93	0	1	16		
Контроль	102	0	0	3		

Таблица 6.2

Тетрадный анализ *Tussilago Farfara* в районе автомагистрали  
Вологда- Архангельск

Расстояние до автодороги	Всего клеток	Аномальные клетки, шт.			Нормальные тетрады, %	ИТФ
		монады	полиады	аномальные тетрады		
1	403	165	64	36		
50	521	128	110	76		
100	471	120,1	89	47		
150	498	4	81	80		
200	437	2	73	37		
250	493	3	3	4		
300	461	2	4	6		
Контроль	501	0,1	3	2		

4. Заполнить таблицу 6.3 и дать характеристику токсичности исходя из:

ИТФ	Токсичность
< 0,5	Сверхвысокая
0,5-0,65	высокая
0,65 – 0,8	средняя
0,8 – 0,9	низкая
> 0,9	норма

Таблица 6.3

Средний индекс токсичности фактора района автотрассы Вологда-Архангельск по результатам анализа хода мейоза при микроспорогенезе *Tussilago Farfara*

Расстояние до автотрассы	ИТФ			ИТФ средняя	Характеристика токсичности
	Жизнеспособность пыльцы	Аберрации в мейозе	Тетрадный анализ		
1					
50					
100					
150					
200					
250					
300					

5. Построить график зависимости средней ИТФ от расстояния до автотрассы.

6. Сделать вывод об экологической обстановке и по возможности объяснить сложившуюся ситуацию.

7. Ответить на вопрос: какие исследования вы предложили бы провести в данной местности для выяснения причин подобной экологической ситуации.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7

### Сравнительная характеристика экологического состояния промышленных и сельскохозяйственных зон на основе методов биомониторинга [3, 5]

**Цель работы:** провести сравнительный анализ влияния промышленных и сельскохозяйственных предприятий на состояние окружающей среды.

#### Материалы исследований

Материалом служили еще нераспустившиеся бутоны растений *Tussilago farfara*, собранные в июле-августе вокруг Череповецкой ГРЭС (пос. Кадуй Вологодской области) и вокруг СХПК «Племптица-Можайское» (пос. Можайское Вологодского района Вологодской области). В зоне сильного воз-

действия поллютантов (в промзоне и до 3 км за ее пределами) были выбраны бутоны растений, в разной степени пораженные токсикантами. В качестве диагностического органа были выбраны бутоны еще нераспустившихся растений, потому что таким образом можно выявить влияние поллютантов на наследственные структуры.

### Методика проведения исследований

Жизнеспособность пыльцы в качестве биотеста на наличие ксенобиотиков в окружающей среде определялась ацетокарминовым методом и по активности пероксидазы (табл. 7.1 и 7.2). Для этого собирались цветки мать-и-мачехи в непосредственной близости от Кадуйской ГРЭС (10 метров), пункт 2 – 500 метров от ГРЭС, и за границей промзоны – 1000 – 1500 метров. В качестве контроля использовались цветки биотопов на расстоянии  $\approx$  2000 – 2500 метров. Аналогично производился сбор образцов в расположении СХПК «Племптица-Можайское», т.е. тестировалась экологическая обстановка в районе промпредприятия и сельскохозяйственного производства.

Таблица 7.1

Анализ фертильности пыльцы. Ацетокарминовый метод

Место отбора проб	Пункт (м)	Всего клеток	Число стерильных микроспор	Число фертильных микроспор	% фертильности пыльцы	ИТФ
Кадуй	10	778	256	522		
	500	800	211	589		
	1000	910	189	722		
Можайское	10	1087	13	1074		
	500	100	31	969		
	1000	1100	29	1071		
Контроль		1200	15	1185		

Таблица 7.2

Анализ фертильности пыльцы. Активность пероксидазы

Место отбора проб	Пункт (м)	Всего клеток	Число стерильных микроспор	Число фертильных микроспор	% фертильности пыльцы	ИТФ
Кадуй	10	949	295	654		
	500	982	226	756		
	1000	991	149	842		
Можайское	10	1190	48	1142		
	500	1152	52	1100		
	1000	1291	52	1239		
Контроль		1200	24	1176		

В случаях нарушений нормального хода развития пыльцы, она крайне неоднородна и морфологически разнокачественна: наряду с карликовой, встречается гигантская пыльца и все возможные переходы между этими пределами. Как карликовая, так и гигантская пыльца обычно бесплодна и дегенерирует на разных ступенях развития. При этом ядра и плазма сильно сжимаются, разрушаются и пыльца становится пустой. Пустые пылинки, как правило, деформированы, сморщены, собраны в отдельные группы. Кроме этого, наблюдались агрегаты пылинок, соединенные между собой тонкими широкими мостиками. Причину этого явления, по-видимому, следует искать в образовании неправильных тетрад микроспор. Это подтверждается данными тетрадного анализа.

### Результаты исследований

*Редукционное деление как тест-система биоиндикации среды.*

Ход мейоза при микроспорогенезе в качестве тест-системы для определения генотоксичности ксенобиотиков изучался по вышеуказанной схеме (см. пыльцевой анализ).

Таблица 7.3

Анализ хода мейоза при микроспорогенезе

Место отбора проб	Пункт (м)	Всего клеток	Число аномальн. клеток	Число клеток с норм. мейозом	Норма мейозов %	ИТФ
Кадуй	10 (1)	45	17	28		
	500 (2)	51	15	36		
	1000 (3)	50	13	37		
Можайское	10 (1)	47	3	44		
	50 (2)	41	6	35		
	1000 (3)	48	4	44		
Контроль		62	1	61		

Результаты цитологических анализов показывают, что в пункте 1 наблюдается ряд аномалий микроспорогенеза, когда отдельные спорциты не приступают к мейозу, они либо дегенерируют, либо впоследствии образуют монады. В случае дегенерации цитоплазма в них закрашивается густо, выглядит зернистой и грубоструктурированной, плазма отслаивается от клеточных стенок по типу плазмоллиза. Ядро не просматривается. Другая часть микроспороцитов образует реституционные ядра и затем монады. Особо следует отметить значительное количество микроспор, лежащих цепочками и связанных между собой цитоплазматическими мостиками. В таких цитоплазматических тяжках находится хроматин, который в виде тонких нитей тянется из одной клетки в другую. Часть микроспороцитов отстает в развитии и приступает к делению позже, чем на контроле, т.к. на микропрепаратах наряду с фазами мейоза встречаются микроспороциты в ранней профазе. Таким образом, первое деле-

ние мейоза проходит аномально. Сюда следует отнести частичное или полное отсутствие конъюгации хромосом, вследствие чего все хромосомы разбросаны по клетке. Наблюдаются выбросы унивалентов, бивалентов, либо целых групп хромосом за пределы веретена деления. В результате образуются триваленты, квадриналенты и прочие аномальные хромосомные ассоциации. В анафазе и телофазе I отмечены хромосомные мостики и образование более чем двух ядер. Это, в свою очередь, ведет к аномалиям второго мейотического деления: образуются не два веретена в метафазе II, а три и больше. Второе деление мейоза идет с нарушениями, заканчиваясь образованием аномальных споряд.

Анализ мейоза у растений собранных в пункте 2 (Кадуй), показал наличие сходных аномалий, но в меньшем количестве. Следует добавить появление в метафазе I раздвоенных метафазных пластинок и многополюсных веретен деления. В пункте 1 (Кадуйская ГРЭС) наблюдается агглютинация хроматина. Хромосомное вещество в виде капель разной величины разбросано по цитоплазме клеток. Встречаются клетки с аномальной ориентацией веретена деления. Создается впечатление, что ксенобиотики, действуя на вещество веретена, нарушают его ориентацию в клетке. Кроме этого, следует отметить изменения в порядке заложения клеточных перегородок. Иногда цитокенез начинается на стадии двуядерного микроспороцита, в результате чего образуется диада клеток микроспор, которые могут не приступить ко второму мейотическому делению. Асинхронность деления ядер в мейозе II приводит к образованию триад, тетрад с микроспорами различной величины и т.д. Подобные аномалии мейоза описываются многими авторами при различных изменениях факторов внешней среды, при гибридизации, полиплоидии, апомиксисе и т.д.

Сравнивая полученные результаты с литературными данными, следует отметить, что аномалии хода мейоза однотипны при воздействии химических и физических факторов на микроспорогенез. По-видимому, в данном случае мы сталкиваемся со вторичным действием ксенобиотиков через изменение метаболизма растения, хотя не исключено и генотоксичное действие, вызывающее хромосомные перестройки, сохраняющиеся в ряде клеточных поколений.

#### *Тетрадный анализ как тест-система биоиндикации среды*

Таблица 7.4

Тетрадный анализ действия ксенобиотиков

Место отбора проб	Пункт	Всего клеток	Монады, %	Аном. тетрады, %	Полиады, %	Норма тетрад, %	ИТФ
Кадуй	10	571	127	1	2		
	500	610	1	28	1		
	1000	582	1	1	3		
Можайское	10	522	-	4	2		
	50	548	-	1	3		
	1000	502	-	-	2		
Контроль		720	-	-	-		

При цитологическом анализе материала отмечается значительное количество дегенерирующих тетрад. Дегенерация может происходить либо на стадии тетрад ядер, до цитокинеза, либо на стадии тетрад клеток, либо во время цитокинеза.

Микроспоры при этом выглядят сморщенными, с густо окрашенной цитоплазмой, либо наоборот, лишены плазмы. Если дегенерация наступает до цитокинеза, то плазма собрана в сгустки, распределяется неравномерно, сильно вакуолизирована.

### **Задание**

1. На основании экспериментальных данных:

а) рассчитать абсолютные величины в процентах и определить ИТФ по отдельным анализам (пыльца, митоз, тетрады). Заполнить таблицы 7.1, 7.2, 7.3, 7.4.

ИТФ индекс токсичности фактора определяется по формуле:

$$\text{ИТФ} = \text{ТФ}_0 / \text{ТФ}_к,$$

где  $\text{ТФ}_0$  – значение регистрируемой тест-функции в опыте;

$\text{ТФ}_к$  – значение тест-функции в контроле.

б) составить сводную таблицу (ИТФ ср) и дать характеристику токсичности территорий;

в) построить графики зависимости (или диаграммы);

г) сделать вывод об экологической ситуации в регионе, определить причины и следствия, связать с производственной базой на территории.

### **Задание на самостоятельную проработку**

Письменно ответить на вопросы:

1. Охарактеризовать основные этапы микроспорогенеза.
2. Что такое тетрада микроспор?
3. Что такое палиноиндикация?
4. Объяснить термин фертильность и жизнеспособность пыльцы.
5. Почему нарушение хода мейоза возможно использовать в качестве показателя появления в среде ксенобиотиков?
6. В чем преимущество тетрадного анализа?
7. Перечислить методы определения жизнеспособности пыльцы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8  
**Allium-тест. Цитогенетический анализ корневой меристемы  
Allium cepa**

**Цель работы:** ознакомиться с цитогенетическими методами биомониторинга окружающей среды

**Опыт 1. Митотическая активность и митотический индекс как показатель генотоксичности среды (меристема корешков *Allium cepa*) [5]**

Клеточное деление относится к числу важнейших биологических процессов, так как с ним связана передача наследственной информации. Поэтому этот вопрос так интересует генетиков, цитологов и селекционеров.

В пределах ткани обычно различают две популяции клеток: покоящиеся и находящиеся в активном состоянии, т. е. делящиеся или дифференцирующиеся.

Возможны различные способы деления клеток, но митоз является основным для соматических клеток. Хорошо известные типы размножения организмов: бесполое и вегетативное. Ростовые процессы у организмов, размножающихся половым путем, происходят на основе митоза.

С генетической точки зрения, митоз играет важную роль, так как при этом происходит точное распределение генетической информации между дочерними клетками, т. е. осуществляется наследственная преемственность свойств организма и поддерживается непрерывность жизни различных поколений клеток. При нормальном ходе митоза после его завершения из одной клетки образуются две равноценные по генотипу.

Митоз можно изучить, рассмотрев жизненный цикл клетки, основные этапы которого универсальны для всех клеток, способных к митотическому делению. Такие клетки проходят последовательно следующие этапы: интерфазу, профазу, метафазу, анафазу и телофазу, составляющие вместе так называемый митотический цикл. Четыре последних этапа называются фазами митоза.

Каждой ткани присущ определенный уровень митотической активности, изменение которого носит четко выраженный ритмичный характер.

При изучении деления клеток определяется митотическая активность ткани, то есть отношение числа клеток, находящихся в митозе, к общему числу клеток исследуемой ткани. Его можно выразить в виде показателя, который называется митотическим индексом.

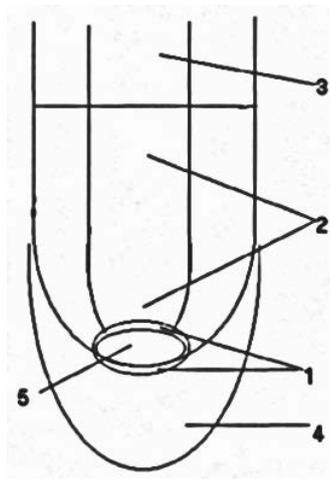
*Митотический индекс* чаще всего выражают в промилле, то есть числом митозов на 1000 клеток ткани. Для этого на постоянных препаратах подсчитывают число митозов в определенном количестве срезов. Отдельно учитывают общее число клеток на этих же срезах. Определяют отношение среднего числа митозов к среднему числу клеток в одном срезе и умножают на 1000. В результате такого вычисления митотический индекс (МИ) выражают в промилле (‰).

Митотический индекс определяют по формуле:

$$MI = \frac{(II + M + A + T)}{I + II + M + A + T} \cdot 1000, \text{‰}$$

где II – число клеток в профазе, M – в метафазе, A – в анафазе, T – в телофазе, I – в интерфазе.

Материалом являются клетки меристемы корешков *Allium* сера L (лука репчатого).



*Рис.8.1. Схематическое изображение апикальной части корня:*

- 1- инициальные клетки, 2- пролиферирующий пул меристемы, 3- зона растяжения,*
- 4- корневой чехлик, 5- центр покоя*

На рис. 8.1. представлена многокомпонентная блок-схема клеточной популяции меристемы. Меристема апикальной части корня обладает более простой по сравнению с апексом побега организацией и определенными преимуществами при исследовании кинетики клеток отдельных субпопуляций. В ней можно выделить следующие типы клеток и зоны: основная - это инициальная зона, состоящая из ювенильных, способных к неопределенно долгому активному делению клеток. Это типично ствольные клетки.

Меристемы различных видов растений измеряются несколькими десятками и даже сотнями инициальных клеток, образующих один или несколько слоев. Делясь вверх по направлению к стеблю, инициальные клетки образуют собственно меристему. Разделившись 5-7 раз, они переходят в зону растяжения, где, увеличиваясь в длину в несколько раз (иногда в 10-15 раз), переходят в функциональный пул зоны дифференциации и специализации.

Клетки меристем делятся асинхронно, поэтому в любой момент времени имеются клетки, находящиеся во всех фазах митотического цикла, а, следовательно, неустойчивы к повреждающим воздействиям. При воздействии мутагенами клетки временно или постоянно теряют способность к делению.

Следствием этого является опустошение меристемы, которое подчиняется экспоненциальной зависимости и состоит в уходе в зону растяжения большего, чем в норме, количества клеток на фоне снижения или полного прекращения клеточного воспроизводства.

Для определения митотического индекса пригодны не только микротомные срезы, но и давленные препараты. В последнем случае кончик корня растения с зоной деления клеток после фиксации, мацерации и окраски накрывают покровным стеклом, раздавливают на предметном стекле так, чтобы клетки расположились в один слой, и рассматривают под микроскопом с большим увеличением.

Для определения относительной длительности каждой фазы митоза можно воспользоваться такой формулой (например, для профазы)

$$П = \frac{П \cdot 1000}{П + М + А + Т}, \%,$$

где П – число клеток в профазе, М – в метафазе, А – в анафазе, Т – в телофазе, И – в интерфазе.

До проведения подсчетов нужно научиться отличать клетки, находящиеся на разных фазах митоза, от неделящихся клеток и клетки зоны деления от клеток других зон по форме и величине.

**Задание:**

1. Зафиксировать корни лука в уксусном спирте (3 части этилового спирта и 1 часть уксусной кислоты), окрасить в ацетокармине, приготовить давленные препараты и определить митотический индекс. Результаты записать в виде формы 8.1.

Форма 8.1

№ поля зрения под микроскопом	Число клеток в				
	П	М	А	Т	И

2. Зарисовать фазы митоза с препарата.

3. По полученным данным рассчитать митотический индекс и ИТФ. Данные занести в таблицу 8.1.

Таблица 8.1

Митотический индекс корневой меристемы *Allium* сера L, обработанной сульфатным раствором

№ п/п	Концентрация SO <sub>2</sub> мг/м <sup>3</sup>	Число клеток						МІ	ИТФ
		П	М	А	Т	И	Всего клеток		
1	Контроль (0)	89	2	4	1	93	189		
2	1	-	-	-	-	-	-		
3	0,75	6	2	4	4	158	174		
4	0,5	46	6	4	4	132	192		
5	0,25	65	4	4	2	118	193		
6	0,125	79	3	3	1	110	196		
7	0,025	86	3	2	2	92	185		

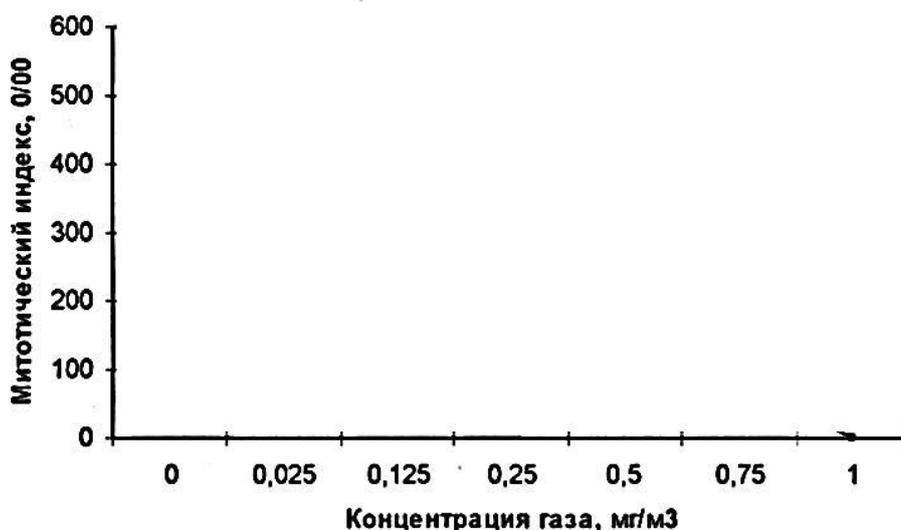


Рис. 8.2. Динамика митотической активности в зависимости от концентрации оксидов серы

#### 4. Сделать вывод о токсичности фактора

ИТФ	Токсичность
< 0,5	Сверхвысокая
0,5-0,65	высокая
0,65 – 0,8	средняя
0,8 – 0,9	низкая
> 0,9	норма

### Опыт 2. Микроядерный тест [5]

Микроядерный тест заключается в количественной регистрации микроядер в растительных клетках.

Достоинство этого метода состоит в том, что он позволяет проводить оценку уровня хромосомных нарушений по анализу интерфазного ядра, т.е. не требует наличия клеток в митозе. Частота встречаемости клеток в интерфазе во много раз выше, чем в митозе. Это дает возможность увеличить выборку числа клеток. Микроядерный тест основан на подсчете клеток с микроядрами, которые представляют собой автономно существующие ацентрические фрагменты хромосом, возникающие в результате хромосомных aberrаций. Микроядро обычно расположено в виде спутника вблизи основного ядра. Подсчет клеток с микроядрами проводится на временных ацетокарминовых препаратах, окрашенных по Фельгину.

#### Задание

1. Приготовить давленные препараты меристемы корешков *Allium cepa*. Окраска ацетокармином.

2. Подсчитать на 10 полях зрения общее число клеток и клеток с микроядрами.

3. Результаты занести в таблицу по форме 8.2.

Форма 8.2

№ образца	Число клеток всего	Число клеток с микроядрами	% клеток с микроядрами	ИТФ	Токсичность
1					
2					
3					
4					
Контроль					

**Ответить на следующие вопросы:**

1. Следствием каких процессов является образование в клетке микроядер?

2. О чем говорит наличие клеток с микроядрами?

3. Какой вывод можно сделать на основании микроядерного теста?

### **Задание на самостоятельную проработку**

Ответить письменно на вопросы:

1. Перечислить популяции клеток в пределах ткани.

2. В чем состоит генетическая роль митоза?

3. Перечислить фазы митоза.

4. Дать определение митотической активности ткани.

5. В каких единицах выражается митотический индекс?

## **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9**

### **Определение острой токсичности воды по хемотаксической реакции инфузорий *Paramecium caudatum* [4]**

**Цель работы:** определение токсичности почвенных вытяжек по хемотаксической реакции инфузорий *Paramecium caudatum*

**Принцип метода:**

Метод определения токсичности вод основан на способности тест-объектов реагировать на присутствие в водных вытяжках из почвы и донных осадков веществ, представляющих опасность для их жизнедеятельности, и направленно перемещаться по градиенту концентраций (в направлении изменения концентраций) этих веществ (хемотаксическая реакция), избегая их вредного воздействия [4].

Хемотаксическая реакция реализуется при условии наличия стабильного во времени градиента концентраций химических веществ. Подобный градиент создается путем наложения в вертикальной кювете (пробирке) на взвесь инфу-

зорий в загустителе испытуемой жидкости. При этом в измерительной кювете образуется стабильная граница раздела, сохраняемая в течение всего времени биотестирования. Эта граница не препятствует свободному перемещению инфузорий в предпочтительном для них направлении и при этом предотвращает перемешивание жидкостей из нижней и верхней зон. После создания в кювете двух зон в течение 30 минут происходит перераспределение инфузорий по зонам. Важная особенность поведенческой реакции инфузорий – массовое перемещение организмов в верхние слои жидкости. В случае, если исследуемая проба не содержит токсических веществ, в кювете будет наблюдаться концентрирование клеток инфузорий в верхней зоне. Наличие в исследуемой пробе токсических веществ приводит к иному характеру перераспределения инфузорий в кювете, а именно: чем выше токсичность пробы, тем меньшая доля инфузорий перемещается в верхнюю зону (исследуемую пробу) [4].

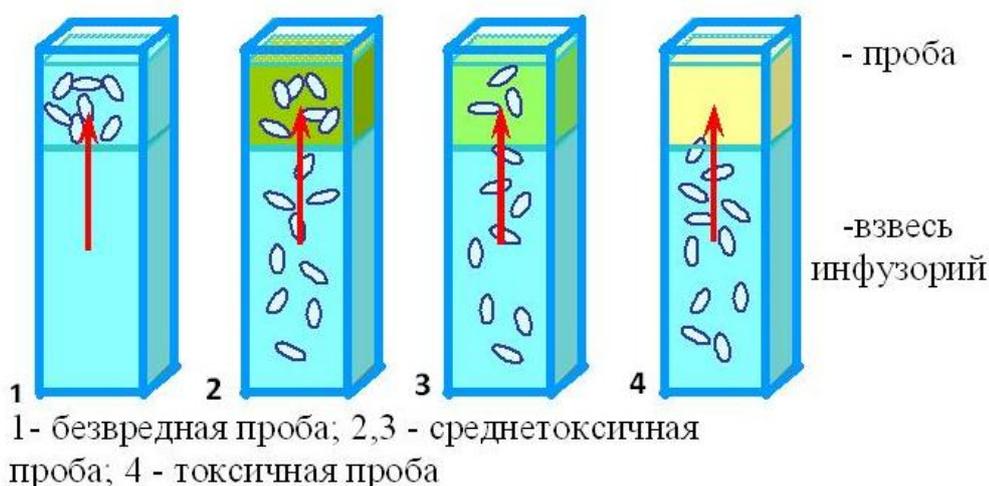


Рисунок 9.1 – Биотестовая хемотаксическая методика

Критерием токсического действия является значимое различие в числе клеток инфузорий, наблюдаемых в верхней зоне кюветы в пробе, не содержащей токсических веществ (контроль), по сравнению с этим показателем, наблюдаемым в исследуемой пробе (опыт).

Количественная оценка параметра тест-реакции, характеризующего токсическое действие, производится путем расчета соотношения числа клеток инфузорий, наблюдаемых в контрольной и исследуемой пробах, и выражается в виде безразмерной величины – индекса токсичности (Т).

### Характеристика тест-объекта:

В качестве тест-объекта используется *Paramecium caudatum* – инфузория туфелька. Относится к подцарству простейших (одноклеточных животных) – *Protozoa*, типу – *Ciliophora*. Инфузория туфелька широко распространена в пресных водоемах. Форма клетки эллипсоидная, размеры – 200 x 40 мкм. Основную пищу инфузории составляют бактерии, дрожжи и т.п. Размножение

инфузории происходит путем поперечного деления клетки. В зависимости от условий выращивания время генерации может составлять от нескольких часов до нескольких суток.

По сравнению с другими группами простейших инфузории имеют наиболее сложное строение и отличаются разнообразием функций. Инфузория находится в непрерывном движении. Скорость ее при комнатной температуре – 2,0–2,5 мм/с. Траектория движения сложная: она движется вперед, вращаясь вдоль продольной оси тела с помощью ресничек, количество которых достигает 10–15 тысяч. Изменение внешних условий (температура, химический состав среды и другие факторы) воспринимается клеткой, и первая ответная реакция – изменение характера движения: уменьшение или увеличение скорости, частоты остановок и разворотов, разнообразные таксисы, например, гео-, магнито-, аэро-, хемотаксис.

**Реактивы:** вода дистиллированная, натрий хлористый, калий хлористый, кальций хлористый 2-водный, натрий углекислый кислый, медь сернокислая 5-водная, магний сернокислый 7-водный, поливиниловый спирт [4].

### **Растворы:**

1. Среда Лозина-Лозинского, в дальнейшем Л-Л

Для приготовления концентрата среды Л-Л в 1 дм<sup>3</sup> воды растворяют следующие соли: NaCl – 1,0 г, KCl – 0,1г, MgSO<sub>4</sub> – 0,1 г, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O – 0,1 г, NaHCO<sub>3</sub> – 0,2 г. Такой раствор можно хранить в холодильнике до 7 суток. Для работы используется среда Л-Л, полученная десятикратным разбавлением водой исходного концентрата. Разбавленная среда Л-Л не хранится. Разбавляющая среда и среда для культивирования должны быть идентичны и обеспечивать выживаемость инфузории в течение 5 суток.

2. Модельный токсикант на основе меди сернокислой.

Навеску пятиводной сернокислой меди 10 мг растворяют в дистиллированной воде, доводят объем до 1 дм<sup>3</sup>. Раствор хранится 7 дней. Рабочие концентрации меди сернокислой готовят в день проведения анализа разбавлением концентрата, причем растворы с концентрациями до 1 мг/дм<sup>3</sup> готовят разбавлением дистиллированной водой, а с концентрациями 0,1 мг/дм<sup>3</sup> и меньше – средой Л-Л.

3. Раствор ПВС в среде Л-Л: 5%-ный раствор используют в качестве нейтрального загустителя.

Для приготовления раствора ПВС 0,5 г порошка ПВС смешивают с 9,5 см<sup>3</sup> среды Л-Л. Смесь нагревают на водяной бане до растворения порошка. Используют раствор в течение суток.

### **Заполнение кювет:**

В кювету вносят 2,0 см<sup>3</sup> взвеси инфузорий в рабочей концентрации (культуру получить у преподавателя), предварительно проверенной по двум параметрам: по чувствительности к модельному токсиканту (раствор 2) и по

характеру выхода в разбавляющую среду (раствор 1). К взвеси добавляют  $0,35 \text{ см}^3$  5%-го раствора ПВС, все тщательно перемешивают, непременно увлажнив стенки кюветы, и наслаивают (например, пипеткой)  $1,6 \text{ см}^3$  анализируемой жидкости, не допуская перемешивания с нижним слоем. Через 30 мин (продолжительность тест-реакции) последовательно производят определение концентрации инфузорий в верхней зоне кюветы в контрольных ( $I_k$ ) и опытных ( $I_{оп}$ ) пробах. Контрольные и опытные пробы готовят одновременно.

### **Измерение концентрации инфузорий на приборе “БИОТЕСТЕР”[4]**

Подготовленные кюветы последовательно помещают в кюветный модуль и снимают показания прибора.

*Работа с прибором:*

а) установить режим усреднения “1” (горит индикатор над кнопкой, соседние индикаторы погашены);

б) вставить кювету в кюветную нишу, закрыть крышку, нажать кнопку “ПУСК”;

в) индикация гаснет, на 14 с (время автоподстройки) загорается индикатор “ОТСЧЕТ”, и еще через 20 с на индикационном табло появляется первое значение концентрации в условных единицах. Выдача отсчета сопровождается световым и звуковым сигналом продолжительностью 2 с;

г) в течение 24 с значение предыдущего отсчета сохраняется. Очередные отсчеты появляются с тем же интервалом.

Если концентрация токсикантов настолько велика, что инфузории практически не выходят в пробу (показания прибора в условных единицах находятся в пределах 0,00–0,08), то начинает мигать индикатор “ТРЕВОГА”. Это означает, что анализируемую пробу необходимо разбавить до получения на приборе значимых величин. (Не забудьте скорректировать полученные значения в соответствии со степенью разбавления исходной пробы). Такая же ситуация возникает из-за высокой окрашенности или мутности пробы, что может быть причиной слишком малой светопрозрачности. Для уменьшения указанного влияния исходная проба может быть профильтрована через бумажный фильтр (белая лента). Если этого недостаточно, то пробу следует разбавить средой Л-Л и полученное значение индекса токсичности скорректировать в соответствии со степенью разбавления.

Последовательность операций при использовании других режимов измерений идентична вышеописанной. Контрольные и анализируемые пробы делают в трех повторностях и по усредненным результатам рассчитывают индекс токсичности.

Оценку токсичности пробы производят по относительной разнице количества клеток в верхних зонах кювет в контрольной и анализируемой пробе.

Индекс токсичности определяется как:

$$T = \frac{I_{\text{ср.к}} - I_{\text{ср.оп.}}}{I_{\text{ср.к}}} K,$$

где  $I_{\text{ср.к}}$ ,  $I_{\text{ср.оп.}}$  – средние показания прибора для контрольных и анализируемых проб соответственно,  $K$  – коэффициент разбавления пробы.

Индекс токсичности  $T$  – величина безразмерная и может принимать значения от 0 до 1 в соответствии со степенью токсичности анализируемой пробы.

По величине индекса анализируемые пробы классифицируются по степени их токсичности на 3 группы:

**I.** Допустимая степень токсичности ( $0,00 < T \leq 0,40$ ).

**II.** Умеренная степень токсичности ( $0,40 < T \leq 0,70$ ).

**III.** Высокая степень токсичности ( $T > 0,70$ ).

В случае очень токсичных проб, когда  $T$  принимает значение 1 (т.е. когда в верхней зоне кюветы с анализируемой пробой подвижные инфузории не обнаруживаются), индекс токсичности не может однозначно характеризовать истинный уровень токсичности пробы. Пробу следует разбавить до такой степени, чтобы значение индекса токсичности не достигало 1, и полученное значение  $T$  умножить на коэффициент разбавления. Степень разбавления пробы до уровня нетоксичности, например, при определении класса опасности или сбросе сточных вод, оценивается по выполнению условия  $T \leq 0,40$ .

Некоторые пробы могут содержать безопасные, но привлекательные для инфузорий вещества. В таких случаях значения  $I_{\text{ср.оп.}}$  могут даже несколько превышать  $I_{\text{ср.к}}$ . Полученные при формальном расчете отрицательные значения индекса токсичности  $T$  свидетельствуют об отсутствии токсичности и могут быть оценены как нулевые при условии выполнения нормативов приемлемости результата.

Оперативный контроль сходимости проводится при анализе каждой рабочей пробы.

Сходимость результатов параллельных определений признают удовлетворительной, если выполняется следующее условие:

$$|T - T_{\text{max, min}}| \leq r,$$

где  $r$  – норматив оперативного контроля сходимости ( $r = 0,43 T$ );

$T_{\text{max}}$  – максимальное значение индекса токсичности пробы трех параллельных определений;

$T_{\text{min}}$  – минимальное значение индекса токсичности пробы трех параллельных определений.

При превышении норматива оперативного контроля сходимости эксперимент повторяют. При повторном превышении указанного норматива выяс-

няют причины, приводящие к неудовлетворительным результатам контроля, и устраняют их. Проводят дополнительную проверку чувствительности инфузоров к модельному токсиканту.

Для исключения грубых ошибок рекомендуется оперативно оценивать приемлемость «контроля» по условию  $|I_{k_{\max}} - I_{k_{\min}}| \leq 0,2 I_{\text{ср.к.}}$ .

### **Задание**

1. Определить токсичность почвенных вытяжек, занести данные в протокол (приложение).
2. Произвести математическую обработку результатов анализа.
3. Представить данные в виде таблиц, графиков и диаграмм.
4. Сделать вывод о токсичности представленного материала.

## **МАТЕМАТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ**

Все числа, получаемые при измерениях, являются приближенными. Точность измерений нельзя повысить математическими действиями над полученными результатами измерений. Учет большого числа значащих цифр без оценки их достоверности затрудняет вычисления и оказывается бесполезным.

В качестве истинного, наиболее вероятного значения измеряемой величины обычно принимают среднее арифметическое измеренных значений:

$$\langle x \rangle = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}, \quad (1)$$

где  $x_1, x_2, \dots, x_n$  – значения измеренной величины;  $n$  – число измерений.

После расчета среднего арифметического значения измеряемой величины приступают к определению абсолютной и относительной ошибок измерений.

Абсолютное значение разности между средним арифметическим  $\langle x \rangle$  и каждым из отдельных результатов измерений называется абсолютной ошибкой отдельного измерения и обозначается

$$\Delta x_i = |\langle x \rangle - x_i|.$$

Часто среднюю абсолютную ошибку определяют как среднее арифметическое абсолютных ошибок отдельных измерений, т. е.

$$\langle \Delta x_i \rangle = \frac{|\Delta x_1| + |\Delta x_2| + \dots + |\Delta x_n|}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n |\Delta x_i|}{n}.$$

Абсолютная ошибка указывает два значения измеряемой величины, между которыми заключено ее истинное значение. Например, в результате измерений и последующих вычислений диаметра проволоки получили:

$$\langle d \rangle = 2,4 \text{ мм и } \langle \Delta d_i \rangle = \pm 0,1 \text{ мм.}$$

Это означает, что истинное значение диаметра проволоки находится в интервале между 2,3 и 2,5 мм.

Можно уменьшить абсолютную ошибку и, следовательно, уменьшить интервал, в котором находится истинное значение измеряемой величины, но абсолютная ошибка не может быть равной нулю.

Для полной характеристики точности измерений рассчитывают относительную ошибку, равную отношению средней абсолютной ошибки к среднему результату измерений:

$$E = \frac{\langle \Delta x_i \rangle}{\langle x \rangle}.$$

Если выполнено достаточно большое число измерений и результаты подчиняются закону статистического распределения, то вместо средней абсолютной ошибки определяется средняя квадратичная ошибка

$$S = \sqrt{\sum_{i=1}^n (\Delta x_i)^2 / n(n-1)}.$$

Относительная ошибка в данном случае

$$E_s = \frac{S}{\langle x \rangle}.$$

Относительная ошибка – безразмерная величина. Ее часто выражают в процентах, для чего безразмерную величину надо умножить на 100%.

Если необходимо учитывать как приборную ( $\delta$ ), так и случайную ( $S_x$ ) ошибки, то полная абсолютная ошибка среднего значения измеренной величины

$$\Delta_{\langle x \rangle} = \sqrt{\delta^2 + S_{\langle x \rangle}^2}.$$

Если одна из данных ошибок меньше другой в 4 и более раз, то ее в окончательном результате можно не учитывать.

Для косвенных измерений, когда определяемая величина получается путем вычислений по известной формуле, ошибки в простейших случаях находят следующим образом.

Если определяемая величина  $A$  связана с непосредственно измеряемыми величинами  $B$  и  $C$  выражением

$$A = BC,$$

то относительная ошибка величины  $A$  равна сумме относительных ошибок величин  $B$  и  $C$ , т. е.

$$E = \frac{\Delta B}{B} + \frac{\Delta C}{C},$$

а абсолютная ошибка

$$\Delta A = EA.$$

Относительные ошибки складываются и при делении двух измеряемых величин.

Если же определяемая величина  $A$  равна сумме или разности измеряемых величин  $B$  и  $C$ , т. е. если

$$A = B \pm C,$$

то абсолютная ошибка  $A$  равна сумме абсолютных ошибок  $B$  и  $C$ :

$$\Delta A = \Delta B + \Delta C.$$

Относительная ошибка в данном случае

$$E = \Delta A/A.$$

Окончательный результат измерений обычно записывают в стандартной форме, удобной для анализа:

- вначале записывают название определяемой физической величины;
- затем пишется буквенный символ определяемой величины, знак равенства и в скобках ее среднее значение плюс-минус средняя абсолютная ошибка, а за скобкой указывается единица измерения;
- отдельно записывают значение относительной ошибки в процентах;
- окончательные результаты заключаются в общую рамку.

Среднее значение, полная абсолютная ошибка и относительная ошибка округляются по следующим правилам:

- вначале округляют до одной или двух значащих цифр среднюю абсолютную ошибку (если старшая цифра больше 4, оставляют одну значащую цифру, в остальных случаях – две);
- затем округляют среднее значение до разряда, совпадающего с младшим разрядом абсолютной ошибки;
- относительную ошибку записывают в % с точностью до двух значащих цифр.

Например, запись окончательного результата определения объема цилиндрического тела имеет вид:

<p><i>Объем цилиндрического тела</i></p> $V=(10,43\pm 0,25) \text{ см}^3$ $E=2,4\%$
---

При совпадении двух результатов, т. е. при установлении их равенства, когда указаны полные абсолютные ошибки, удобно пользоваться следующим правилом определения наличия систематической ошибки: если модуль разности средних значений двух измеренных величин не превышает суммы их абсолютных ошибок, сравниваемые величины можно считать равными или совпадающими в пределах ошибок измерений. В противном случае данные величины считаются неравными или несовпадающими. При таком сравнении в пределах указанных ошибок, если измеренная величина не совпадает, например, с табличной (более точной), можно говорить о наличии в измерениях систематической ошибки.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

\_\_\_\_\_ (название Министерства, ведомства, если необходимо)

\_\_\_\_\_ (название организации, структурным подразделением которой является лаборатория, если необходимо)

\_\_\_\_\_ (название лаборатории, аттестованной на право проведения измерений; аттестат аккредитации № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_)

\_\_\_\_\_ (адрес лаборатории, телефон, факс)

Протокол № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

Наименование объекта \_\_\_\_\_

Биотестируемая среда \_\_\_\_\_

Условия отбора и транспортировки проб \_\_\_\_\_

Дата доставки проб \_\_\_\_\_

Используемая МВИ \_\_\_\_\_

№ пп	Тип измерения	Показания прибора, I, у.е.	Среднее значение показаний	Индекс токсичности, T, у.е.	Среднее значение T <sub>ср</sub>	Комментарий
1	Контроль, среда Л-Л					
2	Проба 1					
3	Проба 2					
4	Проба 3					

Биотестирование выполнил(а)

\_\_\_\_\_ (подпись) \_\_\_\_\_ (расшифровка подписи)

Заведующий лабораторией

\_\_\_\_\_ (подпись) \_\_\_\_\_ (расшифровка подписи)

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / О.П. Мелехова, Е.И. Сарапульцева, Т.И. Евсеева и др; под ред. О.П. Мелеховой и Е.И. Сарапульцевой. – 2-е изд., испр. – Москва: Академия, 2008. – 288 с.
2. Дмитриев, В.В. Экологическое нормирование и устойчивость природных систем: учеб. пособие / В.В. Дмитриев, Т.Г. Фруммин. – Санкт-Петербург: Наука, 2004. – 294 с.
3. Паушева, З.П. Практикум по цитологии растений / З.П. Паушева. – 3-е изд., перераб. и доп. – Москва: Колос, 1980. – 304 с.
4. ПНД ФТ 16.2:2.2-98 Методика определения токсичности проб почв, донных отложений и осадков сточных вод экспресс-методом с применением прибора серии «Биотестер». – Санкт-Петербург: ООО «Спектр-М», 2015. – 22 с.
5. Тихановская, Г. А. Биологический контроль окружающей среды: [учебное пособие для экологических специальностей и направлений бакалавриата] / Г. А. Тихановская, Л. Г. Рувинова. – Вологда: ВоГТУ, 2012. – 63, [1] с.: ил.
6. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии / Ф.Х. Хазиев. – Москва: Наука, 2005. – 252 с.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	3
Лабораторная работа № 1. Биодиагностика почв по ферментативной активности .....	3
Опыт 1. Определение каталазной активности .....	4
Опыт 2. Определение дегидрогеназной активности .....	5
Опыт 3. Определение инвертазной активности .....	5
Опыт 4. Определение уреазной активности .....	6
Лабораторная работа № 2. Определение числа aberrаций хромосом в клетках корневой меристемы растений под действием мутагенов .....	8
Лабораторная работа № 3. Влияние внешних условий на интенсивность фотосинтеза .....	10
Лабораторная работа № 4. Определение интенсивности дыхания по количеству выделенной углекислоты .....	12
Лабораторная работа № 5. Использование микрогаметофитного поколения <i>Tussilago Farfara</i> для биоиндикации окружающей среды .....	14
Лабораторная работа № 6. Анализ хода мейоза при микроспорогенезе <i>Tussilago Farfara</i> в районе автомагистрали .....	18
Лабораторная работа № 7. Сравнительная характеристика экологического состояния промышленных и сельскохозяйственных зон на основе методов биомониторинга .....	20
Лабораторная работа № 8. Цитогенетический анализ корневой меристемы <i>Allium cepa</i> .....	25
Опыт 1. Митотическая активность и митотический индекс как показатель генотоксичности среды .....	25
Опыт 2. Микроядерный тест .....	28
Лабораторная работа № 9. Изменение спонтанной двигательной активности инфузории <i>Paramecium caudatum</i> под влиянием антропогенных факторов .....	29
МАТЕМАТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ .....	34
ПРИЛОЖЕНИЕ .....	37
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК .....	38

# БИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Методические указания к выполнению лабораторных работ

Оригинал-макет – О.М. Ванчугова

---

Подписано в печать 21.12.2015 г. Формат 60 × 84/16.

Усл. п. л. 2,5. Тираж      экз. Заказ №      .

---

РИО ВоГУ. 160000, г. Вологда, ул. С. Орлова, 6.