**Практична робота 9**

***Основні принципи проведення біоіндикації за допомогою живих організмів***

**Теоретичні відомості**

Останнім часом все більшого значення набуває наявність інформації про стан і рівні забруднення не тільки складових довкілля, але й стан біоти, тобто всіх живих організмів біосфери. При цьому важливо знати характер та інтенсивність відповідних реакцій біологічних об'єктів на антропогенні впливи. Одним з найбільш оперативних методів отримання такої інформації є методи біотичного моніторингу, зокрема, за допомогою певних видів рослин, тобто методами *біоіндикації та біотестування.*

Відомо, що вищі і нижчі рослини можуть використовуватися як біоіндикатори забруднення в двох випадках:

а) якщо вони *накопичують* у своїх тканинах ЗР у набагато більш високих концентраціях, ніж відповідні концентрації в геологічному середовищі;

б) якщо їхня *чутливість* до впливу визначених ЗР різко відрізняється від чутливості інших рослин.

У випадку впливу високої концентрації ЗР протягом короткого періоду часу можливе сильне (*гостре*) ушкодження рослини. У результаті загибелі тканини (некрозу) її колір змінюється від металево-сірого до коричневого, а в процесі старіння вона може знебарвлюватися і вигорати.

*Хронічне* ушкодження рослин виникає при впливі низьких концентрацій ЗР протягом тривалого періоду часу. До ознак хронічного ушкодження відносять бронзове фарбування листів, хлороз і їхнє передчасне старіння.

У природі часто зустрічається як хронічне, так і гостре ушкодження тієї ж самої рослини. Ознаки ушкоджень рослин виявлені й описані у рослин, які вирощені у природних умовах при відомих концентраціях ЗР. Потім ці ознаки були підтверджені в лабораторних умовах на рослинах, що піддавалися дії тих самих ЗР.

*Рослина-індикатор* – це така рослина, у якої ознаки ушкодження з'являються при впливі на неї фітотоксичної концентрації однієї ЗР чи суміші ЗР.

Для моніторингу важлива не тільки якісна, але і кількісна оцінка. Тому метою біомоніторингу є перетворення рослини-індикатора в рослину-монітор. Індикаторами можуть бути ті рослини, що акумулюють у тканинах забруднювальну речовину або продукти метаболізму (обміну речовин), які отримані в результаті взаємодії рослини і ЗР.

*Основні забруднювальні речовини, що діють на рослину через повітря.* Ушкодження рослин-індикаторів різними ЗР систематизовані в таблиці 3.2.

До *фотохімічних оксидантів* (речовин, для початку реакції спонтанного утворення і взаємодії яких необхідне сонячне світло) відносять: озон, пероксіацетилнітрат (ПАН) і оксиди азоту (*NO2, NO, N2O* і т. ін.). Озон потрапляє в рослини через устячка в процесі звичайного газообміну між рослинами і навколишнім середовищем. Ушкодження добре помітні на старих листах, головним чином, на верхній поверхні листа. Загальна ознака ушкодження озоном – плямистість.

*ПАН* також проникає в листи через устячка, у результаті чого на внутрішній стороні листів виникають водянисті плями, що потім стають глянсовими, сріблистими чи бронзовими.

*Оксиди азоту (NOx).* Для сильного ушкодження рослини оксидами азоту необхідна більш висока концентрація *NOx*; часто його вмісту у

повітрі не досить для гострого ушкодження. Низькі концентрації *NOx* навіть стимулюють зростання рослин, а їхня зелень стає більш темною.

*Діоксид сірки (SO2)* потрапляє в рослину й окислюється до високотоксичного сульфіту *SO3*, а потім повільно – в менш токсичний сульфат SO4. У результаті дії *SO2* на широколистові рослини їхні листки знебарвлюються між жилками (ефект «ялинки»).

*Таблиця 3.2* – Ушкодження рослин від різних шкідливих речовин

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **ЗР** | **Ушкодження** | **Рослина-індикатор** |
| О3 | Плями металевого кольору; рудувато-білі плями; жовто-червоні кінчики голок; хлороз | Шпинат, картопля, тютюн, виноград, огірок, цибуля, хвойні, ясен, квасоля, іпомея |
| ПАН | Водянисті, потім глянсові, сріблясті, бронзові плями; хлоротичні смуги на листах | Салат, квасоля, петунія, злакові, узколистні трави |
| *NОx* | Уповільнення росту і нагромадження сухої речовини Знебарвлення країв листів | Молоді томати, барвінок |
| *SO2* | Біфаціальне знебарвлення між жилками, ефект «ялинки» | Ожина, малина, виноград, овес, береза вишнева, конюшина, ясен американський, ревінь, капуста, шпинат, тютюн, яблуня, персик |
| *SO42-* | Червоно-бурий колір, хлороз | Сосна, ялина |
| *NO2 + SO2* | Зниження врожайності злаків і пасовищних трав | Овес, соєві боби, тютюн |
| *O3 + SO2* | Хлороз | Люцерна, капуста, квасоля, соя, шпинат, тютюн, томати |
| Фториди | Хлороз уздовж жилок або листів; гострий некроз по краях листів і деформація; обпалені верхівки | Гладіолус, тюльпан, ірис, лілія, хвойні |
| NH3 | Тьмяно-зелені, бурі, чорні листи, глянець на нижній стороні листа | Яблуня |
| B | Крайовий і міжжилавий некроз, плямистість листів, чашоподібна форма і деформація листів | Горіх сірий, жимолость, клен, шовковиця, дикий виноград |
| Cl2 | Знебарвлення листів по краях від чорного до білого, міжжилавий некроз (SO2), цяточки (O3) | Гірчиця, соняшник Хвойні |
| Етилен, пропилен | Сповільнює зростання; погіршення цвітіння, плодоносіння, «скручує» листи | Орхідеї, томати, хризантеми (у теплицях) |
| HCl | Міжжилавий і крайовий хлороз, некроз | Слива |

*Другорядні ЗР*: фториди (джерело – плавильні заводи та інші підприємства подібного профілю), аміак (джерело – аварії на виробництві, втрати з трубопроводів), бор (джерело – виробництво скловолокна, печей і

рефрижераторів), хлор (джерело – целюлозно-паперове виробництво, при використанні як окислювача, аварії при транспортуванні), етилен і пропілен (містяться у вихлопах автотранспорту, є природним рослинним гормоном, що утворюється при ушкодженні рослин іншими ЗР), соляна кислота.

*Тверді частки і важкі метали.* Вони можуть осідати на рослини, засмічувати і проникати в устячка, негативно впливати на запилення квітів, розмір і стан листів через вплив на *рН* ґрунту, впливати на склад лісових насаджень. Найчастіше ВМ зустрічаються у вигляді твердих часток, адсорбованих на інших частках, або у вигляді солей. З атмосфери вони осідають на рослини чи ґрунт. ВМ, що осідають на поверхні ґрунту, мають тенденцію накопичуватися в її верхніх шарах. Концентрація ВМ у ґрунті залежить від вмісту в ній глини й органічної речовини. У цілому ж ВМ стійкі до вилуджування і розпаду. При тривалому впливі концентрація їх збільшується і може стати токсичною.

*Свинець* найбільш розповсюджений ВМ, який часто зустрічається в повітрі і ґрунті. Природне джерело надходження свинцю – вивітрювання гірських порід. При виплавленні 1 т свинцю в атмосферу викидається до 25 кг *Рb*. Гумусовий шар ґрунту добре адсорбує *Рb*, який потім накопичується в ґрунті і локалізується в пухирцях диктиосом, відкладається в клітинній оболонці.

*Ртуть* – єдиний ВМ, що знаходиться в рідкому стані при нормальній температурі, один із найнебезпечніших канцерогенів. Природне джерело – вивітрювання гірських порід – близько 800 т. Нормально розвинуті ґрунти мають високу сорбційну здатність, і вимивання *Hg* з них незначне. Випаровування *Hg* з ґрунту зменшується зі збільшенням вологості ґрунту, кислотності ґрунту і зі зменшенням гумусу. *Hg* негативно впливає на більшість рослин, особливо на троянди. На їхніх листах з'являються бурі плями, листи жовтіють, а потім обпадають.

*Миш'як* (відходи медичної і металургійної промисловості, виробництво добрив, згоряння вугілля). Міграція *As* в ґрунті відбувається більш інтенсивно, якщо він надходить у великих кількостях.

*Кадмій – Cd* **(**результат згоряння дизельного палива, при плавленні руд і внесенні добрив). Максимальна адсорбція *Cd* відбувається в ґрунті з більшою ємністю поглинання, значним вмістом гумусу, високим показником *рН.*

*Цинк – Zn* (відходи металургійного виробництва) більш мобільний, ніж свинець і кадмій. Висока міграція в еродованих ґрунтах в умовах підвищеної вологості. За наявними даними *Zn, Cd* і *Cu* викликають міжжилавий хлороз з наступним почервонінням і пожовтінням листів дерев поблизу джерела в середині літа.

Для біоіндикації ВМ використовують, в основному, мохи і лишайники, що абсорбують ВМ з повітря і атмосферних опадів. Мохи є кращими індикаторами. У Швеції, Фінляндії, Норвегії складені карти, що показують регіональні розходження у випаданні *Cd, Сu, Fе, Нg, Ni, Pb* і *Zn* з атмосфери за результатами аналізу мохів. Концентрація *Рb* у мохах збільшується при випаданні атмосферних опадів, зменшується зі збільшенням відстані від доріг і міст. Різні види мохів по-різному реагують на вміст того чи іншого ВМ. Сфагновий мох добре абсорбує *Сd, Pb* і *Zn*, інші види – накопичують *Нg*. Бородатий мох (Мексиканська затока) є активним акумулятором *Рb*.

Для біоіндикації можна вибрати недовговічні трав'янисті чи деревинні рослини і висадити їх на потрібних ділянках. Дерева будуть рости і довго бути індикаторами без особливого догляду.

Існує три способи одержати кількісну характеристику стану повітря через реакцію рослини на забруднення:

1. зіставити ступінь викликаного ЗР ушкодження з відомою концентрацією ЗР в навколишньому середовищі;
2. використовувати рослину як живий колектор (пробовідбірник);
3. виміряти кількість ЗР або зв'язаного з нею метаболіту і співвіднести отримане значення з концентрацією ЗР у повітрі і ґрунті.

Для мінімізації помилок необхідно використовувати ту саму ґрунтову суміш і насіння з одного джерела. Варто брати рослини, що легко вирощувати і доглядати, стійкі до хвороб і шкідників.

Будуються криві «доза-відповідна реакція» (наприклад, певний сорт моху – важкі метали, тютюн – *О3*)*.*

Ступінь ураження листів трав'янистих рослин (боби, тютюн), зазвичай, вимірюють візуально шляхом визначення площі (у *%)* ураженої листової поверхні (табл. 3.3, 3.4). Квасолю можна використовувати до появи трилопатевих листів 3-го порядку. Сумарні підрахунки можна проводити через кожні 3-5 днів.

*Таблиця 3.3 –* Оцінка реакції садової квасолі на вплив озону

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Оцінка ушкодження (зернистість або опік)** | **Індекс ступеня ушкодження** | **Кількість****ушкоджених****листів, %** |
| 1 | 2 | 3 |
| Немає | 0 | 0 |
| Слабке | 1 | 1-25 |
| Помірне | 2 | 26-50 |
| Помірно-сильне | 3 | 51-75 |
| Сильне | 4 | 76-99 |
| Повне | 5 | 100 |

*Таблиця 3.4 –* Оцінка реакції первинних листків

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Дні від висіву** | **Індекс ступеня ушкодження** | **Кількість ушкоджених листів, %** |
| 7 | 0 | 0 |
| 11 | 1 | 15 |
| 15 | 2 | 40 (+25) |
| 20 | 4 | 80 (+40) |

Для *хвойних рослин* характеристикою відповідної реакції є: довжина хвої, колір, форма, вік хвої, кількість ушкоджених хвоїнок на гілці (у %).

Можна відповідну реакцію визначати за *показниками росту і продуктивності*: швидкість росту, площа листової поверхні, кількість листів, дата формування бруньки, дата початку цвітіння, співвідношення кількості бруньок і квіток, квіток і плодів, кількість насінин на плід, співвідношення паростків і коренів, загальний вихід чи біомаса.

*Для дерев*: кількість гілок, довжина, діаметр гілки, діаметр стовбура в даній точці над рівнем землі, швидкість зростання стовбура, розмір листя чи хвої і/чи поверхні, кількість плодів чи шишок, кількість насінин.

Якщо рівень забруднення визначається за поглинанням ЗР, то варто вимірювати або кількість ЗР, або кількість метаболіту ЗР. Можна вивести рівняння співвідношення рівня ЗР у тканинах і НПС.

Рослини, як живі колектори (мохи, лишайники), акумулюють у тканинах ВМ. Шляхом збирання рослин, висушування, зважування і хімічного аналізу можна підрахувати кількість поглиненого важкого металу. Лишайники часто використовують для визначення рівня *SO2.* Змінюючи проміжки збору чи виносу сіток здорових примірників лишайників, можна вивести співвідношення між вмістом поглиненої ЗР тканинами і концентрацією ЗР в навколишньому середовищі.

Таким чином, мохи, лишайники, покрито- і голонасінні, а також гриби, можна і доцільно використовувати як біоіндикатори, тобто для одержання кількісної оцінки ЗР у природному середовищі. Виявлення ВМ в ґрунті і рослинах можливо за допомогою таких методів, як атомно-адсорбційна спектрофотометрія, рентгенофлуоресцентний аналіз тощо.

**Основні принципи проведення біоіндикації за допомогою тварин.** Найбільше методи біоіндикації за допомогою тварин використовуються для оцінювання рівня забрудненості водного середовища. Визначають загальну біомасу і чисельність відповідної популяції. Зменшення розмірів популяції або її повне зникнення з водойми свідчить про забруднення води токсикантами.

При проведенні біотичного моніторингу використовують методи *пасивної* і *активної* біоіндикації.

При використанні *методів пасивної біоіндикації* як індикаторні організми використовують найбільш чутливі і досліджені види організмів, доступні для візуального спостереження, наприклад, *риби* для водних середовищ і великі безхребетні (*жужелиці, дощові черв’яки*) – для ґрунтів. Індикаторні організми повинні вивчатися у комплексі і на всіх стадіях прояву токсикозу, який визначається особливостями дії токсиканту та його концентрацією у середовищі. Так, токсиканти локальної дії пошкоджують респіраторний епітелій зябр у риб (до відділення ниток від зябрових пластинок), викликають кровотечу із зябер. Шкіряні покриви вкриваються слизом, який порушує газообмін, риба гине від асфіксії. Риби починають ковтати повітря з поверхні й гинуть з відкритим ротом та зябрами.

*Методи активної біоіндикації* для визначення токсикантів передбачають використання як індикаторні організми тест-об’єктів (гусениць-мурашів шовковичного шовкопряда15 *(Bombyx mori L.),* ракоподібних (Dafnia magna L.)16. Гусениці-мураші мають надзвичайно високу чутливість до дії токсикантів, особливо до інсектицидів і солей важких металів.

*Приклад біоітестування* за допомогою гусениць-мурашів шовковичного шовкопряда. Проби води або ґрунтового розчину, що відібрані для біотестування, вливають у літрові колби (по 3 колби на варіант, контроль – питна вода). В кожну колбу вміщують на дві доби по 3 пагони шовковиці з листям. За цей час пагони поглинають з розчину токсиканти. Після цього лист згодовують гусеницям-мурашам шовковичного шовкопряда протягом трьох наступних днів (один раз на добу). Щоденно підраховують загиблих гусениць. В разі забруднення води інсектицидами гусінь гине в першу добу, а при забрудненні фосфорорганічними сполуками та іншими токсикантами – через 48 годин.

**Завдання:**

1. Розкрийте зміст поняття «біоіндикація», «рослина-індикатор».

2. Опишіть вплив основні забруднювальних речовини, що діють на рослину через повітря.

3. Як впливають на рослини тверді частинки та важкі метали.

4. В чому полягає відмінність між кількісними та якісними показниками. Як одержати кількісну характеристику стану повітря через реакцію рослини на забруднення?

5. Проаналізуйте можливість проведення біоіндикації за допомогою тварин.