

Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника
Факультет природничих наук
Кафедра біології та екології

Кваліфікаційна робота
на здобуття другого (магістерського) рівня вищої освіти
на тему

Вивчення токсичності важких металів як складова лабораторних практикумів
й учнівських наукових проектів з біології та екології.

Виконала:
студентка спеціальності – 014.15 –
Середня освіта (природничі науки)
Дукельська
Керівник: к. б. н., доцент Миленка М.М.
Рецензенти: д.б.н., професор Сімчук А.П.

ВСТУП.....	3
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	5
1.1. Роль лабораторного навчання у вивченні біології та екотоксикології	5
1.2. Обґрунтування важливості вивчення токсичності солей ВМ для у курсі біології та екології.....	6
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ Й МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	15
2.1. Загальна характеристика матеріалів, методів і об'єктів дослідження	15
2.2. Дослідження токсичного впливу солей важких металів на <i>Lepidium sativum</i> L на лабораторному занятті	21
2.3. Оцінка цитотоксичних і кластогенних властивостей солей важких металів за допомогою <i>Allium cepa</i> -тесту .	22
2.4. Статистичні методи дослідження	24
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	25
3.1. Оцінка впливу солей важких металів на схожість насіння та ріст <i>Lepidium sativum</i> L. у лабораторному учнівському експерименті	25
3.2. Установлення цитотоксичності солей важких металів у <i>Allium cepa</i> -тесті у лабораторному експерименті	29
3.3. Мікроядерний аналіз як складова токсикологічних досліджень	32
ВИСНОВКИ.....	34
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	37

ВСТУП

Актуальність. Вивчення біології передбачає отриманням учнями великої кількості нової інформації: теорій, концепцій, прийомів тощо. Теоретики-педагоги стверджують, що кількість засвоєних у процесі вивчення біології термінів близька до збільшення словникового запасу при вивченні невідомої раніше іноземної мови. Однією з найважливіших складових при вивченні природних біологічних та екологічних процесів є здобуття практичних навичок і вмінь. При цьому, незамінними є лабораторні заняття, які, власне, дозволяють учням зрозуміти ключові механізми функціонування і концепції структурної організації різнорівневих біологічних систем, внутрі- та міжсистемні зв'язки, вразливість і стійкість природних систем щодо зовнішніх впливів, зокрема антропогенної трансформації довкілля.

Враховуючи вище наведене, особливо важливим є проведення лабораторних занять при вивченні учнями екотоксикологічних властивостей солей важких металів (ВМ) - одних із домінуючих полютантів, що потрапляють у природні екосистеми внаслідок зростаючих темпів антропогенної діяльності. Оцінка їх впливу на довкілля і біоту є край актуальною [1, 8, 19, 36]. Ця група хімічних сполук відзначається значною біологічною активністю, що доведено численними дослідженнями вітчизняних і зарубіжних вчених. Відомою є їх загально токсична дія на живі організми [10, 22, 32, 39] та виражена мутагенність [3, 7, 11, 12, 15, 17, 41]. Проте комплексні дослідження механізмів біологічного впливу солей ВМ, які дозволяли б будувати ряди токсичності і мутагенності для катіонів і аніонів є доволі рідкісними. Тому оцінка біотоксичності солей ВМ у різних концентраціях із застосуванням лабораторних тест-систем є актуальним напрямом сучасних біоекологічних досліджень, а засвоєння алгоритму таких досліджень є важливим для вивчення біології та екології, зокрема у програмі роботи біологічних гуртків.

Метою роботи було розробити алгоритм лабораторного дослідження фітотоксичності і мутагенної активності деяких солей ВМ (хлоридів, нітратів і сульфатів кадмію, купруму і нікелю) для вивчення екотоксикології учнями у курсі біології та екології на позашкільних заняттях.

Для досягнення поставленої мети виконували наступні **завдання**:

1. проаналізувати ефективність лабораторного середовища вивченні біології та екології у середній школі;
2. адаптувати методику вивчення фітотоксичності і кластогенності солей кадмію, купруму і нікелю за допомогою лабораторних тест-систем до практичного вивчення курсу екотоксикології;
3. розробити лабораторні роботи з дослідження впливу аніонів (Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^-) солей досліджених ВМ на ростові процеси *Lepidium sativum* L. і хромосомний апарат кореневої меристеми *Allium cepa* L. для здобуття практичних навиків роботи з курсу екологічної токсикології;
4. засвоїти алгоритм метематичної інтерпретації результатів лабораторних екотоксикологічних досліджень, зокрема установлення рівня корелятивних залежностей між зміною показників біотесторів і концентрацією солей ВМ;
5. опанувати методику побудови рядів токсичності досліджених солей ВМ на заняттях біологічного гуртка.

Об'єкт дослідження – постановка і проведення лабораторних занять з дослідження токсичності солей ВМ на заняттях біологічного гуртка.

Предмет дослідження – організація лабораторних занять.

Структура роботи. Дипломна робота викладена на 48 сторінках друкованого тексту, містить вступ, три розділи і список використаної літератури. Список використаних джерел налічує 42 найменування, у тому числі 4 – латиницею.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Роль лабораторного навчання у вивченні біології та екотоксикології

Вивчення біології надає учням можливість розвинути розуміння живого світу. Передумовою формування якісної біологічної освіти є науковий пошук - первинний процес, завдяки якому здобуваються наукові знання. Він передбачає основні навички якісного та кількісного спостереження, прогнозування, умовиводу, спілкування. Крім того, запит розвиває інтегровані навички, такі як ідентифікація та контроль змінних, генерування процедур, планування стратегій тестування гіпотез та відповіді на запитання, а також збирання та інтерпретація відповідних даних. Знання біології включають наукові дані, концепції, гіпотези, теорії, методологію, використання інструментів та концептуальні теми.

Знання, засновані на експериментальних результатах та точних спостереженнях, отримуються за допомогою лабораторного та польового навчання, що є ключовим компонентом біологічної освіти. Лабораторні заняття дають учням можливість спостерігати й експериментувати з науковими явищами, сприяючи тим самим формуванню цілісного уявлення про функціонування біотичних систем, механізми їх порушення та способи відновлення.

Лабораторні дослідження є ефективним засобом як для розуміння біологічних законів, так і для практичного застосування і поглиблення набутих на теоретичних уроках біологічних знань.

Лабораторний досвід надає можливість вчителям моделювати передовий досвід у вивченні біології, включаючи застосування наукових методологій, вироблення біоетичних принципів у науковій діяльності, дотримання стандартів безпеки. Таким чином, навчання у лабораторних умовах є невід'ємною та важливою частиною курсу біології.

Засвоєння курсу екології в рамках вивчення біології у середній школі передбачає з'ясування механізмів пошкодження структурно-функціональних системних зв'язків, формування в учнів адекватного розуміння поняття "токсичності" і норми реакції живих організмів і усвідомлення необхідності біологічної регламентації хімічного забруднення.

Далі наведені рекомендації щодо можливостей лабораторного навчання для вивчення екотоксикології при вивченні біології, розгляд адаптованих методичних вказівок і приклади інтерпретації результатів лабораторних досліджень з вивчення токсичності полютантів на лабораторних заняттях біологічного гуртка, стратегії побудови зазначених експериментів.

1.2. Обґрунтування важливості вивчення токсичності солей ВМ для у курсі біології та екології.

Поняття «важкі метали» досить часто зустрічається у літературі, проте трактування даного терміну у різних авторів є неоднаковим. Термін «важкі метали» пов'язаний з високою відносною атомною масою елемента. Також однією із ознак «важких металів» є їх густина. За однією з відомих класифікацій до групи ВМ відносять більше 40 елементів з високою відносною атомною масою й густиною більшою 6 г/см^3 . За іншою класифікацією, у цю групу включають кольорові метали із густиною більшою, ніж у заліза (зокрема, свинець, мідь, цинк, нікель, кадмій, кобальт, олово, сурма, вісмут, ртуть). Відповідно до відомостей, представлених в довіднику до важких металів віднесені елементи, густина яких більша, ніж 5 г/см^3 . Якщо виходити із цього показника, важкими можна вважати 43 з 84 металів Періодичної системи хімічних елементів. Таким чином, до важких металів відносять більше 40 хімічних елементів з відносною густиною більше 6 г/см^3 . Число ж небезпечних забруднювачів, якщо враховувати токсичність, стійкість і здатність накопичуватися в зовнішньому середовищі, є значно меншим [1, 8, 19, 24].

Поняття «важкий метал» звичайно ототожнюється з уявленням про високу токсичність. Проте до цієї групи також належать елементи, важливе позитивне значення яких давно виявлене і доведене експериментально (мікроелементи): мідь, цинк, молібден, кобальт, марганець, залізо та ін. [1] Кожен із зазначених елементів відіграє важливу роль в рослинних і тваринних організмах. Входячи до складу білкових молекул, вони можуть утворювати ферменти, виконувати функцію комплексоутворювачів тощо. Наприклад, марганець має здатність змінювати валентність і тому бере участь в окисно-відновних реакціях і сприяє проходженню темної фази фотосинтезу. Мідь входить до складу ферментів, які забезпечують процеси дихання (аскорбіноксидази, поліфенолоксидази). Молібден входить до складу ферментів нітрогеназного комплексу, нітратредуктази, яка перетворює нітрати в нітрити, ксантиноксидази, а також стимулює синтез вітаміну С. Кобальт входить до складу вітаміну B₁₂, який є кофактором ферментів метилування. Також він відповідає за утворення тироксину щитовидною залозою ссавців. Цинк входить до складу багатьох ферментів: пептидаз, карбоангідрази, алкогольдегідрогенази, лактатдегідрогенази, глутаматдегідрогенази. В цілому справедливим є використання терміну «важкий метал» коли мова йде про небезпечні для живих організмів концентрації елемента з відносною атомною масою більшою 40, і говорити про нього ж як про мікроелемент у тому випадку, коли він знаходиться у складі ґрунту, рослини, організмах тварин чи людини у нетоксичних концентраціях чи використовується у невеликій кількості як добриво [1, 24, 25].

Еволюція людського суспільства тісно пов'язана з технологією отримання і обробки металів. Це сприяє їх інтенсивному розсіюванню у середовищі та спричинює утворення локальних та широкопросторових геохімічних аномалій [8].

Метали потрапляють в атмосферу у складі газоподібних викидів і димів, а також у вигляді техногенного пилу. Значні їх об'єми привносяться у водойми разом зі стічними водами, а з води й атмосфери мігрують у ґрунти, де їх рух

істотно сповільнюється. Ґрунт, володіючи яскраво вираженою катіонною поглинальною здатністю, дуже добре утримує позитивно заряджені іони металів. Тому їх постійне надходження навіть у малих кількостях протягом тривалого часу може призвести до суттєвого накопичення металів в едафотопях. Якісний склад забруднювачів визначається характером техногенної діяльності у даному регіоні [1, 36].

Найбільш поширеними у природі є такі ВМ як цинк, свинець, ртуть, кадмій і хром. Набір металів, які поступають у довкілля визначається характером антропогенної діяльності у даному регіоні.

Свинець є найбільш поширеним елементом. Його масова частка у земній корі складає $1,6 \cdot 10^{-3} \%$. У ландшафтах цей елемент мігрує у бікарбонатній формі, а також в органічних комплексах. Він легко адсорбується глинами, а тому у цій фракції його вміст є вищим. Так при сильно розвинутій транспортній мережі відбувається збагачення ландшафтів свинцем, який потрапляє у довкілля разом з відпрацьованими газами двигунів внутрішнього згорання. Викиди свинцю пов'язані із стічними водами гірничо-збагачувальних комбінатів, деяких металургійних заводів, хімічних виробництв, шахт і т.д. Свинець перебуває в воді у розчиненому й зв'язаному (сорбованому) стані. У розчиненій формі зустрічається у вигляді мінеральних й органо-мінеральних комплексів, а також простих іонів, у нерозчинній – у вигляді сульфідів, сульфатів і карбонатів. У річкових водах концентрація свинцю коливається від десятих часток до одиниць мікрограмів в 1 дм^3 . Свинець – промислова отрута, здатний при несприятливих умовах виявитися причиною отруєння. ГДК свинцю становить $0,03 \text{ мг/дм}^3$ [13, 24].

Масова частка **кадмію** в земній корі складає $5 \cdot 10^{-5} \%$. Його найважливіші мінерали – CdS і CdCO_3 . Здебільшого вони є супутниками мінералів цинку. Привнесення у природні ландшафти кадмію найчастіше пов'язано з використанням у сільському господарстві фосфатних добрив, які містять цей елементи в якості домішки, а також внаслідок діяльності електронної і лакофарбової промисловостей, які широко застосовують цей метал у

технологічних процесах. Сполуки кадмію виносяться у поверхневі води зі стічними водами свинцево-цинкових заводів, гірничо-збагачувальних комбінатів, ряду хімічних підприємств (виробництво сірчаної кислоти), гальванічного виробництва, а також із шахтними водами. Зниження концентрації розчинених сполук кадмію відбувається за рахунок процесів сорбції, випадання в осад гідроксидів й карбонатів кадмію. Розчинені форми кадмію в стічних водах являють собою головним чином мінеральні комплекси. У річкових незабруднених й слабо забруднених водах кадмій утримується в субмікрограммових концентраціях, у забруднених і стічних водах концентрація кадмію може досягати десятків мікрограмів в 1 дм³ [1, 24].

Масова частка **цинку** в земній корі складає $5 \cdot 10^{-3} \%$. Він зустрічається лише в складі сполук, наприклад ZnS чи ZnCO₃. Збагачення ландшафтів цинком при систематичному використанні в якості органічних добрив каналізаційних осадів міст, а також при спалюванні відходів резини, до складу якої цинк входить як елемент, який покращує вулканізацію. Цинк потрапляє у природні води зі стічними водами гірничо-збагачувальних комбінатів та гальванічних цехів, виробництв пергаментного паперу, мінеральних фарб, віскозного волокна й ін. У воді знаходиться в іонній формі або у формі мінеральних й органічних комплексів. Іноді зустрічається в нерозчинній формі: у вигляді гідроксида, карбонату, сульфідів й ін. ГДК Zn²⁺ становить 1 мг/дм³ [8].

У природі **ртуть** є доволі рідкісним елементом і мігрує переважно у водних розчинах чи у газоподібному стані. У ландшафті в основному розсіюється і лише у незначних кількостях може сорбуватися глинами і мулом. В природних едафотопях її вміст не перевищує сотих часток міліграма на кілограм, а в ґрунтах, які піддаються інтенсивному сільськогосподарському використанню її вміст вимірюється міліграмами. Ртуть у культурному ландшафті опиняється у результаті використання її сполук в якості фунгіцидів та при виробництві целюлози на целюлозно-паперових підприємствах, звідки

вона може потрапляти в оточуюче середовище зі стічними водами і твердими відходами при очистці стічних вод. Не виключено потрапляння ртуті з побутовим сміттям. Значні кількості ртуті надходять у водні об'єкти зі стічними водами підприємств, що виготовляють барвники, пестициди, фармацевтичні препарати, деякі вибухові речовини. У поверхневих водах сполуки ртуті перебувають у розчиненому й зв'язаному станах. Співвідношення між ними залежить від хімічного складу води й значення рН. Зв'язана ртуть являє собою сорбовані сполуки ртуті. Розчиненими формами є недисоційовані молекули, комплексні органічні й мінеральні сполуки. ГДК ртуті становить 0,0005 мг/дм³ [8, 24].

Привнесення *хрому* у природні ландшафти може відбуватися внаслідок застосування в якості добрив осадів стічних вод каналізації населених пунктів, а також з викидами годинникової, шкірної галузей та при вапнуванні ґрунтів шлаками металургійних підприємств, які містять хром.

Уран, торій і радій можуть потрапляти у довкілля та включатись у трофічні ланцюги за рахунок фосфорних мінеральних добрив, а при спалюванні кам'яного вугілля, яке містить зазначені елементи. Стабільний стронцій потрапляє у ландшафти з простим суперфосфатом і фосфогіпсом, які отримують з апатитів [1].

Значні кількості *заліза* надходять зі стічними водами підприємств металургійної, металообробної, текстильної, лакофарбової промисловості й із сільськогосподарськими стоками. Фазові рівноваги між формами сполук заліза у розчинах залежать від хімічного складу води, рН і температури. Розчинене залізо у стічних та природних водах представлене сполуками, що перебувають в іонній формі, у вигляді гідроксокомплексів й комплексів з розчиненими неорганічними й органічними речовинами природних вод. В іонній формі мігрує головним чином Fe (II), а Fe (III) під час відсутності комплексоутворювачів може в значних кількостях перебувати в розчиненому стані. У результаті хімічного й біохімічного (при участі залізобактерій) окиснення Fe (II) переходить в Fe (III), іони якого, гідролізуючись, випадають

в осад у вигляді $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Як для іонів Fe^{2+} , так і для Fe^{3+} характерна здатність до утворення гідроксокомплексів типу $[\text{Fe}(\text{OH})_2]^+$, $[\text{Fe}_2(\text{OH})_2]^{4+}$, $[\text{Fe}(\text{OH})_3]^+$, $[\text{Fe}_2(\text{OH})_3]^{3+}$, $[\text{Fe}(\text{OH})_3]^-$ і інших, співіснуючих у розчині в різних концентраціях залежно від pH. Основною формою знаходження Fe^{3+} у поверхневих водах є комплексні сполуки його з розчиненими неорганічними й органічними комплексоутворювачами, головним чином гумусовими речовинами. При $\text{pH} = 8,0$ основною формою знаходження іонів тривалентного заліза в розчинах є $\text{Fe}(\text{OH})_3$ [24].

У природні води сполуки **кобальту** попадають зі стоками металургійних, металообробних і хімічних заводів. Сполуки кобальту в природних водах перебувають у розчиненому й зв'язаному стані, кількісне співвідношення між якими визначається хімічним складом води, температурою й значеннями pH. Розчинені форми представлені в основному комплексними сполуками. Сполуки двовалентного кобальту найбільш характерні для поверхневих вод. У присутності окислювачів можливе існування в помітних концентраціях тривалентного кобальту [8, 24].

Основним джерелом надходження **міді** в природні води є стічні води підприємств хімічної, металургійної промисловості, шахтні води, альдегідні реагенти, використовувані для знищення водоростей. Мідь може з'являтися в результаті корозії мідних трубопроводів й інших споруд. Гранично допустима концентрація міді у воді водопостачання санітарно-побутового водокористування становить $0,1 \text{ мг/дм}^3$ [1].

Сполуки **нікелю** у водні об'єкти надходять також із стічними водами цехів нікелювання, заводів синтетичного каучуку, нікелевих збагачувальних фабрик. Величезні викиди нікелю супроводжують спалювання викопного палива. Концентрація його може знижуватися в результаті випадання в осад таких сполук, як ціаніди, сульфідні, карбонати або гідроксиди (при підвищенні значень pH) й процесів адсорбції. У поверхневих водах сполуки нікелю перебувають у розчиненому, зв'язаному й колоїдному стані, кількісне співвідношення між якими залежить від властивостей води, температури й

значень рН. Сорбентами сполук нікелю можуть бути гідроксид заліза, органічні речовини, високодисперсний карбонат кальцію, глини. Розчинені форми являють комплексні іони, найбільше часто з амінокислотами, гуміновими кислотами, а також у вигляді міцного ціанідного комплексу. Найпоширеніші в природних водах сполуки нікелю, у яких він перебуває в ступені окислювання +2. ГДК становить 0,1 мг/дм³ [1, 8, 24].

Таким чином, антропогенна діяльність зумовлює зростання «металічного пресу» на біосферу і спричинює утворення техногенних геохімічних аномалій, розміри яких постійно збільшуються.

Важкі метали є протоплазматичними отрутами, токсичність яких зростає зі збільшенням відносної атомної маси, а також має здатність до широкого варіювання залежно від фізико-хімічних властивостей ґрунту. Найбільш фітотоксичними елементами є ті, що спричинюють негативний вплив на тест-організми при концентрації у розчині до 1 мг/л. До таких елементів відносять Ag^+ , Be^{2+} , Hg^{2+} , Sn^{2+} , а також Co^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , CrO_4^{2-} .

Помірно токсичними прийнято вважати ті елементи, які спричинюють інгібуючий вплив на живі організми в концентраціях від 1 до 100 мг / л. Ця іони As, Se, Al, Ba, Cd, Cr, Fe, Mn, Zn. Слаботоксичними є ті ВМ, які рідко спричинюють негативний вплив на живі організми на рівнях 1800 мг/л [1, 36].

У літературі багато уваги приділено аналізу фітотоксичності важких металів [1, 3, 10, 14, 29, 32, 36]. Але наявні дані часто мають суперечливий характер, оскільки фітотоксичність мікроелементів сильно варіює й залежить від їх хімічних властивостей: валентності, радіуса та здатності до комплексоутворення.

Токсичність ВМ може проявлятися по різному. Багато металів, наприклад мідь і ртуть, при токсичних концентраціях інгібують активність ферментів. Ці метали здатні утворювати комплексні сполуками з органічними молекулами. Деякі важкі метали утворюють хелатоподібні комплекси зі звичайними метаболітами й заважають їх подальшій участі в обміні речовин [1].

Окремі ВМ взаємодіють з клітинними мембранами, змінюючи їх проникність і інші властивості. Деякі ВМ конкурують з необхідними для рослин металами і порушують, таким чином, їх функціональну роль. Так, Li конкурує з Na, Cs заміщає K; Ba і Sr – Ca; Cd – Zn [24].

Суперечливими є відомості й щодо впливу на фітотоксичність свинцю [1, 7, 13, 15]. Проте достеменно відомо про здатність даного металу інгібувати процеси дихання та фотосинтезу, пригнічувати мітотичну активність меристем, порушувати процеси поглинання води й транспірації та змінювати функції плазматичних мембран.

Значна фітотоксичність кадмію доведена експериментально. Вона яка проявляється через депресію фізіологічних процесів, зміну активності ензимів і проникності клітинних мембран [1, 36]. Висока фітотоксичність кадмію зумовлена його схожістю за хімічними властивостями із цинком. Кадмій може виступати у ролі цинка у багатьох біохімічних процесах, порушуючи роботу таких ферментів, як карбоангідраза, різині дегідрогенази, фосфатази і ін. Заміна цинку кадмієм у рослинному організмі призводить до цинкової недостатності, що в свою чергу зумовлює пригнічення і навіть загибель рослини.

Мідь є одним із найбільш токсичних хімічних елементів стосовно рослинності [1, 39] і здатна, у надлишковій кількості, спричинювати незворотні фітотоксичні ефекти: зміну проникності мембран, пошкодження тканин, переокислення ліпідів у мембранах хлоропластів і пригнічення процесів фотосинтезу, іммобілізацію Сu-нуклеїнових комплексів тощо.

Фітотоксичність Zn, відповідно до літературних даних, є незначною [1, 36]. Поширеним симптомом токсикозу є Zn-індукований хлороз і зниження темпів росту рослини [36].

Механізми токсичного впливу нікелю досі залишаються до кінця не вивченими. Відомо, що при його надлишку різко знижується абсорбція поживних речовин, відбувається пригнічення ростових процесів і процесів метаболізму. Ще до появи очевидних симптомів гострої токсичності

підвищення концентрації Ni в тканинах спричинює депресію фотосинтезу й транспірації, а також зниження темпів фіксації молекулярного азоту [1, 24, 25].

Залізо не належить до високотоксичних елементів, проте в надлишкових кількостях його сполуки здатні порушувати процеси метаболізму, пригнічувати проходження фотосинтезу та сприяти деградації найбільш важливих метаболітів, зокрема АТФ [1].

Фітотоксичність металів і стійкість до них рослин залежать від багатьох факторів. Стійкість рослин до одного металу, як правило, не поширюється на інші.

Проникаючи в ядро та зв'язуючись із ДНК, важкі метали проявляють генотоксичну дію [2, 3, 7, 11, 15, 27, 29]. Їм властиві мала рухливість і висока стійкість у навколишньому середовищі [1, 8], а довготривала дія невисоких концентрацій може не викликати отруєння, але мати генетичні наслідки [3]. Це доведено численними дослідженнями. Зокрема, експериментально доведена цитогенетична токсичність кадмію: його хлорид, як і хлорид алюмінію, підвищує кількість аномальних анафаз і порушує нормальне співвідношення кількості клітин у фазах мітозу в меристематичних тканинах *Pisum sativum* L та *Allium cepa* L [33].

Дані щодо мутагенності Pb є суперечливими. Більшість дослідників погоджується, що цей метал може викликати аберації хромосом *in vivo* та *in vitro* (в основному гепи та фрагменти), а інколи й більш складні перебудови – дицентрики та транслокації. Така властивість Pb експериментально доведена на *Zea mays* L. [6] і *Crepis capillaries* L. [4].

В цілому дані щодо мутагенної активності і фітотоксичності як окремих ВМ, так і їх сумішей є доволі суперечливими і потребують уточнення.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Загальна характеристика матеріалів, методів і об'єктів дослідження

У дипломній роботі представлено результати апробації і втілення у педагогічну практику лабораторних робіт з курсу "Екологічна токсикологія", що вивчається у рамках вивчення біології на позашкільних заняттях з екології. Лабораторні роботи апробовано під час роботи біологічного гуртка, який функціонує на кафедрі біології та екології ДВНЗ "Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника". Дослідження проводились у 2023 - 2024 н.р.

У рамках проведення лабораторного практикуму з вивчення токсичності солей ВМ учнями здійснено:

1. дослідження фітотоксичних властивостей хлоридів, нітратів і сульфатів кадмію, купруму і нікелю у ростовому тесті з *Lepidium sativum* L.;
2. біотестування цитотоксичності досліджених солей ВМ за їх здатністю інгібувати проліферативну активність клітин апікальних меристем *Allium cepa* L.;
3. оцінку кластогенної активності солей ВМ за допомогою ана-телофазного аналізу у *Allium cepa*-тесті.

Матеріалом для проведення біотестування слугували рослини - цибуля ріпчаста (*Allium cepa* L.) та крес-салат (*Lepidiun sativum*).

Методологічною основою впровадження даних рослин у систему тестування токсичності солей ВМ є їх висока чутливість до впливу екотоксикантів.

Цибуля ріпчаста (*Allium cepa*) - трав'яниста багаторічна рослина, представник роду *Allium*. (рис. 2.1.).



Рис. 2.1. Цибуля ріпчаста (*Allium cepa* L.)

Крес-салат (*Lepidium sativum* L.) (хрінниця посівна) — однорічна трав'яниста рослина родини Хрестоцвітих (*Brassicaceae*). Цінною особливістю крес-салату є висока стійкість проти недостатньої освітленості і абсолютна схожість за сприятливих умов середовища (рис. 2.2.).



Рис.2.2. Крес-салат (*Lepidium sativum* L.)

Насіння крес-салату проростає при температурі 2 - 3°C, сходи витримують заморозки до -1°C, а дорослі рослини здатні відновлювати життєві функції після короткочасної дії температури мінус 4 - 7°C.

Крес-салат не вимогливий до умов вирощування, помірно вимогливий до вологості. Вирощують його на різних ґрунтах, проте краще він вдається на

нейтральних легких супіщаних, удобрених під попередню культуру і достатньо зволжених.

Для встановлення залежностей «доза-біологічний ефект» за стандартними методиками учням проводили демонстраційний експеримент, під час якого показано процес приготування водних розчини солей ВМ у концентраціях 0,1, 1,0 та 10 мг/л.:

- хлоридів (CdCl_2 , CuCl_2 , NiCl_2);
- нітратів ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$);
- сульфатів (CdSO_4 , Cu SO_4 , NiSO_4).

На отриманих розчинах пророщували насіння тест-рослин. Полив контрольних рослин здійснювали дистильованою водою.

Загальна характеристика аналізованих солей ВМ.

Хлорид кадмію (CdCl_2) – біла перло-подібна речовина або кристали з гексагональною структурою. Молярна маса – 183,31 г/моль. CdCl_2 - водо- і спирторозчинний; нерозчинний у ефірі й ацетоні. Сполуку отримують шляхом взаємодії Cd з концентрованою соляною кислотою. Цю речовину використовують як компонент електроліту у кадмієвих гальванічних елементах; як протраву при фарбуванні тканин або як компонент сорбентів для газової хроматографії, а також у фотоіндустрії. CdCl_2 застосовується також як вихідна речовина для отримання кадмій-органічних сполук. Хлорид кадмію є висотоксичною речовиною. ГДК рівне 0,2 мг/л.

Хлорид міді (CuCl_2) – бінарна неорганічна речовина, сіль (рис. 2.3). Утворює кристалогідрати: $\text{CuCl}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$. Молярна маса – 134,452 г/моль. Водорозчинний (75,6г/100 мл при температурі 25°C).

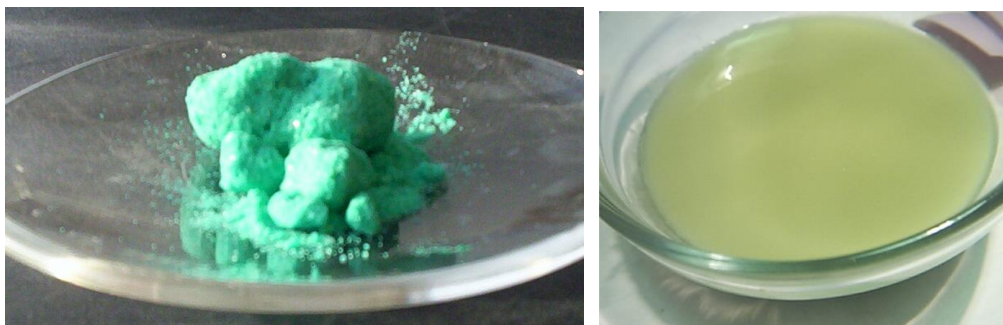


Рис. 2.3. Загальний вигляд кристалогідрату (А) та водного розчину CuCl_2

Як природна сполука дигідрат хлориду міді зустрічається у вигляді рідкісного мінералу - ернохальцита. У промисловому виробництві CuCl_2 отримують хлоруванням сульфіда міді, у лабораторній практиці – взаємодією металічної міді з хлором або оксиду чи гідроксиду міді (II) з HCl . CuCl_2 застосовують для оміднення металів або каталізатор крекінгу і дикарбоксилування. Може бути застосований як протрава при фарбуванні тканин. CuCl_2 – сильно токсична речовина; ГДК складає 0,1 мг/л.

Хлорид нікелю (NiCl_2) – золотисто-жовті блискучі ромбоєдричні кристали. Сполука добре розчинна у воді, спирті та ефірі. У лабораторних умовах NiCl_2 отримують дегідратацією кристалогідратів або дією хлору на нагрітий нікель. Хлорид нікелю застосовують у гальванотехніці. Ця сполука характеризується значною токсичністю. У літературі описано здатність NiCl_2 спричинювати загибель водоростей при концентрації 0,1-1,5 мг/л, дафній – при 0,7 мг/л, гольяна і карпа – 8,1 мг/л. ГДК NiCl_2 у воді складає 0,1 мг/л.

Нітрат кадмію ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) – біла кристалічна тверда речовина з вираженими гігроскопічними властивостями (рис. 2.4).



Рис. 2.4. Загальний вигляд кристалів нітрату кадмію

Сполука має молярну масу (236,42 г/моль), добре розчинна у воді. Нітрат кадмію використовують у виробництві кольорового скла, у фотоіндустрії, рідше – як джерело іонів кадмію для розчинів. Нітрат кадмію отримують розчиненням металічного кадмію (або його оксиду, гідроксиду чи карбонату) в азотній кислоті. Сполука має виражені загальнотоксичні і канцерогенні властивості.

Нітрат міді - $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ - сіль двовалентної міді й азотної кислоти. У безводній формі сполука являє собою безколірні кристали, а при поглинанні води утворює кристалогідрат голубого кольору. Як природна сполука нітрат міді зустрічається у вигляді мінералів герхардтиту і руату. Отримують сполуку шляхом розчинення в азотній кислоті металічної міді, оксиду міді (II) чи гідроксиду міді (II). Нітрат міді використовують для отримання чистого оксиду міді (II), мідьвмісних каталізаторів, а також як фунгіцид і протраву при покрасці тканин.

$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ є помірно токсичною речовиною:

- LD_{50} для щурів - 950 мг/кг;
- LC_{50} для риб – 0,29 мг/л.
- ГДК для води складає 0,1 мг/л.

Нітрат нікелю – $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ - сіль нікелю і азотної кислоти. Являє собою зелені кубічні кристали. Водорозчинна, має здатність утворювати кристалогідрати. Сполука знайшла застосування для отримання інших сполук нікелю і Ni-вмісних каталізаторів. Також застосовується як компонент електролітів для нанесення покриття Ni на метали і у виробництві кольорової кераміки. Нітрат нікелю – речовина із вираженим токсичним впливом на живі організми. ГДК складає 0,1 мг/л.

Сульфат кадмію – CdSO_4 , безколірні орторомбічні кристали. Рідко зустрічаються у природі в складі деяких мінералів. Застосовується для отримання сполук кадмію і у фармацевтичній промисловості. Речовина володіє загально токсичним впливом. ГДК становить 0,1 мг/л.

Сульфат міді (CuSO_4) – білі добре розчинні у воді кристали. При значній вологості кристалізуються у голубий пентагідричний купорос (рис. 2. 5). Завдяки цій властивості речовину використовують як індикатор вологості у приміщеннях. Зустрічається у вигляді природних мінералів - халькантину. У лабораторних умовах сульфат міді отримують розчиненням Cu або CuO у розбавленій сірчаній кислоті.



Рис. 2.5. Загальний вигляд гідрату сульфату міді

CuSO_4 використовується у складі «бордоської суміші» для боротьби зі шкідниками сільськогосподарських культур та у будівництві. У харчовій промисловості речовину використовують як добавку під маркуванням E519. Сульфат міді є речовиною із загальнотоксичними властивостями із ГДК у воді - 2 мг/л.

Сульфат нікелю, нікелевий купорос, $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – сіль сірчаної кислоти і нікелю. Це кристалогідратна речовина смарагдово-зеленого кольору, яку отримують розчиненням нікелю у сірчаній кислоті. Природний аналог – мінерал моренозит. У промисловості використовується у виробництві акумуляторів, у фунгіцидних сумішах, для виготовлення каталізаторів, у парфумерній промисловості. Високотоксична речовина широкого спектру дії з ГДК для води 0,1 мг/л.

2.2. Дослідження токсичного впливу солей важких металів на *Lepidium sativum* L на лабораторному занятті

Крес-салат пророщували у чашках Петрі на фільтрувальному папері, зволоженому водними розчинами аналізованих солей і дистильованою водою (контроль) (5 – 7 мл). У кожену чашку висівали по 100 насінин крес-салату у п'ятикратній повторності. Чашки Петрі утримували у термостаті при температурі 24,5 °С протягом п'яти діб.

Фітотоксичний ефект визначали у відсотках щодо маси рослин, довжини кореневої, стеблової систем та кількості сходів. Числовим виміром слугував коефіцієнт фітотоксичності (ФТ), розрахований за формулою 2.1 [12]:

$$\text{ФТ} = \frac{M_0 - M_x}{M_0}, \% \quad (2.1)$$

де M_0 – показники рослини у ємності з контрольним ґрунтом;

M_x – показники рослини у ємності з досліджуваним ґрунтом.

Для порівняння токсичності ґрунтових зразків використовували шкалу, запропоновану А.І. Горовою (табл.) [12]:

Таблиця 2.1.

Шкала для оцінки фітотоксичності середовища

Рівні пригнічення ростових процесів (фітотоксичний ефект), %	Рівень токсичності
0,0-20,0	Відсутній або слабкий
20,14 - 40,0	Середній
40,1 - 60,0	Вищий середнього
60,1 – 80,0	Високий
80,1 – 100,0	Максимальний

2.3. Оцінка цитотоксичних і кластогенних властивостей солей важких металів за допомогою *Allium cerea*-тесту

Цитотоксичність і кластогенність важких металів оцінювали у *Allium cerea*-тесті, який дозволяє вивчати цитотоксичність, документовану мікроскопічним дослідженням хромосомних аберацій та ядерних аномалій у клітинах корневих меристем. Як модельну систему використовували кореневу меристему трьох-чотирьох-денних проростків *Allium cerea* L. Для цього насіння цибулі пророщували у чашках Петрі (по 10 насінин на чашку) на зволоженому розчинами солей фільтрувальному папері в термостаті при $t = 25^{\circ}\text{C}$. На стадії найбільшої мітотичної активності (8-10 год ранку) зразки поміщали у ємності зі спирт-оцтовим фіксатором на 1,5 год. Фіксацію проводили при щільно закритій кришці, об'єм фіксатора перевищував об'єм біологічного матеріалу у 50-100 разів. Після фіксації корінці промокали фільтрувальним папером [34].

Промивку проводили у 70% спирті (70 мл 96% етилового спирту + 26 мл дистильованої води), а потім переносили у чистий 70% спирт для зберігання. Далі промивали дистильованою водою впродовж 5-10 хв, промокали фільтрувальним папером. Після цього поміщали в 1н HCl температурою 60° і проводили гарячий гідроліз, після чого швидко переносили в 1н HCl кімнатної температури на 3-4хв, згодом - в дистилят для промивання на 4 хв.

Фарбування зразків здійснювали реактивом Шиффа 1,5год. Після цього промивали у сірчистих водах 1, 2, 3 по 4 хв у кожній та у проточній воді 10-15 хв і у дистиляті – 1 - 2 хв. Давлені препарати піддавали цитологічному аналізу.

Реактив Шиффа (фуксин-сірчану кислоту) готували за стандартною методикою: 1г основного фуксину розчиняли у 200 мл 1н HCl, охолоджували до 25°C і додавали 1г сухого метабісульфату натрію. Розчин поміщали у конічну колбу, загорнувши чорним папером (крім дна). На другу добу, коли рідина змінила колір на слабо-жовтий проводили фарбування.

Для приготування сірчистих вод 200мл дистилляту додавали 10мл 10% розчину $\text{Na}_2 \text{S}_2\text{O}_5$ і 10мл HCl .

Під час цитологічного аналізу на давлених препаратах підраховували патології мітозу ана- телофазним методом та визначали мітотичну активність меристематичних клітин шляхом підрахунку профазного, метафазного, телофазного, а також мітотичного індексів за наступними формулами.

Відсоток аберантних анафаз (Aa):

$$Aa = a / A \times 100, \quad (2.2)$$

де a - кількість аберантних анафаз;

A - загальна кількість клітин на стадії анафази.

Мітотичний індекс (Mi):

$$Mi = M / K \times 100, \quad (2.3)$$

де M - кількість клітин на різних стадіях поділу; K - загальна кількість обстежених клітин.

Профазний індекс (Pi) визначали за формулою 2.4:

$$Pi = P / K \times 100, \quad (2.4)$$

де P - кількість клітин на стадії профаз; K - загальна кількість обстежених клітин.

За результатами досліджень були обчислені умовні показники ушкодженості (УПУ). Для цього використовували формули 2.5. – 2.6 [35]:

$$\text{УПУ}_i = (\text{П}_{\text{комф}} - \text{П}_n) / (\text{П}_{\text{комф}} - \text{П}_{\text{крит}}), \quad (2.5),$$

де УПУ_i – умовний показник ушкодженості біотестора за аналізованим цитогенетичним показником; i – аналізований цитогенетичний показник; $\text{П}_{\text{комф}}$ – комфортне (контрольне) значення аналізованого параметра біотестора; $\text{П}_{\text{крит}}$ – критичне значення параметру; П_n – значення параметра в кожному дослідному варіанті.

$$\text{ІУПУ} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \text{УПУ}_i, \quad (2.6),$$

де ІУПУ – інтегральний умовний показник пошкодження біотестора.

Цитологічний аналіз проводили під мікроскопом Olympus CX-300 (збільшення 400х); мікрофотографування здійснювали за допомогою

інтегрованої в мікроскоп фотонасадки Olympus SP – 500 UZ при збільшенні мікроскопа 1000x та програмного забезпечення Quick PHOTO MICRO 2,3 for Windows (Olympus).

3.4. Статистичні методи дослідження

Камеральна обробка результатів дослідження полягала в статистично-математичній інтерпретації й узагальненні одержаних даних. Усі розрахунки проводили за допомогою програмного пакета Statistica 6.0. і редактора MS Excel 2003. Математичну обробку результатів проводили варіаційно-статистичним методом із наступними кореляційним і регресійним аналізами. Для кожного з показників, які визначалися, розраховували середнє арифметичне (M), відхилення від середнього арифметичного (m), t -критерій Стюдента [28].

Отримані дані по t - критерію Стюдента для встановлення достовірності порівнювали з табличними. Різницю вважали достовірною при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Оцінка впливу солей важких металів на схожість насіння та ріст *Lepidium sativum* L. у лабораторному учнівському експерименті.

З метою визначення загальної фітотоксичності солей ВМ учнями проведено тест на їх здатність інгібувати ростові процеси в особин *Lepidium sativum* L.

Результати досліджень наведено у таблицях 3.1 - 3.3.

Таблиця 3.1.

Зміна ростових показників *Lepidium sativum* L. за дії хлоридів ВМ

№ п/п	Концентрація солі у водному розчині	Схожість насіння, %	Довжина стебла, см	Довжина кореня, см	Особливі відмітки
CdCl₂					
1	0,1	48*	1,30±0,10*	1,50±0,11*	Виражені некрози
2	1,0	6*	0,50±0,07*	0,40±0,05*	-
3	10,0	-	-	-	Насіння не проросло
CuCl₂					
4	0,1	78*	2,60±0,10*	2,00±0,12*	-
5	1,0	14*	0,72±0,07*	0,50±0,05*	Рослини гинуть на 3 - 5-ий день експерименту
6	10,0	-	-	-	Насіння не проросло
NiCl₂					
1	0,1	60	2,20±0,10*	1,80±0,08*	-
2	1,0	11	1,20±0,10*	1,00±0,05*	Рослини гинуть на 3 - 5-ий день експерименту
3	10,0	-	-	-	Насіння не проросло
КОНТРОЛЬ (дистилят)		100	3,50±0,10	3,70±0,10	-

* - відмінність статистично достовірна порівняно із контролем

За відсутності впливу токсикантів насіння крес-салату відзначається абсолютною схожістю – 100%. Контрольні значення довжини стебла та кореня *Lepidium sativum* L. складають, відповідно, 3,5 та 3,7 см.

Солі ВМ спричиняють достовірні зміни ростових показників тест-рослини, пропорційно їх концентрації у розчині. За дії хлоридів, нітратів та сульфатів кадмію, міді та нікелю у концентрації 10мг/л насіння крес-салату не проростає. Повне пригнічення ростових процесів спричиняють також нітрат і сульфат кадмію у концентрації 1,0мг/л. Відмічено здатність солей кадмію зумовлювати виникнення некрозів на листках і стеблі хрінниці посівної, а солей нікелю – спричинювати загибель особин на 3-5-ий день експерименту.

Таблиця 3.2.

Зміна ростових показників *Lepidium sativum* L. за дії нітратів ВМ

№ п/п	Концентрація солі у водному розчині	Схожість насіння, %	Довжина стебла, см	Довжина кореня, см	Особливі відмітки
Cd(NO₃)₂					
1	0,1	32	2,00±0,10	1,60±0,10	Виражені некрози
2	1,0	-	-	-	Насіння не проросло
3	10,0	-	-	-	Насіння не проросло
Cu(NO₃)₂					
4	0,1	65	2,50±0,10	2,10±0,08	-
5	1,0	15	0,80±0,05	0,70±0,05	-
6	10,0	-	-	-	Насіння не проросло
Ni(NO₃)₂					
1	0,1	56	2,20±0,10	2,00±0,15	-
2	1,0	13	1,50±0,10	1,20±0,10	Рослини гинуть на 3 - 5-ий день експерименту
3	10,0	-	-	-	Насіння не проросло
КОНТРОЛЬ (дистилят)		100	3,50±0,10	3,70±0,10	-

* - відмінність статистично достовірна порівняно із контролем

Мінімальний інгібуючий ефект хлоридів, сульфатів та нітратів усіх досліджених ВМ проявляється у концентрації 0,1 мг/л. Така концентрація токсиканта зумовлює пригнічення проростання насіння крес-салату та зміну морфометричних параметрів на 40-60%. У концентрації 1,0мг/л схожість насіння хрінниці знижується у 17-25 раз, а середні довжини пагона та кореня – у 2-7 разів.

Таблиця 3.3.

Зміна ростових показників *Lepidium sativum* L. за дії сульфатів ВМ

№ п/п	Концентрація солі у водному розчині	Схожість насіння, %	Довжина стебла, см	Довжина кореня, см	Особливі відмітки
CdSO₄					
1	0,1	40	1,50±0,07	1,20±0,05	Виражені некрози
2	1,0	-	-	-	Насіння не проросло
3	10,0	-	-	-	Насіння не проросло
Cu SO₄					
4	0,1	67	2,30±0,10	2,00±0,10	-
5	1,0	17	0,90±0,07	0,50±0,05	-
6	10,0	-	-	-	Насіння не проросло
NiSO₄					
1	0,1	60	2,20±0,10	1,80±0,08	-
2	1,0	11	1,20±0,10	1,00±0,05	Рослини гинуть на 3 - 5-ий день експерименту
3	10,0	-	-	-	Насіння не проросло
КОНТРОЛЬ (дистилят)		100	3,50±0,10	3,70±0,10	-

* - відмінність статистично достовірна порівняно із контролем

Результати проведеного експерименту вказують, що токсичність солей аналізованих ВМ визначається в основному впливом катіонів, а аніони проявляють менш помітну дію. Так, можна виділити наступний ряд токсичності катіонів ВМ: $\text{Cd}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Ni}^{2+}$.

Максимальним інгібуючим ефектом відзначається сумісна дія токсикантів у концентрації 1,0 мг/л (таблиця 3.4)

Таблиця 3.4.

Зміна ростових процесів *Lepidium sativum* L. за сумісної дії
CdSO₄ + Cu SO₄ + NiSO₄ у концентрації 0,1 мг/л

Схожість насіння, %	Довжина стебла, см	Довжина кореня, см	Особливі відмітки
7	1,1±0,07*	0,7±0,05*	Виражені некрози, гинуть на 3-5-ий день експерименту

* - відмінність статистично достовірна порівняно із контролем

У зазначених умовах схожість насіння тест-об'єкту складає 7%. Морфометричні параметри рослин достовірно відрізняються від контролю: довжина стебла складає 1,1 см, а кореня 0,7 см, що нижче за відповідні контрольні значення у 3 та 5 разів. Відмічено некротизацію тканин коренів та листків крес-салату та низьку життєздатність особин, що проявляється їх загибеллю на 3-5-ий день експерименту.

Результати встановленої фітотоксичності досліджених солей ВМ наведені на рис. 3.1 А-Б.

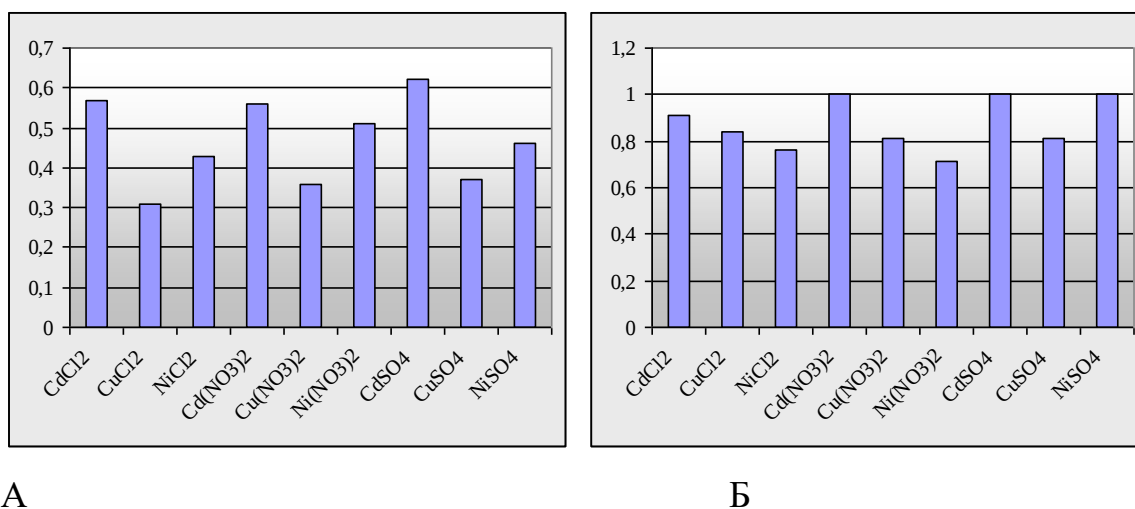


Рис. 3.1 Значення коефіцієнту фітотоксичності досліджених солей ВМ у концентрації 0,1 мг/л (А) та 1,0 мг/л.

Таким чином, за значеннями інтегрального коефіцієнта можна побудувати наступний ряд фітотоксичності досліджених солей ВМ:

Для низьких концентрацій (0,1 мг/л):

CdSO_4 (0,62)* $\rightarrow$ CdCl_2 (0,57) $\rightarrow$ $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (0,56) $\rightarrow$ $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ (0,51) $\rightarrow$ NiSO_4 (0,46) $\rightarrow$ NiCl_2 (0,43) $\rightarrow$ CuSO_4 (0,37) $\rightarrow$ $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (0,36) $\rightarrow$ CuCl_2 (0,31).

Для середніх концентрацій (1,0 мг/л):

$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (1,00) = CdSO_4 (1,00) = NiSO_4 (1,00) $\rightarrow$ CdCl_2 (0,91) $\rightarrow$ CuCl_2 (0,84) $\rightarrow$ $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (0,81) = CuSO_4 (0,81) $\rightarrow$ NiCl_2 (0,76) $\rightarrow$ $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ (0,71).

Фітотоксичний ефект усіх аналізованих солей ВМ у концентрації 10 мг/л відповідає найвищому рівню токсичності – 1,0.

3.2. Установлення цитотоксичності солей важких металів у *Allium cepa*-тесті у лабораторному експерименті.

Відомо, що пригнічення мітотичної активності є інформативним маркером цитотоксичності полутантів. Тому для дослідження цитотоксичних властивостей солей ВМ здійснювали оцінку клітинного поділу, тобто визначали мітотичний індекс .

Модельні дослідження показали достовірне зменшення рівня мітотичної активності клітин апікальної меристеми первинних корінців *Allium cepa* L., пропорційне зростанню концентрації солей ВМ у водному розчині (табл. 3.5).

Значення МІ у контролі складає $35,20 \pm 0,16$. Максимальні зміни проліферативної активності клітин тест-об'єкту зумовлює хлорид кадмію у концентрації 10,0 мг/л. У даному варіанті експерименту МІ складає 5,74, що у 7,4 рази нижче контрольного показника. УПУ рівне 0,84.

Мітотичний індекс (MI) та проліферативна активність (відносний мітотичний індекс стосовно контролю – BMI) клітин апікальної меристеми первинних корінців *Allium cepa* L. за дії солей ВМ й умовні показники ушкодження (УПУ_{MI})

№ п/п	Концентрація солі у водному розчині (мг/л)	MI, % (M±m)	УПУ _{MI}	Рівень пошкодження біотестора	BMI
<i>CdCl₂</i>					
1	0,1	18,31±0,60*	0,48	вище середнього	0,52
2	1,0	12,94±0,47*	0,63	високий	0,35
3	10,0	5,74±0,24*	0,84	максимальний	0,29
<i>NiCl₂</i>					
4	0,1	21,41±0,24*	0,40	середній	0,61
5	1,0	16,10±0,90*	0,54	вище середнього	0,46
6	10,0	8,97±0,30*	0,75	високий	0,25
<i>CuCl₂</i>					
7	0,1	24,75±0,40*	0,30	нижче середнього	0,70
8	1,0	15,10±0,74*	0,57	вище середнього	0,43
9	10,0	12,37±1,20*	0,65	високий	0,35
Контроль (дистильована вода)		35,20±0,16	0	-	-

* - - відмінність статистично достовірна порівняно із контролем

Мінімальне пошкодження біотестора викликане впливом хлориду міді у концентрації 0,1 мг/л. Вплив екотоксиканта у зазначеній концентрації зумовлює зниження проліферативної активності на 30% , порівняно із контролем.

Загалом можна виділити наступний ряд цитотоксичності катіонів досліджених ВМ: $\text{Cd}^{2+} \rightarrow \text{Ni}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$.

Сумісна дія хлоридів кадмію, купруму та нікелю у концентраціях 0,1 мг/л спричинює зростання проліферативної активності меристематичних

клітин тест-об'єкту. На це вказує зростання MI у *Allium cepa*-тесті до значення 39,40. Проте зазначені зміни можна вважати наслідком затримки клітинного циклу на стадії профазі. Так, профазний індекс за комплексної дії токсикантів складає 53,77% при 43,05% у контролі (рис. 3.2).

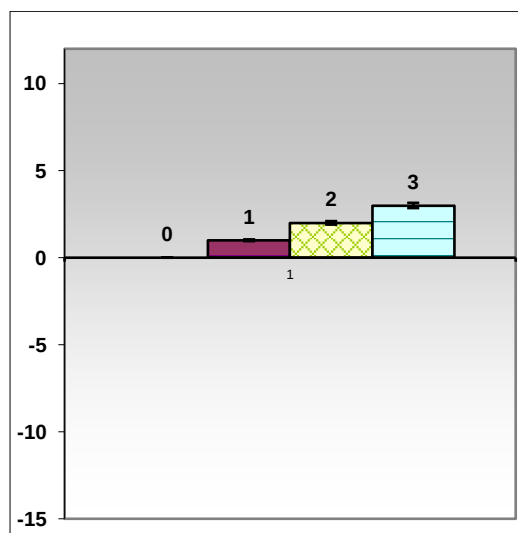


Рис. 3.2. Зміна відносної тривалості фаз мітозу в апікальних меристемах *Allium cepa* L. за комплексної дії $\text{CdSO}_4 + \text{Cu SO}_4 + \text{NiSO}_4$ у концентрації 0,1 мг/л відносно контролю.

Збільшення кількості клітин на стадії профазі часто пов'язують із зростанням її тривалості. Проте даний феномен може бути наслідком затримки всього мітотичного циклу, а одночасний вступ великої кількості клітин у профазу може бути викликаний частковою синхронізацією в одній чи декількох стадіях інтерфази [90].

3.3. Мікроядерний аналіз як складова токсикологічних досліджень

Проводили також мікроядерний аналіз клітин апікальної меристеми первинних корінців *A. cepa*. Мікроядра – ацентричні хромосомні фрагменти, або цілі хромосоми, що затрималися на стадії анафази (рис. 3.3).

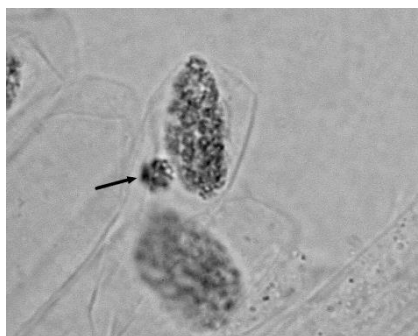


Рис. 3.3. Мікроядра у клітинах апікальної меристеми первинних корінців *Allium cepa* L. за дії NiCl_2 .

Тому наявність мікроядер є індикатором як структурних пошкоджень, так і процесу їх відставання, що спричинює анеуплоїдію. Таким чином, мікроядерний аналіз достатньою мірою відображає кластогенний вплив комплексу досліджуваних чинників [96].

Дослідження показали достовірне ($P < 0,05$) зростання мікроядерного індексу у меристематичних тканинах первинних корінців *A. cepa* L. за дії усіх аналізованих солей ВМ, прямо пропорційно концентрації солі у розчині. (рис. 3.4). Рівень спонтанної частоти клітин із мікроядрами, що зустрічаються в меристематичних клітинах *A. cepa* L. – $1,93 \pm 0,07\%$.

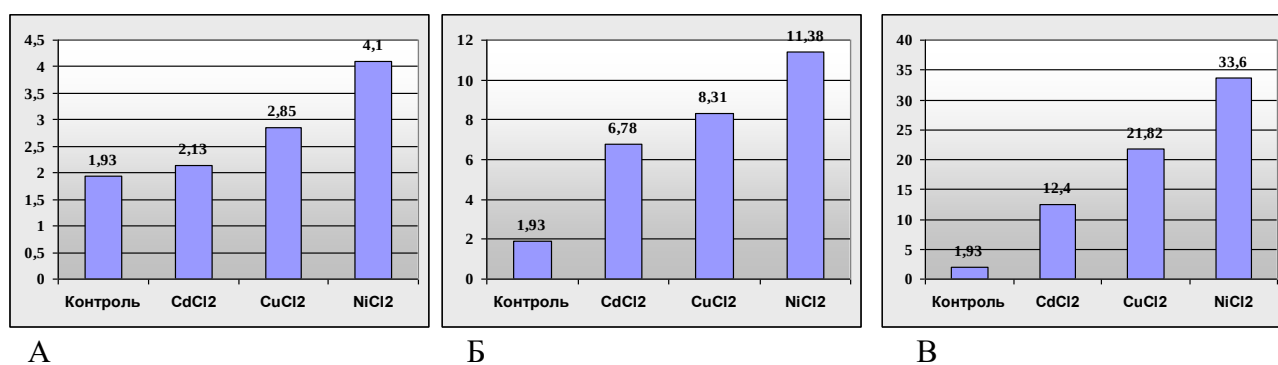


Рис. 5.5. Значення мікро ядерного індексу при експонуванні тест-об'єкта на розчинах хлориду кадмію, нікелю і купруму у різних концентраціях: А- 0,1 мг/л; Б-1,0 мг/л; В – 10,0мг/л.

Максимальна індукція цитогенетичних порушень, що викликають утворення позануклеарних структур у клітинах апікальної меристеми

A. сера L., характерна для водного розчину хлориду нікелю у концентрації 10 мг/л (33,6%), а мінімальна – хлориду кадмію у концентрації 0,1 мг/л.

Зростання кількості клітин із мікроядрами можна вважати індикатором стресу, який призводить до появи аномальних клітин і зниження здатності організму елімінувати ці порушення [1].

Таким чином, мікроядерний тест із використанням *A. сера* L. як модельної системи є зручним високочутливим методом скринінгу мутагенів, зокрема важких металів.

Проведений аналіз дозволяє зробити висновок щодо високої кластогенної активності досліджених солей ВМ. При цьому генотоксичний ефект є відмінним для різних катіонів ВМ та зростає пропорційно концентрації солі у водному розчині .

ВИСНОВКИ

У бакалаврській роботі представлено результати апробації і втілення у педагогічну практику лабораторних робіт з курсу "Екологічна токсикологія", що вивчається у рамках вивчення біології на позашкільних заняттях з екології. Показна значення лабораторних практикумів для вивчення практичних тем з біології та екології, зокрема для з'ясування токсичності поллютантів, з'ясування шляхів їх потрапляння та міграції у біотопах. Продемонстровано можливість оцінки фіто-, цитотоксичності і кластогенності деяких солей кадмію, нікелю та купруму з використанням біологічних тестів при роботі біологічних гуртків.

1. Лабораторні заняття при вивченні біології є однією з основних і найбільш ефективних форм організації навчання і дозволяють учням зрозуміти ключові механізми функціонування живих організмів, концепції структурної організації різномісцевих біологічних систем, внутрі- та міжсистемні зв'язки, вразливість і стійкість природних систем щодо зовнішніх впливів, зокрема антропогенної трансформації довкілля, здатні найбільш повно реалізувати розвиваючі задачі навчання. Вони сприяють формуванню вмінь і навичок учнів, учать їх плануванню своєї діяльності і здійсненню самоконтролю.
2. Кожне лабораторне заняття переслідує виховну і розвиваючу цілі. На лабораторному занятті учень повинен поглибити теоретичні знання, перевірити їх на практиці, а також й розвивати мислення, логіку, увагу, творчі здібності.
3. Апробовані для педагогічної практики і представлені у дипломній роботі методики оцінки токсичності солей важких металів є цінними з позиції поглиблення учнями набутих теоретичних знань, підвищення інтересу учнів до біології, а також можуть з успіхом застосовуватися в

учівських наукових роботах й екологічних проектах. Результати експериментальних досліджень подані нижче.

4. Хлориди, нітрати та сульфати кадмію, нікелю та купруму володіють фітотоксичним ефектом що проявляється у ростовому тесті з *Lepidium sativum* пригніченням проростання насіння у 17-25 раз та інгібіцією ростових процесів у 2-7 разів. Фітотоксичність солей ВМ зростає прямо пропорційно їх концентрації у водному розчині.

5. Токсичність солей ВМ визначається в основному впливом катіонів, а аніони проявляють менш помітну дію. Фітотоксичність спадає у ряді: $\text{Cd}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Ni}^{2+}$.

6. За значеннями інтегрального коефіцієнта можна подувати наступний ряд фітотоксичності досліджених солей ВМ:

Для низьких концентрацій (0,1 мг/л):

CdSO_4 (0,62) $\rightarrow$ CdCl_2 (0,57) $\rightarrow$ $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (0,56) $\rightarrow$ $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ (0,51) $\rightarrow$ NiSO_4 (0,46) $\rightarrow$ NiCl_2 (0,43) $\rightarrow$ CuSO_4 (0,37) $\rightarrow$ $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (0,36) $\rightarrow$ CuCl_2 (0,31).

Для середніх концентрацій (1,0 мг/л):

$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (1,00) = CdSO_4 (1,00) = NiSO_4 (1,00) $\rightarrow$ CdCl_2 (0,91) $\rightarrow$ CuCl_2 (0,84) $\rightarrow$ $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (0,81) = CuSO_4 (0,81) $\rightarrow$ NiCl_2 (0,76) $\rightarrow$ $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ (0,71).

Максимальним інгібуючим ефектом відзначається сумісна дія $\text{CdSO}_4 + \text{Cu SO}_4 + \text{NiSO}_4$ у концентрації 0,1 мг/л

6. Хлориди кадмію, нікелю та купруму мають виражений цитотоксичний ефект, який проявляється зниженням проліферативної активності у 1,4-7,4 рази прямо пропорційно концентрації солі у розчині. Цитотоксичність катіонів досліджених солей ВМ спадає у ряді: $\text{Cd}^{2+} \rightarrow \text{Ni}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$. Сумісна дія

досліджених солей спричинює зміну співвідношення тривалості основних фаз мітозу та деяке зростання мітотичного індексу.

7. Мікроядерний тест із використанням *Allium cepa* та ростовий тест із використанням *Lepidium sativum* є найбільш високочутливими і зручними й можуть бути рекомендовані до застосування для скринінгу ВМ у довкіллі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Богуславська Л. Вплив іонів важких металів на мітотичний індекс апікальної меристеми кореня кукурудзи (*Zea mays* L.) / Л. Богуславська, А. Тихомиров // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2005. – Вип. 40. – С.160 – 165.
2. Гливляс Н. В. Вплив важких металів на ріст рослин та вміст хлорофілу в листках *Lotus corniculatus* L. / Н. В. Гливляс, В. І. Ніколайчук // Наук. вісник Ужгород. ун-ту. Серія біологічна. – 2001. – Вип. 9. – С. 311 – 313.
3. Горова А. І. Цитогенетична оцінка мутагенної дії хлориду кадмію і хлориду алюмінію та модифікуючої дії селеніту натрію у кореневих меристемах *Pisum sativum* L. / А. І. Горова, Є. Д. Стрельченко, С. С. Руденко // Цитологія і генетика. – 1999. – Т. 33, № 3. – С. 52 – 56.
4. Довгалюк А. І. Токсична дія іонів металів на ріст та мітотичну активність клітин коренів цибулі *Allium sera* L. / А. І. Довгалюк, Т. Б. Калиняк, Я. Б. Блюм // Доп. НАН України. – 1998. – Т. 35, № 6. – С. 175 – 178.
5. Ковальчук Л. Є. Оцінка генетичного ефекту дії факторів хімічного виробництва / Л. Є. Ковальчук, В. М. Случик, С. Б. Геращенко // Цитологія і генетика. – 1994. – Т. 28, № 3. – С. 41 – 46.
6. Макаренко Н. А. Контроль за вмістом важких металів у ґрунті / Н. А. Макаренко // Вісник аграрної науки. – 2001. – № 4. – С. 55 – 57. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений [4-е изд., перераб. и доп.]. – М. : Агропромиздат, 1988. – 272 с.
7. Ревега О. Індукція хромосомних аберацій рідкими відходами виробництва Стебницького ДГХП «Полімінерал» у *Allium*-тесті / О. Ревега // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2006. – Вип. 41. – С. 46 – 53.
8. Руденко С. С. Дослідження впливу селеніту натрію на ріст і розвиток стебла та коренів проростків гороху посівного (*Pisum sativum* L.) за дії сполук алюмінію та кадмію / С. С. Руденко // Физиология и биохимия культурных растений. – 1999. – Т. 31, № 3. – С. 233 – 237.

9. Руденко С. С. Загальна екологія. Практичний курс : навч. посібник [для студ. вищ. навч. закл.]. Ч. 2. Природні наземні екосистеми / С. С. Руденко, С. С. Костишин, Т. В. Морозова. – Чернівці : Книги – ХХІ, 2008. – 308 с.
10. Случик В. М. Комплексна оцінка мутагенного фону, зумовленого малоінтенсивними факторами хімічного виробництва (експериментально-популяційне дослідження) : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук : спец. 03.00.15 «Генетика» / В. М. Случик. – К., 1996. – 26 с.
11. Фоновий вміст мікроелементів в ґрунтах України / [ред. А. І. Фадєєв, Я. В. Пашенко]. – Харків, 2003. – 117 с.
12. Baker A. J. Physiological responses of plants to heavy metals and the quantification of tolerance and toxicity / A. J. Baker, P.L. Walker // *Bioavailability*. – 1989. – № 1. – P. 7 – 17.
13. Bortlyn G. P. Botanical microtechnique and cytochemistry / G. P. Bortlyn, J. P. Miksche. – Ames: Iowa State University Press, 1996. – 326 p.
14. Deknudt Gh. Mutagenicity of heavy metals / Gh. Deknudt // *Mutat. Res.* – 1978. – Vol. 53, № 1. – P. 176 – 178.
15. Fiskesj G. Allium test // *Methods in Molecular Biology* – 43. *in vitro* Toxicity Testing Protocols / Ed. S. o'Hare and C. K. Atterwill. – Totowa ; NJ: Cpyringht Humana Press Inc. – 1995. – P. 119 – 127.
16. Gunstone, R.F. (1991). Reconstructing theory from practical experience. In: BE Wollnough (Ed.) *Pratical Science*, Milton Keyes, Open University Press, pp- 67-77.
17. Handelsman, J., Ebert-May, D., Beichner, R., Bruns, P., Chang, A., DeHaan, R., Gentil, J., Lauffer, S., Stewart, J., Tilghman, S., &Wood, W. (2004). Policy Forum: Scientific teaching. *Science* 304, 521-522.
18. Hofstein, A. &Lunetta, V. (2004). The laboratory in science education: Foundations for the twenty-first century. *Science education* 88 (1), 28-54.