

Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение  
«Лицей №2» г. Чебоксары Чувашской Республики

Всероссийский конкурс юных исследователей окружающей среды

Номинация «Ландшафтная экология и геохимия»

**Индикация состояния окружающей среды по частотам  
встречаемости фенов Клевера белого (*Trifolium repens*)**

Автор работы:

Кузьмина Екатерина Алексеевна, 11 класс,  
МБОУ «Лицей №2»,

г. Чебоксары Чувашской Республики

Научный руководитель:

Тихонова Лариса Александровна, учитель  
биологии МБОУ «Лицей №2»

г. Чебоксары Чувашской Республики

2019 г.

## Содержание

Введение.....	3
Глава 1. Обзор литературы по теме исследования.....	5
1.1 Анализ сложившейся экологической ситуации.....	5
1.2 Понятие «биоиндикация».....	5
1.3 Определение биоиндикатора.....	6
Глава 2. Ход исследования.....	8
2.1 Методика исследования.....	8
2.2 Результаты исследования.....	8
2.3 Обсуждение результатов исследований.....	9
Выводы и рекомендации.....	13
Список литературы:.....	14
Приложение № 1.....	15

## Введение

Почвенный покров Земли - важнейший компонент биосферы, так как он определяет многие процессы, происходящие в ней. Важнейшее значение почв состоит в накоплении органического вещества, различных химических элементов, а также энергии. В почве происходит биологическое поглощение, разрушение и нейтрализация различных загрязнений. Но одной из существенных проблем в настоящее время является проблема загрязнения и деградации почв. За последние 25 лет площади сельскохозяйственных угодий сократились на 33 млн га, несмотря на ежегодное вовлечение в сельскохозяйственный оборот новых земель[1]. Загрязняющие вещества, выделяемые транспортом, промышленными предприятиями, при захоронении радиоактивных отходов, накапливаются в почве и оказывают отрицательное влияние на ее экологическое состояние.

Поэтому чрезвычайно **актуальным** является использование быстрых и эффективных методов биологического мониторинга загрязнения почв. Для изучения реакции видов воздействия окружающей среды удачным является метод, разработанный А.В. Яблоковым «фенетический подход», который основан на выделении и учете частот дискретных, альтернативных, наследственно обусловленных признаков фенотипа[2]. Оценить состояние среды и степень антропогенного воздействия можно с помощью фенотипических индикаторов, среди которых, одним из наиболее распространенных в городских экотопах, является Клевер белый (Клевер ползучий) (*Trifolium repens*).

**Целью** нашей работы стало исследование экологического состояния почв некоторых районов города Канаш Чувашской Республики по частотам встречаемости фенотипов клевера белого.

В ходе работы над проектом были поставлены следующие **задачи**:

1. Познакомиться с методикой индикации состояния окружающей среды по частотам встречаемости фенотипов Клевера белого (*Trifolium repens*), предложенной Т.Я Ашихминой[3].
2. Дать оценку уровня антропогенной напряженности загрязнения почв по частотам встречаемости фенотипов Клевера белого (*Trifolium repens*).
3. Определить наиболее загрязненные места города и провести исследование.
4. Составить рекомендации об эффективности данного метода биоиндикации.

**Гипотеза исследования:** Клевер белый (*Trifolium repens*) может быть использован в качестве фенотипического биоиндикатора экологического состояния почв на основании того, что на экологически напряженных территориях под воздействием антропогенных факторов окружающей среды естественный отбор и мутационный процесс приводят к расширению наборов фенотипов, увеличению частоты их встречаемости и появлению в популяциях специфических «городских» фенотипов. Поэтому мы предположили, что самым чистым

будет район вблизи леса на окраине города, максимально отдаленный от дорог, железнодорожных путей и промышленных предприятий, а самой загрязненной будет территория вблизи железнодорожного вокзала с высокой степенью антропогенной нагрузки.

**Объект исследования:** Клевер белый (Клевер ползучий) (*Trifolium repens*).

**Предмет исследования:** форма седого рисунка на пластинках листа Клевера белого (*Trifolium repens*).

**Практическая значимость работы** состоит в быстрой оценке состояния почв на исследуемой территории, чтобы донести результаты до общественности, жителей города Канаш.

**Новизна работы** состоит в том, что в городе Канаш еще не использовалась методика определения степени загрязненности почвы с использованием растения Клевер белый (*Trifolium repens*).

**Экологические риски:** в случае нарушения функционирования почвы нарушится сложившееся функционирование всей биосферы. Именно поэтому чрезвычайно важно изучение глобального биохимического значения почвенного покрова, его современного состояния и изменения под влиянием антропогенной деятельности.

## Глава 1. Обзор литературы по теме исследования

### 1.1 Анализ сложившейся экологической ситуации.

Человек оказывает существенное влияние на состояние литосферы, где наибольшую антропогенную нагрузку испытывает её поверхностный слой – почва. По оценкам специалистов, наряду с зелёными насаждениями почва – один из главных природных компонентов, поддерживающих необходимое для сохранения здоровья человека состояние окружающей среды. «Живые» почвы поглощают и утилизируют 70-80% окиси углерода и 80-85% диоксида серы и служат естественным фильтром загрязнений, поступающих на её поверхность из различных источников. Однако в настоящее время в городах вместо «живых» почв имеются «урбанозёмы - генетически самостоятельные почвы, обладающие как чертами зональных почв, так и специфическими свойствами» (Строганова, 1997).

Наиболее крупные источники химического загрязнения почвы - это загрязнения, выпадающие с атмосферными осадками; хранилища сырья и отходов промышленных предприятий; утечки из инженерных сетей и сетей жилищно-коммунального хозяйства; полигоны и свалки промышленных и бытовых отходов. К отчуждению и загрязнению больших территорий ведут прокладка автомобильных и железнодорожных трасс, строительство зданий и сооружений, создание полей фильтрации [3]. Таким образом, состояние загрязнения почвы и степень антропогенного воздействия, можно оценить с использованием методов *биологической индикации*.

### 1.2 Понятие «биоиндикация».

Биоиндикация — оценка качества среды обитания и её отдельных характеристик по состоянию биоты в природных условиях [4]. Также можно дать другое определение: биоиндикация – определение биологически значимых нагрузок на основе реакций на них живых организмов и их сообществ (Криволицкий Д.А., 1988). «Основной задачей биоиндикации является разработка методов и критериев, которые могли бы адекватно отражать уровень антропогенных воздействий с учетом комплексного характера загрязнения и диагностировать ранние нарушения в наиболее чувствительных компонентах биотических сообществ» [5]. Организмы или сообщества организмов, жизненные функции которых так тесно коррелируют с определёнными факторами среды, что могут применяться для их оценки, называются биоиндикаторы [4]. Растения могут служить индикаторами загрязнённости почв, так как резко реагируют на изменение внешних условий. В зависимости от характера почвенного покрова наибольшее распространение получают те или иные виды растений. Отрицательные воздействия выхлопных газов автомобилей на некоторых растениях настолько отчетливы, что их с успехом можно использовать для

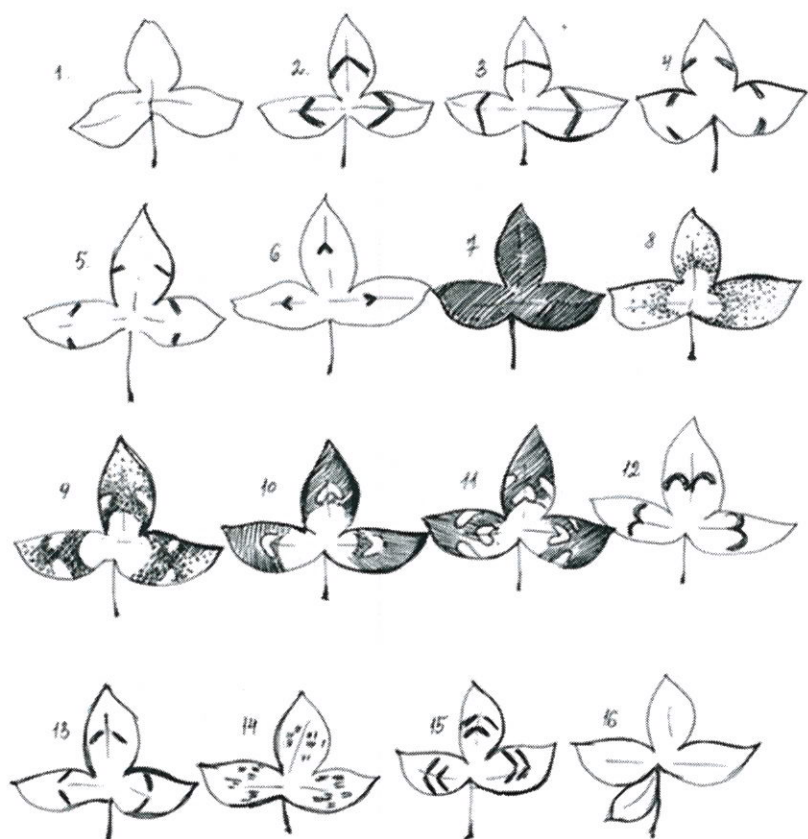
обнаружения опасной для людей концентрации этих газов. Засыхание концов листьев, изменение окраски, появление белых пятен на листовых пластинах, замедление роста растений свидетельствует о присутствии в окружающей среде опаснейших загрязнителей. В связи с этим, оценить состояние окружающей среды и уровень антропогенного воздействия можно и по фенотипу биоиндикаторов[5]. Имеет место Фенотипическая адаптация – свойство организма изменять свои биологические параметры при постоянно изменяющихся условиях внешней среды для обеспечения устойчивости неравновесного термодинамического состояния [6].

Фен - элементарный наследственный признак, альтернативные формы которого (например, гладкие и морщинистые семена гороха) наследуются по моногибридной схеме (менделирующие признаки). Фен — элементарная единица фенотипа. [7]. Фены отражают генотипические особенности организмов и проявляются как морфологически, так и физиологически. Биоиндикатором в данном случае будет частота встречаемости фенов, так как она увеличивается под действием антропогенных факторов в популяциях.

### **1.3 Определение биоиндикатора.**

В качестве фенотипического вида-биоиндикатора можно использовать Клевер белый (*Trifolium repens*), так как его популяции фенотипически отличаются наличием разной формы и размера «седого» пятна на листьях (рис.1). Также этот вид имеет высокую численность, отличается быстрой сменой фенов и удобен для сбора проб. Клевер белый (*Trifolium repens*) может быть использован в качестве биоиндикатора экологического состояния почв и на основании того, что на экологически напряженных территориях под воздействием антропогенных факторов окружающей среды естественный отбор и мутационный процесс приводят к расширению наборов фенов, увеличению частоты их встречаемости и появлению в популяциях специфических «городских» фенотипов[8].

В многовидовых сообществах клевер белый (*Trifolium repens*) подавляется представителями других видов, что в конечном итоге приводит к возникновению своеобразного равновесия. В экологически чистых местообитаниях лучше абиотические условия, но острее ценотический стресс. В загрязненных местообитаниях при наличии действия токсических эффектов присутствия загрязнителей разнообразной природы практически полностью снята конкуренция. В результате отсутствуют какие-либо причины для изменения вектора отбора или возникновения резких пластических реакций со стороны исследуемых особей. Это также обуславливает возможность использования вида Клевер белый (*Trifolium repens*) в качестве фенотипического биоиндикатора оценки состояния окружающей среды и уровня антропогенного воздействия.



**Рис.1. Фенотипы растения Клевер белый *Trifolium repens***

Гистологические исследования показали, что «серые» пятна связаны с особой группой палисадных клеток, в которых хлоропласты отсутствуют или содержатся в меньшей концентрации. При этом палисадные клетки в районе пятна уменьшены в размерах, менее вытянуты, пространство между ними оказывается большим, чем в зеленой части листа. Сходные пятна встречаются и у других видов клевера, например красного. Возникновение пятен обусловлено различной скоростью роста эпидермальных и палисадных клеток. Последние подвергаются более сильному действию света, ведущего к разрушению хлорофилла, что приводит к появлению пятен[9].

В качестве тест-объектов могут быть использованы и другие виды рода Клевер, например, клевер гибридный (розовый) (*Trifolium hybridum* L.), клевер красный (луговой) (*Trifolium pratense* L.), так как в основе использования этих видов в качестве биоиндикаторов лежат вариации фенов, раскрывающих особенности формы и расположения «седого» пятна их листьев.

## Глава 2. Ход исследования

### 2.1 Методика исследования.

Для проведения исследования была использована методика, предложенная Т.Я. Ашихминой [2]. Данная методика основана на выделении «седого» пятна на листьях Клевера белого (*Trifolium repens*), форма которого и частота встречаемости разных фенов могут варьировать (рис. 1).

**Место и время проведения исследования:** исследование проводилось в июне-ноябре 2019 года в городе Канаш.

### 2.2 Результаты исследования.

1. Определили районы исследований (учетных площадок) с различной степенью антропогенного влияния. Для этого:

- 1) Выбрали участки, на которых в дальнейшем проводилась работа;
- 2) Подготовили маршрут движения, по которому проводилось исследование.

Диагностику, согласно методике, проводили на разных пробных площадках, различающихся антропогенной нагрузкой и положением в ландшафте. В каждом учетном районе выбрали по 10 пробных площадок. Отсчеты фенов проводили через два — три шага. Эта процедура повторялась по ходу движения в заданном направлении до конца пробной площадки. После этого направление движения меняли, и подсчет продолжали до тех пор, пока не сделали 200 отсчетов. Если в какой-либо точке площадки обнаруживались два разных фена, то данный результат не учитывался ввиду переплетения куртинок.

2. Собрали материал.

С каждой площадки выборка растений составила 200 особей. Обнаружив экземпляр Клевера белого (*Trifolium repens*) (обычно в виде куртинки), определяли фенотип, к которому он относится (рис. 1), и делали отметку в соответствующей графе рабочей таблицы (табл. 1).

При обнаружении в исследуемых районах фенов, не указанных на рис.1, результаты вносятся в графу «новые формы».

3. Провели статистическую обработку полученных данных

1) Для популяции Клевера белого (*Trifolium repens*) в каждом районе рассчитали частоту встречаемости отдельных фенов  $P$  по формуле:

$$P_i = (100 * N_i) / N,$$

где  $P_i$  – частота  $i$ -го фена,

$N_i$  – количество учтенных растений с  $i$ -м рисунком на листовой пластинке,

$N$  – общее число учтенных растений.

- 2) Рассчитали суммарную частоту встречаемости всех форм с рисунком (индекс соотношения фенов, ИСФ) в % по формуле:

$$\text{ИСФ} = 100 \cdot (n_2 + n_3 + \dots) / N,$$

Где  $n_i$  – число растений без «седого рисунка –  $n_2, n_3, \dots$ ),

$N$  – общее число учтенных растений.

На чистых территориях величина ИСФ не превышает 30%, а на загрязненных территориях ИСФ может достигать 70-80%[2].

- 3) Оценили степень загрязненности почв.

Оценочная шкала по значению ИСФ:

- До 20-30% – очень чистые почвы;
- 31-40% – удовлетворительное состояние
- 41-60% – средняя степень загрязнения;
- 61-80% – сильное загрязнение;
- 81-100% – очень сильное загрязнение.

- 4) Провели сравнительный анализ исследуемых территорий по частоте встречаемости отдельных фенов. Сравнили исследуемые территории по полученным данным и выявили самые часто встречаемые фены в данных районах.

- 5) Провели сравнительный анализ исследуемых территорий по величине ИСФ.

- 6) Определили размах вариации, то есть нашли разницу между максимальным и минимальным значением ИСФ по формуле:  $R = x_{\max} - x_{\min}$ ,

где  $R$  – размах вариации,

$x_{\max}$  – максимальное значение признака,

$x_{\min}$  – минимальное значение признака.

### 2.3 Обсуждение результатов исследований

1. Мы заложили по 10 учетных площадок (1\*1 м) в трех районах города Канаш (рис.2):

- Район №1 – Восточный район на окраине города Канаш вблизи леса, где расположены дачные участки большинства горожан. Он отдален от автомобильных дорог и железнодорожных путей. Вблизи не располагаются промышленные предприятия.

- Район №2 – район в центральной части города Канаш рядом с железнодорожными путями вдоль улицы Железнодорожная. Участок с высокой антропогенной нагрузкой.

- Район №3 – спальный район по улице Чапаева в юго-восточном районе города Канаш. Испытывает минимальную нагрузку, т.к. отдален от заводов и фабрик, рядом не проходят железнодорожные пути, но имеется автомобильная дорога.

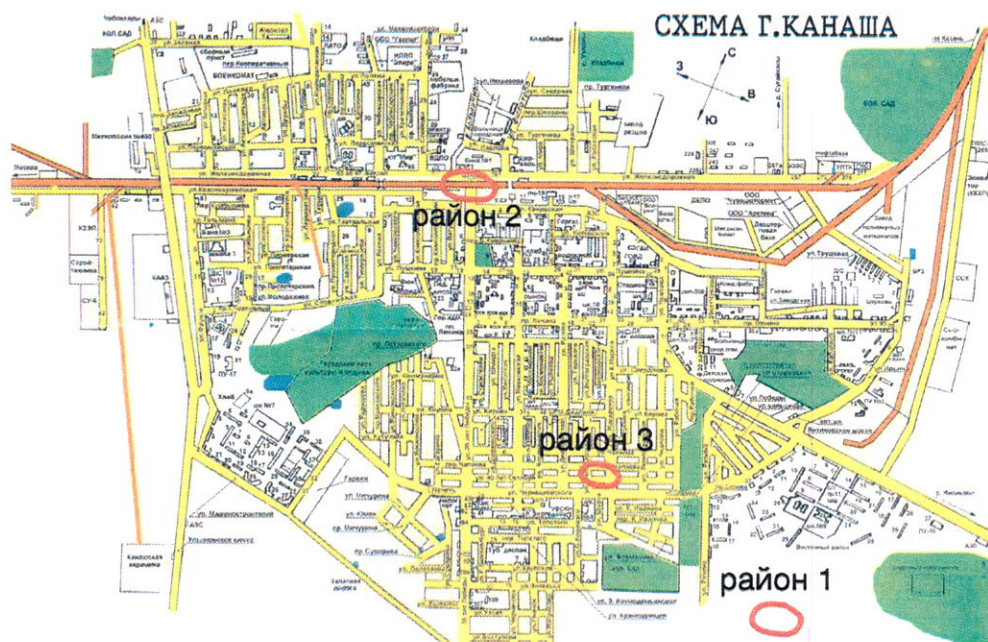


Рис.2. Схема города Канаш с отметкой трех учетных районов

2. Выбрали в каждом районе в целом 200 растений на 10 пробных площадках.
3. Определили фенотипы Клевера белого (*Trifolium repens*) по форме «седого» пятна на листьях по рис.1, вычислили количество встречаемых фенов и полученные результаты занесли в таблицу 1 и таблицу 2.

Таблица 1. Учет фенов Клевера белого (*Trifolium repens*) в исследуемых районах.

района	Фен 1	Фен 2	Фен 3	Фен 4	Фен 5	Фен 6	Фен 7	Фен 8	Фен 9	Фен 10	Фен 11	Фен 12	Фен 13	Фен 14	Фен 15	Фен 16	Новая форма
1	146	50	4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2	50	111	17	9	6	–	–	–	–	–	–	–	7	–	–	–	–
3	124	49	11	7	3	–	–	–	–	–	–	–	6	–	–	–	–

4. Для популяции клевера на каждой пробной площадке рассчитали частоту встречаемости отдельных фенов Р. Полученные результаты отражены на диаграмме 1, диаграмме 2, диаграмме 3 и в таблице 3.

Диаграмма 1. Частоты встречаемости Фена 2 (P2) для популяции Клевера белого (*Trifolium repens*) на каждой учетной площадке.

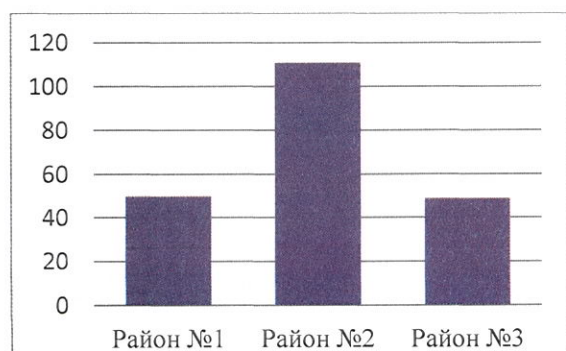


Диаграмма 2. Частоты встречаемости Фена 3 (P3) для популяции Клевера белого (*Trifolium repens*) на каждой учетной площадке.

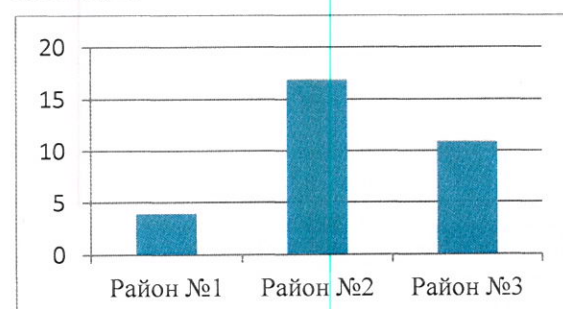
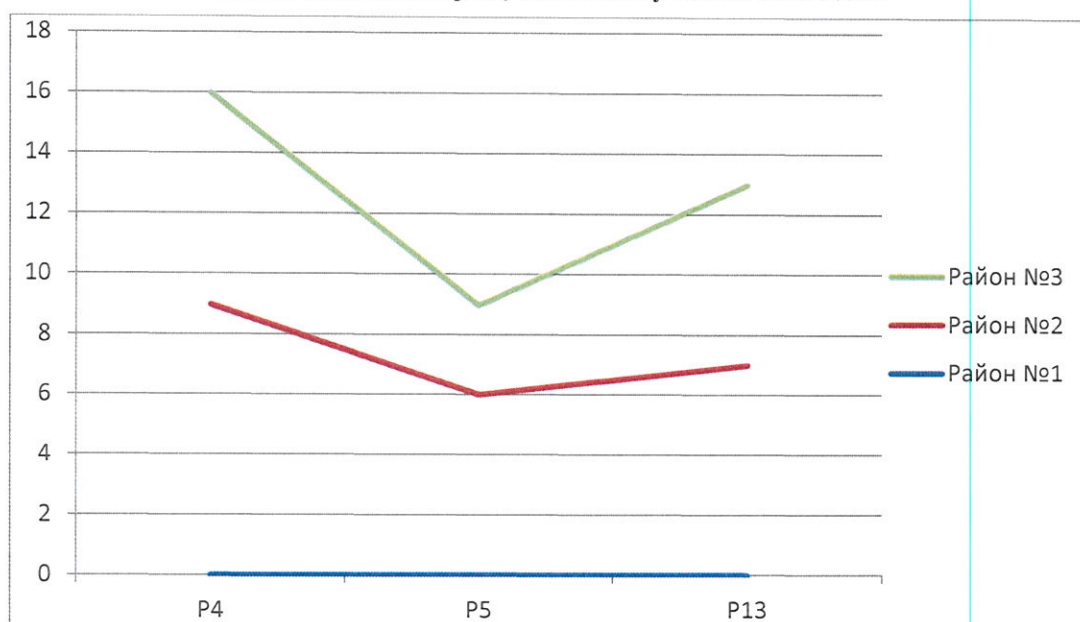
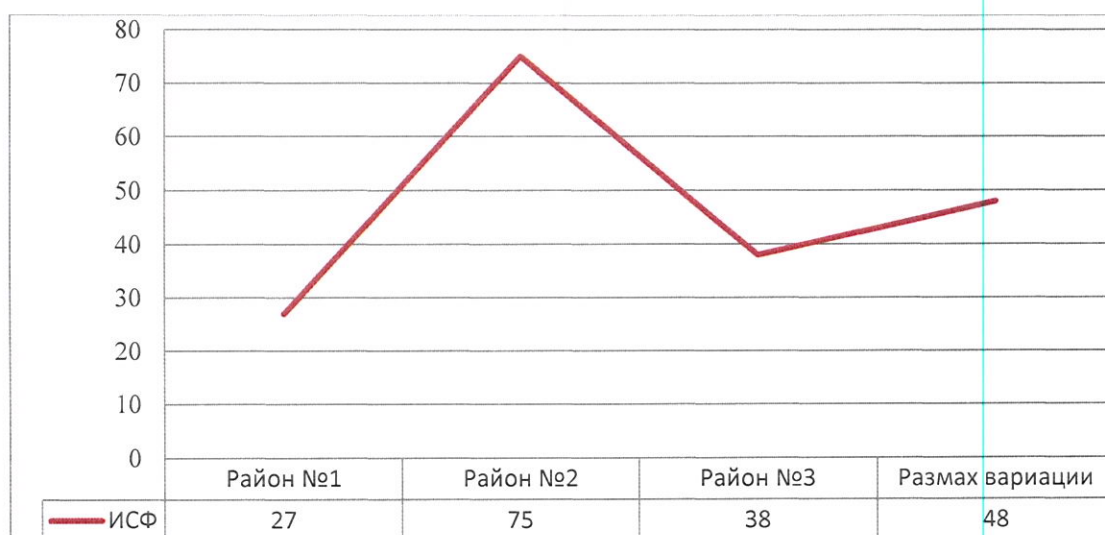


Диаграмма 3. Частоты встречаемости Фена 4 (P4), Фена 5 (P5) и Фена 13(P13) для популяции Клевера белого (*Trifolium repens*) на каждой учетной площадке.



Также мы рассчитали суммарную частоту встречаемости всех форм с рисунком (индекс соотношения фенов, ИСФ) в % и нашли размах вариации, то есть разницу между максимальным и минимальным значением. Полученные результаты отражены на диаграмме 4 и занесены в таблицу 3.

Диаграмма 4. Суммарная частота встречаемости всех форм с рисунком (индекс соотношения фенов, ИСФ(%)).



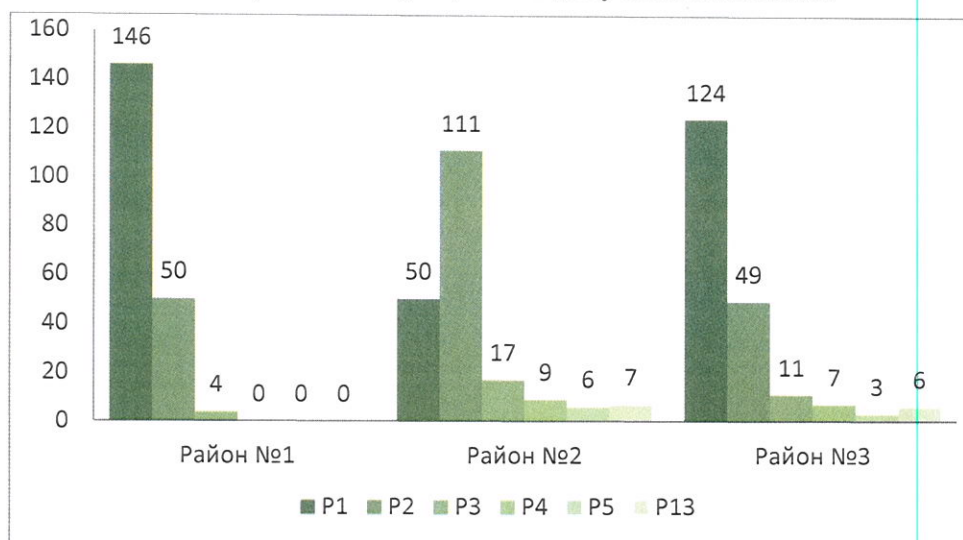
По значению ИСФ оценили степень загрязненности почв и отразили результаты в таблице 2 и занесли в таблицу 3.

Таблица 2. Степень загрязненности почв.

№ площадки	Степень загрязненности почв
Район №1	Очень чистые почвы
Район №2	Сильно загрязненные почвы
Район №3	Удовлетворительное состояние почв

5. Сравнили исследуемые территории по полученным данным и выявили самые часто встречаемые фены в данных районах. Полученные результаты отразили на диаграмме 5.

**Диаграмма 5. Частоты встречаемости всех фенов для популяции Клевера белого (*Trifolium repens*) на каждой учетной площадке.**



По диаграмме видно, что самый распространенный фен в районе №1 это фен 1, в районе №2 фен 2 и в районе №3 - фен 1.

**Таблица 3. Результаты исследования встречаемости фенов для популяции Клевера белого (*Trifolium repens*) во всех исследуемых районах.**

Показатель	Район №1	Район №2	Район №3
Фен 1	146	50	124
Фен 2	50	111	49
Фен 3	4	17	11
Фен 4	0	9	7
Фен 5	0	6	3
Фен 13	0	7	6
ИСФ (%)	27	75	38
Степень загрязненности	Очень чистые почвы	Сильно загрязненные почвы	Удовлетворительное состояние почв

6. По итогам проведенных исследований сравнили все три исследуемых района и определили самый чистый и самый загрязненный участки города. Самым чистым оказался Восточный район на окраине города Канаш вблизи леса. А самым загрязненным стал район в центральной части города Канаш рядом с железнодорожными путями вдоль улицы Железнодорожная. Полученные результаты можно объяснить тем, что район №2 находится вблизи дороги и железнодорожных путей, а автомобили и поезда являются источниками выбросов углеводородов, оксидов углерода, азота, серы, свинца при сжигании топлива, вследствие чего токсичные вещества попадают и в почву. А в районе №1 не проходит

никаких дорог, железнодорожных путей, она находится вдалеке от промышленных предприятий и заводов. Район №3 это тихий спальный район, который также отдален от заводов и фабрик, но по нему пролегают автомобильные дороги. Отсюда можно сказать, что выдвинутая нами гипотеза подтвердилась.

### **Выводы и рекомендации**

1. Проведя исследование, можно сделать вывод, что одним из наиболее доступных методов оценки состояния окружающей среды является использование фенотипических биоиндикаторов. На практике представленный метод изучения экологического состояния почв с использованием растения Клевер белый (*Trifolium repens*), предложенный Ашихминой Т.Я.[2] оказался довольно простым и быстрым в использовании.
2. Дали оценку уровня загрязнения почв по частотам встречаемости фенов Клевера белого (*Trifolium repens*). Определили, что в районе №1, т.е. в Восточном районе на окраине города Канаш вблизи леса, очень чистые почвы по величине ИСФ. Также в районе №2 в центре города сильно загрязненные почвы, а в районе №3, в жилом районе по улице Чапаева, состояние почв удовлетворительное.
3. По проведенным исследованиям определили, что самой загрязненной территорией города является район в центральной части города Канаш рядом с железнодорожными путями вдоль улицы Железнодорожная. Это можно объяснить тем, что район №2 находится вблизи дороги и железнодорожных путей, а автомобили и поезда являются источниками выбросов углеводородов, оксидов углерода, азота, серы, свинца при сжигании топлива, вследствие чего токсичные вещества попадают и в почву. Выдвинутая нами **гипотеза подтвердилась** по итогам проведенной работы.
4. Экологическое состояние почвы было исследовано только в некоторых участках города Канаш, в дальнейшем с помощью данной методики предполагается исследовать другие районы города и прилегающие к нему территории. В качестве рекомендации данного метода об эффективности индикации с помощью растения Клевер белый (*Trifolium repens*) нужно отметить то, что он является быстрым и достоверным, поскольку выдвинутая гипотеза подтвердилась, и полученные результаты можно обосновать расположением районов относительно дорог, железнодорожных путей, промышленных предприятий и заводов.

### Список литературы:

1. Земельный фонд Российской Федерации. Сведения о наличии и распределении земель по категориям и формам собственности (на 1 января 2018 года, тыс. га)
2. Ашихмина Т.Я. Экологический мониторинг: Учебно-методическое пособие. – М.: Академический проект, 2005
3. Яблоков А.В. Введение в фенетику популяций. – М.: Высшая школа, 2000
4. Экология городов. Загрязнение почв, воды и воздуха Будрейко Е. Н.
5. Кондакова, Г.В. Биоиндикация. Микробиологические показателя-К 64 тели: учеб. пособие / Г.В. Кондакова ; Яросл. гос. ун-т. – Яро- славль: ЯрГУ, 2007. – 136 с. ISBN 978-5-8397-0577-7.
6. Биоиндикация и ее место в системе мониторинга окружающей среды Рассадина Е.В. к.б.н., УлГУ
7. Евсеева Т.И., Егорова Е.И., Мелехова О.П. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование. – М.: Центр Академия, 2007. – 288с.
8. Биоиндикация и экодиагностика территорий. Учебно-методическое пособие. Краткий конспект лекций. / Составитель к.б.н., ст. преп. Замалетдинов Р.И. – Казань: Казанский университет, 2015. – 45 с.
9. Валиев Р.Р. Сравнительная характеристика наследственного полиморфизма по признаку «седого» пятна на листьях растений в популяциях *Trifolium repens* на территории г.Уфы и некоторых районов Республики Башкортостан. – Вестник башкирского университета, 2008. – Т.13. – №2
10. Шварцман П.Я. Полевая практика по генетике с основами селекции. – М.: Просвещение, 1986

Приложение № 1. Фотографии популяций растения Клевер белый (*Trifolium repens*) в исследуемых районах.



Рис.3. Клевер белый (*Trifolium repens*) в районе №1.



Рис.4. Клевер белый (*Trifolium repens*) в районе №1.



Рис.5. Клевер белый (*Trifolium repens*) в районе №2.



Рис.6. Клевер белый (*Trifolium repens*) в районе №3.