

环境生态学

实验指导

杨桂英 熊好琴 赵洋毅◎主编

Experiment Guide of
Environmental Ecology

中国农业出版



环境生态学实验指导

杨桂英 熊好琴 赵洋毅 主编

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

环境生态学实验指导 / 杨桂英, 熊好琴, 赵洋毅主
编. —北京: 中国农业出版社, 2017. 9
ISBN 978-7-109-22463-6

I. ①环… II. ①杨… ②熊… ③赵… III. ①环境生
态学—实验—教学参考资料 IV. ①X171-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2017) 第 165263 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码 100125)

策划编辑 廖 宁

文字编辑 李兴旺

北京万友印刷有限公司印刷 新华书店北京发行所发行
2017 年 9 月第 1 版 2017 年 9 月北京第 1 次印刷

开本: 700mm×1000mm 1/16 印张: 6.25

字数: 180 千字

定价: 28.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

编写人员名单

主 编 杨桂英 熊好琴 赵洋毅

副主编 侯 磊

编写人员 (按姓氏笔画排序)

王 妍 刘云根 杨桂英

郑 寒 赵洋毅 侯 磊

熊好琴

前言

环境生态学是 20 世纪 70 年代发展起来的一门交叉学科,是研究生物与干扰环境之间相互作用规律及机理的科学,是环境科学专业的重要基础课程。通过学习,学生可了解生物在受干扰环境下的生态表现、影响及对环境的适应和净化,熟悉环境生态学的理论基础、研究范畴、前沿领域,掌握环境生态学的研究方法。通过环境生态学实验,可加深学生对课程体系和理论知识的理解,掌握实验基本操作技能,提高学生实践能力,培养学生创新思维。

本书是在西南林业大学环境生态学重点课程建设过程中积累形成的实验和实践教学资料的基础上进行系统梳理后编写的。为了提高实验操作的针对性,从细胞层次、生理层次、个体层次、种群层次以及群落和生态系统层次分别设计实验。当然,这种划分只是相对的,因为任何一个生物学现象都不会仅仅局限在一个生物学层次发生,而是生物体或群体综合表现的结果,至少也受其上一层次或下一层次的影响。另外,本教材编写人员均为多年从事环境生态学、普通生态学、污染生态学等研究及教学的一线骨干。在编写过程中,力求所涉及的实验文字简练、过程清晰、易读性好、可操作性强。学生通过预习,可初步掌握环境生态学实验基本概念、原理和方法。

本书的出版得到了云南省生态学一流学科建设项目的资助,曹光秀、吴恒超同学参与了部分书稿的编写工作,在此表示感谢。

书中参考和引用了众多专家、学者和科研院所的成果资料,因

篇幅有限，除注明出处的部分外，其他未能一一说明，在此谨向有关作者和单位致以诚挚的谢意！由于编者水平有限，书中难免有不妥或疏漏之处，敬请广大读者批评指正。

编 者

2017年5月

目 录

前言

第一章 细胞水平的实验 1

实验一 采用蚕豆根尖微核技术检测致突变污染物 1

实验二 重金属复合污染对植物微核产生的诱变效应 4

实验三 污染水体诱发紫露草产生微核的实验 7

第二章 生理水平的实验 10

实验四 不同程度大气污染对植物叶片叶绿素 a、叶绿素 b
含量的影响 10

实验五 重金属 Pb 对植物叶片叶绿素含量的影响 12

实验六 改良半叶法测定植物光合速率 14

实验七 采用便携式光合仪测定植物光合速率 17

实验八 重金属对植物 SOD 活性的影响 24

实验九 水生植物对重金属的富集作用 27

实验十 利用发光细菌快速测定水体的生物毒性 30

实验十一 低温对植物叶片细胞膜透性的影响 32

第三章 个体水平的实验 34

实验十二 环境污染物 Hg 对种子萌发的影响 34

实验十三 模拟污水灌溉对小麦萌芽率的影响 36

实验十四 土培与沙培条件下重金属污染对幼苗生长的影响 38

实验十五 水培条件下重金属污染胁迫对幼苗生长量的影响 42

实验十六	重金属对植物生物量的影响	44
实验十七	蚯蚓急性毒理实验	46
实验十八	植物根系特征的测定	48
第四章	种群水平的实验	50
实验十九	种群数量大小的模拟观测	50
实验二十	植物种群密度和分布型的野外观测	52
实验二十一	植物种群空间分布格局的测定	55
实验二十二	植物热值的测定	57
实验二十三	植物种群生殖分配的测定	60
实验二十四	大型水生植物对污水的净化作用	62
实验二十五	微生物吸附法去除重金属	65
实验二十六	植物化感作用的验证实验	67
第五章	群落与生态系统水平的实验	70
实验二十七	草本植物群落的生物量测定	70
实验二十八	植物群落多样性分析	72
实验二十九	校园常见植物叶面滞尘效果比较	76
实验三十	重金属在水生食物链中的积累	78
实验三十一	水域生态系统中氮、磷对藻类生长的影响	83
实验三十二	生态环境影响评价	86
主要参考文献		90

第一章

胞水平的实验

实验一 采用蚕豆根尖微核技术 检测致突变污染物

一、实验目的

1. 掌握蚕豆根尖微核实验的基本操作方法。
2. 了解植物微核实验用于检测环境“三致”物质的原理。

二、实验原理

生物细胞中的染色体在复制过程中常会发生一些断裂，在正常情况下，这些断裂绝大多数能自己修复。如果生物细胞在早期减数分裂过程中受到辐射或环境中其他诱变因子的作用，细胞染色体 DNA 受到损失，引起染色体断裂形成断片，由于减少了着丝点，不能随纺锤丝移动到细胞两极而游离在细胞质中。当新细胞形成时，这些断片就形成了大小不等与主核颜色一致的圆形结构，分布在主核的周围，成为微核。

微核是生物细胞染色体畸变类型之一。微核率和个体分布可反映外界环境因素损伤染色体的程度。采用微核监测技术可以预测和评价环境污染物对生物潜在危害。

由于蚕豆根尖细胞的染色体大、DNA 含量多、对诱变剂反应敏感，所以常选用蚕豆根尖细胞作为实验材料。

三、实验准备

1. 实验材料 蚕豆种子。
2. 实验仪器 光学显微镜、试管（10 mL）×2、蚕豆发芽盒、镊子、单面刀片、载玻片、盖玻片、滤纸等。
3. 实验试剂

(1) 环磷酰胺。用其与水可溶剂配制系列溶液：0（对照）、5%、10%、20%。

(2) 卡诺氏液。将乙醇和冰醋酸以体积比 3 : 1 的比例混合配制。

(3) 水解分离液。将盐酸与 95% 酒精按 1 : 1 的比例混合。

(4) 改良苯酚品红染液母液。将 3.0 g 碱性品红溶解在 100 mL 70% 乙醇中，以 1 : 9 的比例将其与 5% 苯酚溶液混合，即得到改良苯酚品红染液母液。

(5) 苯酚品红染液。将 45 mL 改良苯酚品红染色母液、6 mL 冰醋酸、6 mL 37% 甲醛混合均匀。

(6) 改良苯酚品红染液。20 mL 苯酚品红染液加入 180 mL 45% 乙酸和 3.6 g 山梨醇，静置 2 周后使用。

四、实验步骤

1. 蚕豆种子的浸种与催芽 将准备好的蚕豆种子，按需要量放入盛有自来水的烧杯，置于 25℃ 的温箱中预热。如室温超过 25℃，即可在室温下进行浸种催芽（约 24 h）。待种子吸胀后，用纱布包裹置解剖盘或烧杯中，保持湿度，在 25℃ 的温箱中催芽 12~24 h，待种子初生根露出 2~3 mm 时，选取发芽良好的种子，放入铺有薄薄一层的湿脱脂棉的解剖盘，仍置于 25℃ 温箱中继续催芽，注意保持湿度。再经过 36~48 h，种子大部分初生根长至 1.5~3.0 cm，根尖发育良好，这时就可用于监测水样或检测药物溶液诱变效应。

2. 染毒与修复培养 每组选择 6~8 粒发芽良好的蚕豆种子，用配制好的不同浓度的环磷酰胺溶液染毒处理 6 h 后（使根尖完全浸入处理水样），取出后用蒸馏水冲洗（3 次，每次 2~3 min），并移至蒸馏水中修复培养 22~26 h（蒸馏水浸没根尖）。

3. 材料固定 借助于物理方法或化学药剂的作用，迅速透入组织和细胞将其杀死，并且使其结构和内含物如蛋白质、脂肪、糖类以及核物质与细胞器等在形态结构上尽可能保持生活时的完整和真实状态，同时更易于染色，可以较清楚地显现细胞在生活时不易看清的结构。吸取约 5 mL 卡诺氏液于 10 mL 试管中，用刀片或小剪刀切取经过处理的长 0.5~1.0 cm 的幼根，放入试管，用试管塞盖紧，室温下固定 20~24 h，固定液的用量为材料体积的 15 倍以上。

4. 水解分离 水解分离的作用是去除细胞内未固定的蛋白质，同时使胞间层的果胶类物质解体，细胞分散而易于观察。用镊子取固定好的蚕豆根尖，放在试管内，加水解分离液 2 mL，室温下处理 8~20 min，倒去水解分离液，再加入固定液 2 mL，软化 5 min，软化对细胞壁起腐蚀作用。然后倒去固定液，用蒸馏水反复冲洗使材料呈白色微透明，以镊子柄轻压能压碎为佳。

5. 染色和压片 切取蚕豆根尖分生组织，放在载玻片上纵横切成几段，

以十字压片法覆以载玻片,用镊子柄或铅笔头轻敲几下,再用拇指用力下压使细胞充分分散,注意不要移动玻片,然后分开两玻片,各滴上1~2滴改良苯酚品红染液,染色20~30 min后加上盖玻片,注意不要产生气泡,最后用吸水纸吸去多余染液。

6. 镜检 在40×10倍显微镜下,凡小于主核1/4以下的,同主核有相同染色效果的,圆形、椭圆形或其他类似形状的染色物质都可以算作微核。每张片子至少镜检20个视野,每个视野计数50个细胞,观察并描述细胞特征,并记录微核个数,3个处理依次进行观察与记录。

7. 数据记录与计算 要求写出每次处理每人计数的微核数及本组平均各处理微核率,记录在表1-1中。微核率的计算,以全班同学的微核数统一计算,每班每处理给出一个微核率,统计平均水平与方差。

$$\text{微核率 (MCN)} = \text{微核个数} / \text{观察细胞总数} \times 100\%$$

表 1-1 植物根尖细胞微核实验记录

实验组: _____ 固定日期: _____ 镜检日期: _____

片号	微 核 分 布						平均微核率/%
	总细胞数	总微核数	含单微核细胞数	含双微核细胞数	含三微核细胞数	微核率/%	
对照							
1							
2							
3							
4							
5							
⋮							

五、注意事项

1. 经过固定的材料如不及时使用,可以经过90%酒精换到70%酒精中各0.5h,换入70%酒精,0~4℃保存半年,观察时换用固定液再处理1次,效果较好。

2. 环磷酰胺使用剂量过大,会导致细胞核变形,而非形成微核,故在实验中应多设浓度梯度处理或进行预实验。

六、思考题

1. 本实验中产生微核的实质是什么? 在环境评价中有何意义?
2. 在未受污染的自然环境中,动物或植物的细胞是否会出现微核? 请解释原因。

实验二 重金属复合污染对植物微核产生的诱变效应

一、实验目的

1. 学会蚕豆根尖微核实验的基本操作方法。
2. 了解重金属复合污染对植物细胞有丝分裂过程的影响。

二、实验原理

近年来,各国都提出了相应的环境优先污染物的黑名单,这些环境优先污染物大多是一些毒性较强或者具有致突变性的物质,这些物质进入大气、水和土壤环境后将会对周围的生态环境和生物(包括人)造成伤害或形成严重的潜在威胁,这类有毒物质虽然对化学综合指标的贡献极小,但其危害性很大。目前,有很多农药的溶剂、助溶剂和乳化剂含有这类物质,本实验通过重金属复合污染对植物细胞微核产生诱变的效应影响,让学生了解重金属复合污染对生物的危害,也使学生初步掌握这种既简单又快速的环境有毒物质的生物监测方法。

三、实验准备

1. 实验材料 成熟饱满的蚕豆种子。

2. 实验仪器

(1) 显微镜、载玻片、盖玻片等。载玻片和盖玻片一定要清洁干净,以免影响观察统计结果。

(2) 人工光源。自制日光灯灯架,架高约 50 cm,光源为两只并列的 40W 日光灯。

(3) 塑料薄膜或直径为 10 cm 的带孔塑料板。

(4) 血细胞分类计数器。

3. 实验试剂

(1) 卡诺氏液。制作方法同实验一。

(2) 70%酒精。

(3) 1 mol/L 盐酸。

(4) 1%醋酸洋红染液。将 50 mL 45%的醋酸水溶液放入 150 mL 锥形瓶,文火煮沸,然后徐徐投入 0.5 g 洋红粉末,再煮 1~2 h,在此溶液中悬挂一个铁钉,1 min 后取出,使杂色剂中略具铁离子或在溶液冷却后加入 1~2 滴醋

酸铁溶液，以便增加染色效果。将溶液过滤后，分装于具玻璃塞的棕色玻璃瓶中备用。

四、实验步骤

1. **材料的前期培养及处理** 取蚕豆种子，在蒸馏水中浸泡 24 h，使种子充分吸胀，置于铺有滤纸的瓷盘中并盖上湿纱布，在 $31^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的光照培养箱中培养 1~2 d，使其长出 1.5~3.0 cm 长的初生根，此时切除初生根以保证侧根的生长发育。

2. **修复** 待侧根露白后分别移入配制好的不同浓度的重金属复合溶液中处理 6 h，然后取出，经蒸馏水冲洗后移至蒸馏水中修复 14 h（2 个细胞周期）。

3. **固定** 取修复培养结束的蚕豆根尖 0.5~1 cm 于卡诺氏固定液中固定 12~14 h。

4. **解离** 经固定的根尖材料为获得好的制片染色效果需要用酸进行解离，是制片过程中关键的一步。将固定后的根尖材料用 0.1 mol/L 的盐酸在 60°C 恒温水浴中解离 18~20 min。

5. **制片** 将解离后的根尖材料用蒸馏水漂洗数次，取出置于载玻片上，从根冠起切取根尖 1~1.5 mm，用解剖针捣碎，加 1~2 滴 1% 醋酸洋红染液，染色 10~15 min。盖上盖玻片轻压。

6. **镜检** 在 40×10 倍显微镜下，凡小于主核 $1/4$ 以下的，同主核有相同染色效果的可以是圆形、椭圆形或其他类似形状的染色物质都可以算作微核。

7. **结果表达及污染程度判断。**

8. 通常每一处理组至少观察 5 张较好的片子，每张片子至少观察 1 000 个以上细胞，并记录数据。记录表格同表 1-1，求出微核率。实验材料的本底微核率不得超过 10%。如同一处理组的重复实验微核率相差 2% 以上，应重做。

9. 由于对照组有本底微核，利用平均值差的标准误差公式，可以判断处理组和对组间微核率差异的显著程度。

$$\text{微核率} = \frac{\text{微核数}}{\text{观察的细胞数}} \times 100\%$$

$$S_d = \sqrt{(SE_t)^2 + (SE_c)^2}$$

式中： S_d ——平均值差的标准误差值；

SE_t ——处理组的标准误差值；

SE_c ——对照组的标准误差值。

当平均值差等于或大于平均值差的标准误差值 2 倍时，表示处理组的平均

值与对照组平均值差异显著(5%)以下的概率。由此评价水质是否受到有毒物质污染及污染水平。

五、思考题

1. 微核率与微核细胞率有何不同?
2. 为何微核监测可反映污染“三致”效应?

实验三 污染水体诱发紫露草 产生微核的实验

一、实验目的

紫露草 (*Tradescantia paludosa*) 监测法是环境监测技术规范中对水中生物监测法之一,也可以用于对大气、土壤的监测。本实验用紫露草对污染水体进行监测,并通过与化学监测做相应的比较,使学生初步掌握监测水环境既简便又快速的紫露草生物监测方法,进一步了解水体污染对生物的影响及危害。

二、实验原理

紫露草是一种对环境诱变因子具有高度敏感性的植物,在其花粉母细胞进行减数分裂的早期,如受到外界诱变因素的影响,将在四分体时期出现微核。从大量的四分体中所得到的微核率可作为染色体损伤程度的指标。通过统计微核率,来反映待检测物质的诱变性。

三、实验准备

1. 实验材料 实验材料采用美国引进的沼泽紫露草 3 号敏感品种。

该材料系温带长日照植物,宜在温暖、湿润、肥沃、有机质丰富的土壤中生长,白天要求的最适温度为 $21\sim 26^{\circ}\text{C}$,夜间为 16°C 左右,湿度为 $60\%\sim 80\%$,每天要求日照 $16\sim 18\text{ h}$ 。如果温度适宜可全年开花,光照不足时开花少且不整齐。如果要在日照短的季节中现蕾开花,需要增加光照度为 $1\,800\text{ lx}$ 的人工光照,延长光照时间(每天 $4\sim 6\text{ h}$)。

2. 实验仪器

(1) 显微镜、盖玻片、载玻片、解剖针等。载玻片和盖玻片一定要清洗干净,以免影响观察统计结果。

(2) 人工光源。自制日光灯架,架高约 50 cm ,光源为两支并列的 40 W 日光灯。

(3) 塑料薄膜或直径为 10 cm 带孔塑料板。

(4) 血细胞分类计数板。

3. 实验试剂

(1) 卡诺氏液。制作方法同实验一。

(2) 70% 酒精。

(3) 醋酸洋红染液。制作方法同实验二。

四、实验步骤

1. 植物材料的处理 将配制好的人工污水水样（调节 pH 至 5.5~5.8）倒入 500 mL 的烧杯，用塑料薄膜盖上，选择健壮、适时的紫露草花序 10~15 支，花枝长约 8 cm，每个花枝应有 10 个以上的花蕾，顶端开第一朵花，花枝带有 2 片叶子，插入处理组和对照组（对照组用自来水），在自然光照下处理 4~6 h。每种水至少应设两个平行处理组。

2. 恢复培养 去除水样，换上蒸馏水，在人工光照下做连续 24~30 h 的恢复培养。

3. 固定 除掉叶子和花梗，把花序放入新配制的卡诺氏液中固定 24 h，再将花序移入 70% 酒精中保存。也可将固定后的花序置于 3~5℃ 长期保存，但每月需要更换 70% 酒精一次。

4. 制片镜检 选择幼小花药，用解剖针或尖镊子打开花蕾，剥出花药，挑散，用醋酸洋红染液染色，并稍加压挤，置于 100 倍显微镜下观察。若绝大部分是早期四分体，则充分捣碎花药，让四分体释放出来，并加 1 滴醋酸洋红染液（经显微镜观察染色颜色过深，可滴加 1~2 滴 45% 的冰醋酸）。

5. 微核的观察 弃去载玻片上无关杂质，小心盖上盖玻片，置于酒精灯上来回 3~4 次微热（不要让染液煮沸），然后趁热把玻片放在几层吸水纸下。用大拇指压挤盖玻片，取出后置于显微镜下观察。

6. 数据统计 在实验之前先测定紫露草的微核本底值。随机统计四分体和微核率，每个处理组和对照组至少观察 5 张片子，统计 1 500 个四分体。计算每一处理组出现的微核率。

五、注意事项

1. 紫露草盆栽、地栽均可，最好是地栽。栽培的地方应尽量避免大气、水、土壤和放射线等污染。以施粪肥或饼肥为好，少施化肥。

2. 要适时整枝。初花、开过的花以及过密的枝条要及时摘掉。如果发生病虫害，喷洒的药物要求低毒、低残留，浓度要小，药施一周后检查微核的本底值。本底值概率不高，方能作实验材料。

3. 禁用任何除草剂。为了保持紫露草遗传学上的纯洁性，可在春季或秋季用分株或扦插的方式进行无性繁殖。

六、思考题

1. 为什么选用紫露草做微核实验?
2. 为什么要在四分体时期观察微核? 二分体时期或单核花粉时期可以观察到微核吗?