ФГОУ ВПО
САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

ПРАКТИКУМ ПО ОСНОВАМ ТОКСИКОЛОГИИ

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

САРАТОВ 2015

УДК 19.31
ББК 28.072я73+28.070я73

Составители:

Е.В. Плешакова, С.А. Коннова, А.А. Галицкая

Плешакова Е.В., Коннова С.А., Галицкая А.А. Практикум по основам токсикологии / Учеб.-метод. пособие для студентов биол. фак. – Саратов, 2015. – 70 с. :ил.

В учебно-методическом пособии представлены работы по идентификации и количественной оценке токсикантов в окружающей среде, биотестированию ядовитых веществ, методам определения биоаккумуляции и биотрансформации токсикантов в живых организмах, методологии химико-токсикологического анализа и детоксикационной терапии.

Работы содержат краткое теоретическое введение, представляющее те или иные разделы токсикологии, раскрывающее актуальность работы, а также принципы каждой методики. Работы сопровождаются перечнем необходимых реактивов, лабораторной посуды и оборудования, описанием хода исследования, результатов учебного эксперимента и завершаются контрольными вопросами. Для студентов биологического факультета, обучающихся по направлениям подготовки 06.03.01 – Биология (бакалавриат), включая профили «Прикладная и медицинская экология»; «Биохимия и физиология процессов адаптации»; 02.05.01 – Биоинженерия и биоинформатика; 44.03.01 – Педагогическое образование профиль «Биология» очной и заочной формы обучения, а также 02.04.00 – Биология (магистратура).

Рекомендуют к печати:

Кафедра биохимии и биофизики биологического факультета
Саратовского государственного университета
Декан биологического факультета, д.б.н., профессор Г.В. Шляхтин

Публикуется по решению методической комиссии
биологического факультета
Саратовского государственного университета

УДК 19.31
ББК 28.072я73+28.070я73

Работа издана в авторской редакции

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

© Е.В. Плешакова, С.А. Коннова, А.А. Галицкая, составление, 2015

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

ПРЕДИСЛОВИЕ

Настоящее учебно-методическое пособие предназначено для студентов биологического факультета, обучающихся по направлениям подготовки 06.03.01 – Биология (бакалавриат), включая профили «Прикладная и медицинская экология»; «Биохимия и физиология процессов адаптации»; 02.05.01 – Биоинженерия и биоинформатика; 44.03.01 – Педагогическое образование профиль «Биология» очной и заочной формы обучения, а также 02.04.00 – Биология (магистратура).

Пособие составлено в соответствии с типовой для университетов программой по предмету и новым учебным планом.

Данное учебно-методическое пособие состоит из нескольких разделов. Первые два раздела знакомят студентов с приоритетными токсикантами, поступающими из окружающей среды в живые организмы, методами их качественного и количественного обнаружения в природных объектах, а также различными способами биотестирования ксенобиотиков. Освоив теоретический материал и получив практические навыки тестирования токсикантов на основе использования различных биологических тест-систем и определения ряда токсичных веществ, таких как, нитраты и нитриты, тяжелые металлы, спирты, альдегиды, ароматические соединения, углеводороды, поверхностно-активные вещества и др., студенты получат представление о разделе токсикологии, связанном с токсикодинамикой. Теория и полученные навыки, позволят студентам лучше разобраться в основных закономерностях взаимодействия токсичных веществ и биологических объектов в условиях растущего антропогенного химического загрязнения окружающей среды.

Третий раздел пособия связан с биоаккумуляцией и биотрансформацией токсикантов в живых организмах, здесь представлены работы по определению токсикантов в растениях, кормах для животных. Студентам предлагается выполнить экспериментальное отравление лабораторных животных кадмием, в ходе которого они познакомятся с одним из цитотоксических эф-

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

фектов тяжелых металлов – активацией перекисного окисления липидов. Студенты научатся определять концентрацию конечного продукта окисления липидов – малонового диальдегида и ключевых соединений в детоксикации кадмия – глутатиона, активность фермента глутатион-S-трансферазы.

Последний раздел посвящен получению теоретических и практических знаний о методологии химико-токсикологического анализа и детоксикационной терапии. Студенты изучат механизмы действия антидотов различной химической природы, проведут разнообразными аналитическими методами химико-токсикологический анализ таблеток, найденных на месте происшествия. Этот раздел пособия ознакомит студентов с основами медицинской экологии, способами оценки риска и методами управления патологическим процессом интоксикации, лечебно-эвакуационными мероприятиями и разработкой профилактических мер.

Пособие будет способствовать получению знаний о накоплении токсикантов в живых организмах, механизмах их токсического действия, молекулярно-генетических механизмах адаптации организмов к экологическим стрессам, об основных способах детоксикации, метаболической активации и выведения ксенобиотиков из организмов в окружающую среду. Выполнение программы практикума поможет студенту научиться самостоятельно решать ряд практических аналитических задач в области токсикологии.

В представленных работах перечислено необходимое лабораторное оборудование, химическая посуда и реактивы, в том числе, их приготовление. Контрольные вопросы по каждой теме предназначены для самоконтроля усвоения учебного материала и обобщения полученных знаний по каждому из разделов.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

ТЕМА 1. АНТРОПОГЕННЫЕ ФАКТОРЫ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ. МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ТОКСИЧНЫХ ВЕЩЕСТВ

Работа 1. Методы идентификации нитратов и нитритов

Нитриты – соли щелочных металлов азотистой кислоты, нитраты – соли азотной кислоты. Главным действующим началом у них является анион азотистой кислоты, токсическое действие которого возрастает в кислой среде.

В связи с применением в больших масштабах азотных удобрений (аммиачная селитра, карбамид, сульфат аммония, калиевая, кальциевая селитра и др.) происходит избыточное поступление неорганических соединений азота в почву и в растения. При избытке нитратов в почве они полностью не перерабатываются, накапливаются в растительной продукции и попадают в организмы животных и человека. Нитраты сами по себе не обладают высокой токсичностью, но способны служить в организме источником высокотоксичных нитритов. Нитриты относятся к антиспазматическим ядам, действующим на нервную систему, а через сосудистый центр на сосуды и кровь. Токсичность нитритов объясняется их способностью к образованию метгемоглобина, что ведет к нарушению доставки к тканям кислорода. В малых дозах нитриты действуют мочегонно, местно – вызывают раздражение кожи, способствуют быстрому разложению витамина А и развивают авитаминоз. При взаимодействии нитритов и аминов в живых организмах образуются нитрозоамины, являющиеся канцерогенами и способные вызвать нарушения хромосомного аппарата и наследственные уродства. Они также индуцируют злокачественные опухоли в печени, почках, легких, желудке, пищеводе.

Присутствие нитритов в природных водах связано, прежде всего, с процессами разложения органических веществ и нитрификации. Аммонийные ионы под действием бактерий окисляются в нитрит ионы. При достаточной концентрации кислорода процесс идет дальше до нитратов. Поэтому нитриты в заметных количествах обнаруживаются при дефиците кислорода. Повышенное содержание нитритов указывает на усиление процессов разложения органических остатков в условиях более медленного окисления нит-

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

ритных ионов в нитратные, что указывает на загрязнение водного объекта. ПДК NO_2 = 0,08 мг/л.

Задача 1. Обнаружение нитритов в исследуемом растворе с помощью дифениламина

Реакция с дифениламином дает положительный результат при наличии в растворе, как нитратов, так и нитритов. Метод основан на том, что в присутствии нитритов дифениламин окисляется и образуется хиноидная аммониевая соль дифенилбензидина, окрашивающая раствор в синий или темно-синий цвет.

Ход исследования

В пробирку наливают 1 мл концентрированной серной кислоты и опускают в нее небольшой кристаллик дифениламина. Смачивают его путем встряхивания, после чего вносят 1-2 капли исследуемого раствора №1. Отмечают полученный результат.

Задача 2. Обнаружение нитритов в исследуемом растворе с помощью реактива Грисса

Анализ с реактивом Грисса основан на образовании в присутствии нитритов из первичных ароматических аминов интенсивно окрашенных диазосоединений.

Ход исследования

В пробирку наливают 1 мл исследуемого раствора №1, добавляют 1 мл реактива Грисса. При наличии в растворе нитритов развивается розовое или красное окрашивание реакционной смеси. Наблюдают изменение окраски, отмечают результат.

Задача 3. Обнаружение нитратов в овощах

Реакция с дифениламином может быть использована для выявления повышенного содержания нитратов непосредственно в овощах, например *в свекле.*

Ход исследования

Несколько кристаллов дифениламина наносят на поверхность свежего разреза свеклы и смачивают их несколькими каплями концентрированной серной кислоты. Интенсивное синее окрашивание поверхности разреза свеклы указывает на наличие количества нитратов, превышающего предельно допустимые концентрации, розовое – на небольшое содержание их. Отмечают полученный результат, делают вывод.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Задача 4. Обнаружение нитратов в исследуемом растворе

Реакция на нитраты с лактатом этакридина (риванолом). Для ее проведения можно воспользоваться аптечным препаратом – риванолом. Метод удобен тем, что при всей простоте позволяет посредством качественной реакции выявить недопустимое превышение концентрации нитратов в воде. Если в результате реакции появится бледно-розовая окраска, это означает, что уровень нитратов и нитритов выше допустимого в питьевой воде.

Ход исследования

В пробирку вносят 1 мл исследуемого раствора №1, прибавляют 1 мл физиологического раствора и смешивают с 1 мл риванольного раствора. Наблюдают изменение окраски. Объясняют полученный результат.

Работа 2. Количественное определение нитритов и нитратов в природных водах

Задача 1. Количественное определение нитритов в природных водах

Для определения нитритов в водах используется колориметрический метод на основе анализа *с реактивом Грисса* (сульфаниловой кислотой и α-нафтиламином). Этот метод основан на способности первичных ароматических аминов в присутствии азотистой кислоты образовывать интенсивно окрашенные диазосоединения.

Ход исследования

Предварительно строят калибровочную кривую: график зависимости оптической плотности раствора от концентрации нитрит ионов с использованием стандартных растворов с концентрациями от 0,001 до 0,100 мг NO^-_2 /л. Для этого готовят следующие растворы KNO_2:

1 – основной раствор (250 мг N/л): растворяют 0,6157 г KNO_2 в 500 мл дистиллированной воды; 2 − первый рабочий раствор (5 мг N/л): 5 мл основного раствора разбавляют до 250 мл дистиллированной водой; 3 − второй рабочий раствор (0,1 мг N/л): 5 мл первого рабочего раствора разбавляют до 250 мл дистиллированной водой.

Для построения калибровочной кривой готовят растворы с концентрациями от 0,002 до 0,015 мг N/л, отбирая от 2 до 15 мл первого рабочего раствора, соответственно (см. таблицу), доводя объем каждого раствора до 100 мл дистиллированной водой.

К приготовленным растворам для построения калибровочной кривой и к 100 мл исследуемой водной пробы добавляют 5 мл реактива Грисса.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Через 40 минут измеряют оптическую плотность растворов на ФЭК в кювете на 5 см при длине волны 536 нм. Правила работы на фотоэлектроколориметре (ФЭК) см. в Приложении.

Полученные значения оптической плотности растворов при длине волны 536 нм (D_{536}) заносят в таблицу 1 и используют для построения калибровочного графика.

Для этого на ось Х наносят значения использованных концентраций NO^-_2, на ось У – соответствующие им значения оптической плотности.

Таблица 1

Данные для построения калибровочной кривой

Первый рабочий раствор			Второй рабочий раствор		
Объем, мл	Концентрация, мг N/л	Оптическая плотность растворов (D_{536})	Объем, мл	Концентрация, мг N/л	Оптическая плотность растворов (D_{536})
0,0	0,000		0,4	0,020	
2,0	0,002		0,8	0,040	
3,0	0,003		1,2	0,060	
5,0	0,005		1,6	0,080	
10,0	0,010		2,0	0,100	
15,0	0,015		2,4	0,120	

Концентрацию нитритов в исследуемой водной пробе определяют в соответствии с приведенной выше методикой, используя калибровочный график. Проведя исследование, заполняют таблицу, сравнивают полученные результаты с ПДК содержания нитритов в природных водах.

Задача 2. Количественное определение нитратов в природных водах

Количественное определение нитрат ионов проводят фотоколориметрически *салицилатным методом*. Сущность метода состоит в образовании нитратов с салицилатом натрия в присутствии серной кислоты комплексов желтого цвета.

Ход исследования

Предварительно строят калибровочную кривую зависимости оптической плотности раствора от концентрации нитрат ионов с использованием стандартных растворов с концентрациями от 0,1 до 4,0 мг NO^-_3/л. Для этого готовят следующие растворы KNO_3: 1 – основной стандартный раствор KNO_3 (0,1 мг N/л): 0,7216 г KNO_3 растворяют в мерной колбе на 1 литр и добавляют 1 мл хлороформа; 2 – рабочий стандартный раствор (0,01 мг N/л): 10 мл основного стандартного раствора разбавляют в колбе на 100 мл.

К 20 мл анализируемой пробы добавляют 2 мл раствора салицилата натрия, выпаривают в фарфоровой чашке досуха, охлаждают, добавляют 2 мл концентрированной серной кислоты и оставляют на 10 минут. Добавляют 15

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

мл дистиллированной воды и 15 мл раствора сегнетовой соли. Переносят в колбу на 50 мл, доводят раствор до метки дистиллированной водой и определяют оптическую плотность на ФЭК при 410 нм в кювете на 2 см. Правила работы на фотоэлектроколориметре см. в Приложении.

Полученные значения оптической плотности растворов (D_{410}) заносят в таблицу и используют для построения калибровочного графика. Для этого на ось X наносят значения использованных концентраций NO^-_3, на ось Y – соответствующие им значения оптической плотности.

Таблица 2

Данные для построения калибровочной кривой

Объем стандартного раствора, мл	0,0	0,5	2,5	5,0	10,0	20,0
Концентрация, мг N/л	0,0	0,1	0,5	1,0	2,0	4,0
Оптическая плотность растворов (D_{410})						

Концентрацию нитратов в исследуемой водной пробе определяют по описанному выше методу, используя калибровочный график. Проведя исследование, заполняют таблицу 2 и подсчитывают количество нитратов в исследуемой пробе.

Работа 3. Обнаружение тяжелых металлов и других токсических неорганических соединений

Токсичность тяжелых металлов проявляется в способности легко аккумулироваться живыми организмами, вызывая даже в малых количествах нарушения их функционирования. Тяжелые металлы являются тиоловыми ядами, блокирующими сульфгидрильные группы белковых соединений, и этим нарушающих белковый обмен и ферментативную деятельность организма. В процессе перемещения по геохимическим циклам эти элементы, в силу своих химических свойств, слабо трансформируются и поэтому накапливаются в окружающей среде. В настоящее время приоритетными загрязнителями признаны: ртуть, свинец, кадмий, мышьяк, медь, ванадий, олово, цинк, сурьма, молибден, кобальт, никель.

Задача 1. Методы качественного определения препаратов ртути

Наиболее остро проблема ртутного загрязнения стоит в районах действия мощных источников ртути − горнодобывающих и металлургических комплексов, перерабатывающих ртутные и ртутьсодержащие руды, а также предприятий, использующих значительное количество ртути в технологических циклах (хлор-щелочное производство и другие отрасли химической промышленности).

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Основными путями поступления ртути в организм человека являются: вдыхание паров металлической ртути, ее летучих соединений или аэрозолей и употребление продуктов питания, загрязненных метилированной ртутью (в первую очередь, рыбы и других морепродуктов). ПДК ртути в воде 0,0005 мг/л. Даже в очень малых дозах ртуть вызывает гонадотоксический, мутагенный и эмбриотоксический эффекты. В основе патологического действия ртути лежит блокада биохимически активных групп белковых молекул и низкомолекулярных соединений.

1. При наличии ртути в исследуемом материале *при нагревании медная проволока* становится серебристо-блестящей от выделившейся металлической ртути.

Ход исследования

К 20–25 мл исследуемого раствора №2 добавляют 20-25 мл дистиллированной воды. На край стаканчика с полученной смесью подвешивают медную спирально изогнутую проволочку, предварительно очищенную от окислов азотной кислотой (1:1). Смесь в стаканчике нагревают на водяной бане, периодически помешивая стеклянной палочкой в течение часа. Отмечают полученный результат.

2. *В реакции йодида меди* с раствором, содержащим ртуть, образуется тетрайодидомеркурат меди розово-оранжевого или красно-оранжевого цвета.

Ход исследования

На полоску фильтровальной бумаги наносят насыщенный раствор KJ, затем каплю 5 %-ного раствора $CuSO_4$. На образовавшееся пятно йодистой меди наносят исследуемый раствор №2. Наблюдают и записывают в журнал результат реакции.

Задача 2. Методы качественного определения препаратов свинца

По степени воздействия на живые организмы свинец отнесен к классу высокоопасных веществ наряду с мышьяком, кадмием, ртутью, селеном и другими. В организм человека и животных большая часть свинца поступает с продуктами питания, а также с питьевой водой, атмосферным воздухом, при курении, при случайном попадании в пищевод кусочков свинецсодержащей краски или загрязненной свинцом почвы. Свинец накапливается в костях, его концентрация здесь может в десятки и сотни раз превышать концентрацию в других органах. Свинец вызывает анемию и психические расстройства. При хронической интоксикации свинцом наблюдается пониженное умственное развитие, нарушение поведения и способности к обучению, зрительно-моторная дисфункция.

1. Присутствие ионов свинца в растворе может быть обнаружено в *реакции с йодидом калия*, который образует со свинцом осадок йодида свинца.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Ход исследования

На предметное стекло наносят 1 каплю исследуемого раствора №3 и прибавляют одну каплю йодида калия. Наблюдают выпадение осадка, записывают результат.

2. Другой качественной реакцией на ионы свинца является *проба с серной кислотой.* В результате реакции происходит выпадение осадка сульфата свинца.

Ход исследования

В пробирку помещают 1 мл исследуемого раствора №3, добавляют 1 мл 1 %-ной серной кислоты, наблюдают результат реакции. Затем прибавляют к смеси 4 мл этилового спирта, осадок должен увеличиться.

3. Проба на ионы свинца *с бихроматом калия.* При наличии в пробе свинца должен образоваться осадок хромовокислого свинца желтого цвета.

Ход исследования

На стекло наносят каплю исследуемого раствора №3 и несколько капель 10 %-ного раствора NaOH, затем 1 каплю 10 %-ной уксусной кислоты, и по каплям 5 %-ный раствор бихромата калия ($K_2Cr_2O_7$). Наблюдают результаты реакции, делают вывод в рабочем журнале.

Задача 3. Количественное определение ионов свинца в воде с бихроматом калия

Бихромат- и хромат-ионы образуют с ионами свинца малорастворимый хромат свинца желтого цвета. Для анализа содержания свинца в природной воде 0,5-1,0 л анализируемой пробы упаривают до объема 10 мл (лучше всего это сделать на роторном испарителе). К полученной пробе приливают 5 мл раствора азотной кислоты (1:2), нагревают на водяной бане в течение 15 минут, отфильтровывают и выпаривают в фарфоровой чашке. К сухому остатку приливают 2 мл 0,5 %-ного раствора ацетата натрия и 8 мл дистиллированной воды. Раствор перемешивают и отфильтровывают в пробирку. Для приготовления калибровочной кривой используют стандартный раствор, содержащий 0,1 мг/мл свинца (см. таблицу 3).

Во все пробирки калибровочной шкалы и в пробирку с пробой вносят по 1 мл 50 %-ного раствора CH_3COOH и перемешивают. Добавляют по 0,5 мл 10 %-ного раствора бихромата калия (при наличии в исследуемой пробе ионов свинца выпадает желтый осадок хромата свинца). Пробирки встряхивают и через 10 минут измеряют оптическую плотность растворов на ФЭК при длине волны 440 нм. Правила работы на фотоэлектроколориметре см. в Приложении.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Таблица 3

Данные для построения калибровочной кривой

№ пробирки	0	1	2	3	4	5
Стандартный раствор (мл)	0,00	0,05	0,10	0,30	0,50	0,80
0,5 %-ный раствор CH_3COONa	Во все пробирки по 2 мл					
Дист. вода (мл)	8,00	7,95	7,90	7,70	7,50	7,20
Содержание свинца (мг)	0.00	0,005	0,010	0,030	0,050	0,080

Полученные значения оптической плотности растворов (D_{440}) используют для построения калибровочного графика. Концентрацию свинца в анализируемой пробе определяют по калибровочному графику. Делают вывод о содержании ионов свинца в исследуемой воде из природного источника.

Задача 4. Методы качественного определения препаратов меди

Медь встречается в окружающей среде на территории любого промышленного города. По последним расчетам вклад антропогенной меди в загрязнение биосферы составляет 56-87 %. Попав в организм человека, медь накапливается в печени. В конечном итоге она понижает общую сопротивляемость организма, его защитно-приспособительные возможности, ослабляет иммунную систему, нарушает биохимический баланс в организме.

1. Качественное *обнаружение ионов меди* в исследуемом растворе может быть выполнено *в ходе реакции с аммиаком*. При положительной реакции получается синее или синеватое окрашивание смеси, обусловленное образованием $[Cu(NH_3)_4]^{2+}$.

Ход исследования

В фарфоровую чашку помещают 5 мл исследуемого раствора №4 и 5 мл 10 %-ного раствора аммиака (работу проводят под вытяжным шкафом!). В контрольной пробе вместо исследуемого раствора используют дистиллированную воду. Наблюдают изменение цвета, объясняют результат.

2. Другой чувствительной качественной пробой на ионы меди является *реакция с желтой кровяной солью.* В зависимости от концентрации появляется красно-бурый осадок или красное окрашивание вследствие образования коллоидного ферроцианида меди $Cu_2Fe(CN)_6$.

Ход исследования

5 мл исследуемого раствора №4 помещают в фарфоровую чашку, подкисляют одной каплей уксусной кислоты и прибавляют по каплям 5 %-ный

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

раствор желтой кровяной соли – $K_4[Fe(CN)_6]$. Наблюдают изменение окраски и делают вывод о содержании меди в растворе.

Задача 5. Методы качественного определения солей бария

Некоторые соли бария ($BaCl_2 \times 2H_2O$; $BaCO_3$; BaS) широко используются в сельском хозяйстве для борьбы с вредителями растений и грызунами. Соли бария являются высоко токсическими веществами, ядовитость которых зависит от растворимости (т.е., биодоступности).

1. Обнаружение ионов бария в реакции *с серной кислотой*. В присутствии солей бария образуется осадок сульфата бария. Чтобы убедиться в этом, к реакционной смеси нужно добавить раствор ацетата натрия, осадок сульфата бария при этом не растворяется.

Ход исследования

В пробирку помещают 1 мл исследуемого раствора №5 и добавляют к нему 1 мл 10 %-ного раствора серной кислоты. Далее добавляют к реакционной смеси 2 мл раствора ацетата натрия и подогревают пробирку на водяной бане 5 мин, описывают наблюдаемый эффект.

2. Реакция на ионы бария *с бихроматом калия* с образованием осадка хромовокислого бария.

Ход исследования

В пробирку наливают 1 мл исследуемого раствора №5 и прибавляют несколько капель 5 %-ного раствора бихромата калия. При наличии ионов бария в исследуемом растворе №5 наблюдают выпадение осадка, записывают результат.

Задача 6. Качественное обнаружение солей железа в воде

Железо – потенциально ядовитое вещество. Допустимой концентрацией железа в воде по СанПИН 2.1.4.1175-02 является 0,3 мг/л, для подземных источников не более 1 мг/л. Железо увеличивает показатели цветности и мутности. Вода приобретает желто-бурую окраску, горьковато-металлический вкус, оставляет пятна ржавчины.

При попадании в организм повышенных концентраций железа возникает тяжелое отравление. Основными проявлениями избытка железа в организме человека являются: отложение железа в органах и тканях, сидероз, головные боли, слабость, повышенная утомляемость, пигментация кожи, потеря веса. При тяжелом отравлении повреждается слизистая оболочка кишечника, развивается печеночная недостаточность, тошнота и рвота. Железо действует как клеточный яд, разобщая окислительное фосфорилирование.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Клетки переходят в режим анаэробного метаболизма, при котором возрастает продукция молочной кислоты.

1. Обнаружение общего железа в *реакции с роданидом калия*. Наличие ионов железа в концентрации 0,1 мг/л определяется по появлению розового окрашивания продуктов реакции, при более высоких концентрациях – красного окрашивания.

Ход исследования

В пробирку помещают 10 мл исследуемой воды, прибавляют 1 каплю концентрированной азотной кислоты, несколько капель раствора пероксида водорода (3%) и 0,5 мл раствора роданида калия. Наблюдают цвет продуктов реакции, делают вывод о концентрации ионов железа.

2. Специфическим методом *анализа железа (II)* является реакция с *гексацианоферратом (III) калия* $K_3[Fe(CN)_6]$ в кислой среде (pH 3), который образует с катионом Fe^{2+} осадок турнбулевой сини темно-синего цвета.

Ход исследования

К 1 мл исследуемой пробы добавляют 2-3 капли раствора серной кислоты и 2-3 капли раствора реактива гексацианоферрата (III) калия. Наблюдают формирование окраски, делают вывод.

3. Для выявления *железа (III)* проводят *реакцию с гексацианоферратом* (II) калия, в результате которой образуется темно-синий осадок берлинской лазури.

Ход исследования

К 1 мл исследуемой воды прибавляют 1-2 капли раствора соляной кислоты и 2 капли раствора реактива гексацианоферрата (II) калия. Отмечают изменение цвета реакционной смеси, делают вывод.

Задача 7. Определение подвижного алюминия в почве

Если почва имеет кислотность pH меньше 5, то наряду с поглощенными ионами водорода в почве находятся подвижные ионы алюминия, которые вредят развитию растений. Алюминий чаще всего встречается в поглощенном состоянии. В нейтральной почве он отсутствует. Алюминий оказывает вредное действие на растения, начиная с концентрации 1 мг/л воды. Образуя нерастворимые соединения с фосфатами, алюминий нарушает их поглощение корнями. Избыток алюминия в почве приводит к деформации органов: листья большинства растений скручиваются, на них появляются белые пятна; падает урожайность зерновых культур, возделываемых на кислых почвах.

Органами-мишенями при избыточных концентрациях алюминия в организме человека являются почки, центральная нервная система, кости, лег-

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

кие, костный мозг, яичники, матка и молочные железы. Достаточно выражены и многообразны биохимические проявления интоксикации алюминием.

Для определения подвижного алюминия применяется *метод Я.В. Пейве*.

Ход исследования

В стакан наливают 100 мл 1 н. раствора хлористого калия, всыпают 40 г почвы, устанавливают мешалку и размешивают раствор в течение часа, после чего фильтруют через складчатый фильтр. Сначала берут пробу на железо при помощи роданистого аммония. Если раствор не окрасится в красный цвет, то это означает, что железа в нем нет. В противном случае его осаждают 6 н. раствором едкого натра.

Для определения алюминия моют 9 пробирок и споласкивают дистиллированной водой, затем их устанавливают в штатив и пронумеровывают. При помощи градуированной пипетки в пробирки (1-9) наливают солевую вытяжку: соответственно 5,0; 4,0; 3,0; 2,5; 2,0; 1,8; 1,5; 1,2; 1,0 мл.

Во все пробирки, кроме первой, доливают до объема 5 мл 1 н. раствор хлорида калия. В каждую пробирку добавляют по 1 мл осадителя. Пробирку встряхивают и добавляют по одной капле индикатора – конго красное. Содержимое пробирок хорошо перемешивают и все 9 пробирок помещают на 10 минут в кипящую водяную баню. После кипячения пробирки оставляют на 30-35 минут для охлаждения, после чего приступают к наблюдению за осадком. Находят первую пробирку, в которой нет осадка, концентрация алюминия в этой пробирке равна при данных условиях 0,0013 мг алюминия в 1 мл раствора. Содержание алюминия в почве можно вычислить по таблице 4.

Таблица 4

Данные для вычисления содержания алюминия в почве

Номер пробирки	Объем вытяжки, мл	Количество алюминия на 100 г почвы, мг
1	5,0	0,39
2	4,0	0,48
3	3,0	0,65
4	2,5	0,78
5	2,0	0,97
6	1,8	1,08
7	1,5	1,30
8	1,2	1,65
9	1,0	1,95

Если осадок выпадает и в пробирке № 9, то оставшийся фильтрат разбавляют 1 н. раствором хлористого калия и производят новое определение алюминия. При расчете необходимо учесть произведенное разбавление. Выполняют реакции и делают вывод о концентрации подвижного алюминия в анализируемой почве.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Работа 4. Обнаружение мочевины в объектах окружающей среды

Мочевина (H_2NCONH_2) в последние годы получила широкое распространение в практике кормления животных, как средство для восполнения недостающего протеина в рационе. Токсические свойства мочевины обусловлены образованием в организме животного избыточного количества аммиака. Всасываясь, аммиак попадает в печень, которая не справляется с его детоксикацией. В результате при концентрации аммиака в крови более 4 мг % наступают симптомы острого отравления.

1. Качественное обнаружение в исследуемом растворе мочевины в реакции *с концентрированной азотной кислотой.*

При наличии в исследуемом растворе мочевины выкристаллизовывается азотнокислая мочевина $CO(NH_2)_2 \times HNO_3$ в виде шестигранных или ромбических пластинок.

Ход исследования

На предметное стекло наносят 2 капли исследуемого раствора №6 и добавляют к ним 2 капли концентрированной азотной кислоты. Находят и зарисовывают кристаллы мочевины, делают вывод.

2. Мочевина может быть обнаружена в растворе и при помощи *биуретовой реакции.* Плавление мочевины на воздухе приводит к образованию биурета. В присутствии сульфата меди в щелочной среде биурет дает фиолетовое окрашивание вследствие образования медных комплексов солей.

Ход исследования

Два кристаллика мочевины помещают в сухую пробирку и осторожно нагревают на спиртовке до плавления кристаллов. Нагревание продолжают до тех пор, пока сплавленная масса затвердеет снова. Пробирку охлаждают и прибавляют 2-3 капли воды. Затем снова слегка нагревают пробирку и к теплому раствору прибавляют 2 капли 10 %-ного раствора едкого натра, охлаждают раствор и прибавляют 1-2 капли 1 %-ного раствора сульфата меди. Результат фиксируют и делают вывод из эксперимента.

Работа 5. Токсичные органические вещества: характеристика и обнаружение их в окружающей среде

К ядовитым галогенпроизводным относят: хлороформ, хлоралгидрат, хлористый этилен, трихлорэтилен, четыреххлористый углерод, гексахлорэтан и другие.

Хлороформ ($CHCl_3$) – бесцветная, прозрачная, подвижная и легколетучая жидкость. Со спиртом, эфиром бензином смешивается в любых соотно-

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

шениях. Хлороформ является хорошим растворителем эфиров, лаков, некоторых алкалоидов, поэтому имеет широкое промышленное применение. Хлороформ является наркотиком, вначале возбуждает, а затем парализует центральную нервную систему. Один из метаболитов хлороформа – фосген ($COCl_2$) ковалентно связывается с белками и липидами печени и почек. При этом происходит повреждение клеточных мембран и внутриклеточных структур, наблюдается некроз клеток и последующая клеточная пролиферация, что стимулирует формирование опухолей у грызунов. Конечными продуктами метаболизма хлороформа являются HCl и CO_2.

Четыреххлористый углерод (CCl_4) представляет собой прозрачную, подвижную, тяжелую жидкость. Четыреххлористый углерод широко используется как хороший растворитель жиров, лаков, смол, восков, каучука и т.п., а также для удаления жировых пятен и в качестве консервирующего вещества для меховых изделий. Действие четыреххлористого углерода на организм напоминает действие хлороформа, но изменения в органах (печень, почки, сердце) более глубоки (жировое перерождение). Одним из метаболитов является $CHCl_3$.

Задача 1. Качественное обнаружение галогенпроизводных

Общей реакцией на токсические галогенпроизводные является реакция отщепления галоида, что достигается при нагревании со спиртовым раствором едкой щелочи. Хлорид-анион обнаруживается реакцией взаимодействия с $AgNO_3$ в азотнокислой среде.

Ход исследования

В одну из двух пробирок помещают 2 мл исследуемого раствора №7, в другую – раствора №8, прибавляют 3 мл 10 %-ного раствора едкого натра, кипятят три минуты. После охлаждения раствор фильтруют, добавляют в фильтрат 2 капли конц. азотной кислоты и несколько капель 2 %-ного раствора $AgNO_3$. При наличии в растворе хлорид иона выпадает белый хлопьевидный осадок. Наблюдают выпадение осадка и делают вывод из результатов анализа.

Задача 2. Качественное обнаружение этилового спирта и ацетона

Токсичностью обладают спирты алифатического ряда: метиловый, этиловый, изопропиловый, бутиловый и изоамиловый, этиленгликоль. Токсикологическую опасность представляют альдегиды и кетоны алифатического ряда: формальдегид, ацетон.

Этиловый спирт – подвижная, бесцветная, летучая жидкость с характерным запахом. Этиловый алкоголь относится к наркотикам. При приеме внутрь он сначала вызывает возбуждение, а затем угнетение и в высоких концентрациях – паралич центральной нервной системы. Этанол способен оказывать мембранотропное и конформационное действие, непосредственно

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

взаимодействовать с неэтерифицированными жирными кислотами. Он вызывает флюидизацию (повышение текучести) мембран, что приводит к нарушению трансмембранного переноса ионов кальция. Влияет на конформацию белковых молекул, нарушая их способность к функционированию.

Ацетон представляет собой бесцветную прозрачную жидкость, легче воды, со специфическим запахом. Ацетон является хорошим растворителем нитроцеллюлозы, ацетилцеллюлозы и смол. Ацетон проявляет психотропное (наркотическое), нефротоксическое, местное раздражающее действие. Смертельная доза более 100 мл. Токсическая концентрация в крови 200-300 мг/л, смертельная – 550 мг/л. Быстро адсорбируется слизистыми оболочками.

1. Общей качественной реакцией на этиловый спирт и ацетон является так называемая йодоформная проба: *с раствором йода в йодиде калия* в присутствии 10 %-ного водного раствора едкой щелочи приводит к образованию йодоформа, который обнаруживается по характерному запаху и выпадению желтого осадка.

Ход исследования

В одну из двух пробирок помещают 3-4 мл исследуемого раствора №9, в другую – раствора №10, добавляют 3 мл 10 %-ного раствора едкого натра, несколько капель реактива Люголя до появления желтой окраски и слегка нагревают. Выпадает желтый осадок йодоформа и ощущается его характерный запах при наличии в растворе этилового спирта или ацетона.

2. Наиболее простым и доступным для применения способом обнаружения спирта и альдегида является *проба Рапопорта*. Алкоголь таким образом может быть обнаружен в выдыхаемом воздухе человека, употреблявшего спиртные напитки, если он в течение 1-2 минут будет продувать воздух через трубку, конец который погружен в пробирку с 2 мл воды. Проходя через воду, алкоголь, содержащийся в выдыхаемом воздухе, растворяется в ней, и затем спирт в пробе определяют с помощью химической реакции.

Ход исследования

Готовят три чистые сухие пробирки наливают по 2 мл: в первую - дистиллированной воды (контроль), во вторую – исследуемый раствор №9 (опыт), в третью – дистиллированной воды (опыт на наличие алкоголя во выдыхаемом воздухе). Погружают в третью пробирку стеклянную трубку и в течение 1-2 минут интенсивно продувают воздух. Во все пробирки приливают осторожно по 20 капель химически чистой концентрированной серной кислоты и после этого по 1 капле 0,5 %-ного свежеприготовленного раствора марганцовокислого калия. Необходимо тщательное выполнение технологии проведения реакции: соблюдение последовательности операций, использование свежеприготовленных дистиллированной воды и раствора перманганата калия, чисто вымытых и высушенных пробирок и пипеток, шлангов, проведение реакции в контрольной пробирке.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Результаты исследования оцениваются в течение 1-2 минут с момента введения в пробирки раствора марганцовокислого калия. Если в течение 2 минут раствор в сравнении с контрольным не изменил цвета – экзогенного алкоголя в пробе нет. Наблюдают изменение цвета в опытных пробирках по сравнению с контрольной и делают вывод.

Задача 3. Количественное определение концентрации формальдегида в растворе

Формальдегид – газообразное вещество. Формалин – 40 %-ный раствор формальдегида в воде, бесцветная прозрачная жидкость с резким удушливым запахом. Формальдегид широко применяется при изготовлении искусственных смол и пластических масс, при различных синтезах, в красочной текстильной промышленности, в производстве мыла и т.д. Формальдегид проявляет психотропное (наркотическое), нейротоксическое (судорожное), местнораздражающее, гепатоксическое действие. Он всасывается через слизистые оболочки дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта. При попадании внутрь возможны саливация, тошнота, рвота, боль в животе, озноб, сонливость, тремор, тонические судороги, кома, угнетение дыхания. При вдыхании паров наблюдается сильное раздражение слизистых оболочек глаз и верхних дыхательных путей, резкий кашель, удушье, нарушение сознания, в тяжелых случаях кома.

Метод *количественного определения формальдегида* в растворе основан на образовании хиноидного красителя при взаимодействии фуксинсернистого реактива с водорастворимыми альдегидами.

Ход исследования

1 мл исследуемого раствора № 11 помещают в пробирку, доводят объем раствора водой до 5 мл, прибавляют 1 мл раствора фуксинсернистой кислоты, перемешивают, пробирки закрывают резиновыми пробками и оставляют на 1 ч. Измеряют оптическую плотность полученного раствора на фотоэлектроколориметре при длине волны 590 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм по сравнению с контрольной пробой, содержащей 5 мл воды и 1 мл раствора фуксинсернистой кислоты. Правила работы на фотоэлектроколориметре см. в Приложении. Содержание формальдегида в исследуемом растворе вычисляют по калибровочному графику.

Для построения *калибровочного графика* готовят основной раствор формальдегида (концентрация формальдегида 4 мг/мл): 1,0 мл формалина помещают в мерную колбу, вместимостью 100 мл, и доводят объем раствора водой до метки. Из основного раствора готовят рабочий раствор с концентрацией формальдегида 20 мкг/мл, для чего 0,5 мл основного раствора помещают в мерную колбу, вместимостью 100 мл, и доводят объем водой до метки. К 1,0-4,0 мл рабочего раствора с интервалом 0,5 мл (концентрация формальдегида в пробах: 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 мкг/мл), прибавляют воду

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

до объема 5 мл и 1 мл раствора фуксинсернистой кислоты, далее анализ проводят, как описано выше.

Задача 4. Методы обнаружения повышенных количеств фенола в окружающей среде

Фенол – простейшее из оксипроизводных ароматических соединений, умеренно растворим в воде, хорошо – в спирте, эфире, ацетоне. Является важным сырьём в производстве ряда ценных продуктов: фенолоальдегидных смол, фенолфталеина, различных красителей, лекарственных средств. Фенол обладает бактерицидным действием; в медицине (более известен как карболовая кислота) используется в виде разбавленных водных растворов для дезинфекции помещений и предметов больничного обихода. Фенол и его производные – сильные яды. Механизм отравления таков: блокируются сульфгидрильные группировки важных ферментов, а в итоге нарушаются окислительно-восстановительные реакции в клетках организма. Предельно допустимая концентрация фенола в воздухе 0,005 мг/л, в воде варьирует от 0,1 мг/л в нехлорированной до 0,001 мг/л – в хлорированной.

1. Фенол может быть обнаружен в *реакции с формалинсерной кислотой*. При наличии в исследуемом растворе фенола в месте соприкосновения растворов образуется красное кольцо.

Ход исследования

В пробирку помещают 2 мл конц. серной кислоты и 2 капли формалина, а затем наслаивают по стенке 2 мл исследуемого раствора №12. Наблюдают образование красного кольца на границе раздела сред, делают вывод.

2. Образование окрашенных продуктов реакции синего или синефиолетового цвета (фенолята железа) наблюдается в *реакции раствора фенола с хлоридом окисного железа*.

Ход исследования

В пробирку помещают 5 мл исследуемого раствора №12 и добавляют по каплям свежеприготовленный 5%-ный раствор хлорида окисного железа ($FeCl_3$). Наблюдают изменение цвета реакционной смеси, делают вывод.

3. Наличие фенола в растворе может быть обнаружено и в реакции с углеводами. *Метод основан на способности углеводов образовывать фурфурол* или его гомологи при взаимодействии с сильными кислотами. Эти производные фурфурола дают цветные реакции с фенолами.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Ход исследования

К 0,5 мл исследуемого раствора №12 добавляют 0,5 мл 2 %-ного раствора глюкозы и осторожно добавляют 2 мл концентрированной серной кислоты, перемешивают встряхиванием. При наличии в пробе фенола в пробирке появляется желто-коричневое окрашивание.

Задача 5. Методы количественного определения фенола в окружающей среде

1. Метод основан на свойстве *реактива Фолина* давать цветную реакцию с фенолом.

Ход исследования

0,5 мл исследуемого раствора №12 помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора водой до метки. К 0,5 мл полученного раствора прибавляют 9,5 мл воды и 0,5 мл реактива Фолина, содержимое перемешивают. Прибавляют 2 мл 20 %-ного раствора карбоната натрия, перемешивают, затем пробу помещают в кипящую водяную баню на 1 мин.

После охлаждения измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 310 нм по сравнению с контрольной пробой, содержащей 10 мл воды, 0,5 мл реактива Фолина, 2 мл 20 %-ного раствора карбоната натрия. Правила работы на фотоэлектроколориметре см. в Приложении. Содержание фенола в исследуемом растворе вычисляют по калибровочному графику.

Для построения калибровочного графика 0,5 г (точная навеска) фенола растворяют в воде в мерной колбе, вместимостью 50 мл, и доводят объем раствора водой до метки (10 мг/мл фенола). Полученный раствор может храниться в склянке из темного стекла при температуре 4-8°С в течение года. Перед употреблением 1 мл раствора разводят водой в 100 раз (100 мкг/мл фенола). К 0,05-0,25 мл полученного раствора (5-25 мкг фенола), взятого микропипеткой с интервалом 0,05 мл, прибавляют воду до 10 мл, реактивы перемешивают и проводят анализ, как указано выше.

Работа 6. Определение концентрации неионогенных поверхностно-активных веществ (НПАВ) в модельных сточных водах

Чрезвычайно опасную группу загрязнителей окружающей среды представляют ПАВ (поверхностно-активные вещества), которые способны адсорбироваться из раствора на поверхности раздела фаз с соответствующим понижением поверхностного натяжения жидкостей. Благодаря этому свойству ПАВ используют в качестве компонентов моющих средств, стабилизаторов эмульсий, солюбилизаторов, антистатиков, флотореагентов и других. ПАВ, попадая в окружающую среду, оказывают влияние на кумуляцию и токсич-

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

ность других соединений, могут усиливать канцерогенные свойства других веществ.

ПАВ могут быть ионогенными (диссоциирующими в воде на ионы – это анионные (АПАВ), катионные (КПАВ) и амфолитные ПАВ) и неионогенными (НПАВ, не диссоциирующими на ионы).

НПАВ представляют собой полигликолевые эфиры веществ, молекула которых содержит подвижный водород. Это оксиэтилированные жирные спирты, кислоты, амины, алкилфенолы и другие с общей формулой: R-O-$(CH_2CH_2O)_nH$, где R – жирная кислота, спирт или алкилфенол.

НПАВ в значительных количествах попадают в сточные воды, очистка которых традиционными биологическими методами затруднена из-за сильного пенообразования, медленного и неглубокого окисления загрязнителей.

Сущность метода (по Клименко Н.А.) количественного определения НПАВ в водных растворах состоит в его экстракции из водной среды органическим растворителем (хлороформом) и колориметрическом определении интенсивности окрашивания сложного комплекса, который образуется при взаимодействии полиэтоксилатной цепочки с фосфорномолибденовой кислотой и роданидом аммония.

Ход исследования

а) *Построение калибровочного графика для определения концентрации НПАВ:* для построения калибровочной кривой в качестве стандарта используют раствор, содержащий оксиэтилированный алкилфенол Тритон Х-100 (1 мг/мл). В пробирках готовят рабочие растворы НПАВ различной концентрации в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5

Данные для построения калибровочной кривой

№ пробирок	Стандартный раствор НПАВ, мл	Вода, мл	Концентрация НПАВ, мг/мл	Оптическая плотность раствора, D_{440}
1	0,2	0,8	0,2	
2	0,4	0,6	0,4	
3	0,6	0,4	0,6	
4	1,0	0	1,0	
5 (контроль на реактивы)	-	1,0	0	

Для каждого рабочего раствора ставят в штатив по 3 пробирки в 3 ряда. В пробирки первого ряда добавляют 1 мл дистиллированной воды, 0,4 мл HCl и 3,5 мл хлороформа. Содержимое интенсивно встряхивают 1 мин. Нижнюю органическую фазу отбирают (попадание воды недопустимо) и переносят в пробирки второго ряда. В пробирки первого ряда снова добавляют по 3,5 мл хлороформа, проводят повторную экстракцию и органическую фазу добавляют к первой порции экстракта в пробирках второго ряда.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

К полученному хлороформенному экстракту добавляют реактивы в строгой последовательности: 3 капли HCl, 3 капли фосфорно-молибденовой кислоты, 0,4 мл роданида аммония (NH_4CNS), 3 капли хлористого олова ($SnCl_2$). Содержимое интенсивно встряхивают 1 мин. Нижнюю органическую фазу переносят в пробирки третьего ряда. В каждую пробирку добавляют безводный сульфат натрия в количестве ≈ 0,5 г. Содержимое интенсивно встряхивают 30 сек. После исчезновения мутности окрашенный экстракт колориметрируют на ФЭК при длине волны 440 нм против хлороформа. Правила работы на ФЭК см. в Приложении.

Полученные значения оптической плотности растворов (D_{440}) используют для построения калибровочного графика. Для этого на ось Х наносят значения использованных концентраций НПАВ, на ось У – соответствующие им значения оптической плотности. График представляет собой прямую, проходящую через начало координат.

б) *Определение концентрации НПАВ в модельных сточных водах:*

Анализ одной пробы осуществляют в 2-х повторностях, для каждой повторности ставят в штатив пробирки в 3 ряда (итого – 6 пробирок). Отбирают по 1 мл пробы в 2 пробирки *первого* ряда, далее анализ осуществляют как при построении калибровочного графика.

Концентрацию НПАВ в модельных сточных водах определяют по калибровочному графику.

Контрольные вопросы и упражнения по теме 1

1. Какие существуют направления в современной токсикологии?
2. Что изучает токсикодинамика?
3. Как классифицируют токсичные соединения?
4. Назовите источники, виды и масштабы выбросов загрязняющих веществ.
5. Перечислите процессы распределения и превращения ксенобиотиков в окружающей среде.
6. Перечислите основные типы неорганических и органических экотоксикантов и обусловленные ими стрессы.
7. Что такое «суперэкотоксиканты»?
8. Поясните, что такое тератогенное, эмбриотоксическое, мутагенное действие токсикантов? Приведите примеры таких ядов.
9. Что такое химический канцерогенез? Поясните механизм образования злокачественных клеток.
10. Объясните, почему тяжелые металлы относят к приоритетным токсикантам? Каков механизм действия тяжелых металлов?
11. Какие вещества блокируют кислородпередающую функцию крови?
12. Перечислите основные патологические формы гемоглобина, какие токсиканты способствуют образованию этих форм?

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

13.Что такое гемолитические яды?
14.Каков механизм токсического действия синильной кислоты и цианидов?
15.Чем опасны ароматические соединения, нефтепродукты и детергенты для биосферы?
16.Какие из углеводородов являются наиболее токсичными, объясните – почему?
17.Каков механизм токсического действия фосфорорганических соединений?
18.Охарактеризуйте особенности воздействия на биосферу пестицидов.
19.Приведите примеры хлорорганических пестицидов, поясните механизм их действия.
20.Какие вещества относят к летучим ядам? Как они влияют на организм человека?
21. Какое токсическое воздействие на организм человека оказывает алкоголь?

ТЕМА 2. БИОТЕСТИРОВАНИЕ И БИОИНДИКАЦИЯ ТОКСИКАНТОВ

Особую роль в оценке состояния окружающей среды играют биологические тесты. Это связано с тем, что результаты химического анализа, проводимого с помощью сложного аналитического оборудования, во многих случаях не позволяют оценить истинную опасность тех или иных загрязнителей для среды обитания, прогнозировать последствия их воздействия на живые организмы. Под биотестированием понимают приемы исследования, при которых о качестве среды, факторах, действующих самостоятельно или в сочетании с другими, судят по выживаемости, состоянию и поведению специально помещенных в эту среду организмов – тест-объектов. Биоиндикация – родственный биотестированию прием, использующий для этих же целей организмы, обитающие в исследуемой среде.

Работа 7. Определение фитотоксичности углеводородзагрязненных почв с помощью фитотеста на проростках растений

Почвы, загрязненные нефтью и нефтепродуктами, приобретают токсические свойства. Главными причинами утраты плодородия нефтезагрязненных почв являются: а) токсическое действие самой нефти на растения; б) существенное ухудшение агрофизических и агрохимических свойств почвы; в) перераспределение доминирующих микроорганизмов в составе активно функционирующего микробного сообщества в сторону фитотоксичных форм.

Для выявления загрязнения почвы и воды широко используется фитотест, в котором растения способны адекватно реагировать на экзогенное химическое воздействие путем снижения всхожести семян, интенсивности про-

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

растания корней и побегов и, следовательно, выступать в роли индикаторов токсичности.

Ход исследования

Для определения *фитотоксических свойств* используют 2 почвенных образца: 1) почва, загрязненная нефтью или нефтепродуктами (дизельное топливо, моторное масло и т.п.) в концентрации 50 г/кг; 2) контроль – чистая почва.

20 граммов испытуемого образца помещают в стеклянные чашки Петри, увлажняют 5-тью мл дистиллированной воды, на поверхность почвы раскладывают 20 предварительно откалиброванных семян тест-растений.

В качестве тест-растений для оценки фитотоксичности почвы используют пшеницу сорта «Саратовская 29» и редис сорта «Красный с белым кончиком» или «Заря». Для каждого образца определение проводят в 3-х повторностях.

После 3 суток инкубации в термостате при 28-30^{o}С определяют всхожесть семян в %, измеряют длину побега, длину корня и, в случае пшеницы, число корней. Разницу показателей до 10 % по сравнению с контролем не принимают во внимание и почву считают экологически чистой, разница в 10-30 % указывает на слабую токсичность почвы, от 30 до 50 % – на среднюю степень, а выше 50 % – на высокую степень фитотоксичности почвы.

В каждой из 3-х чашек с почвенным образцом (контрольным и загрязненным) подсчитывают число проросших семян пшеницы и редиса. Определяют всхожесть семян по формуле:

$$\text{Всхожесть} = \frac{\text{число проросших семян}}{\text{общее число семян}} \times 100\%$$

Для проростков редиса: измеряют в мм длину побегов и длину корней. Для проростков пшеницы: определяют число корней, измеряют в мм длину побегов и длину корневой системы.

На основании проведенных измерений вычисляют среднюю длину побега и среднюю длину корня (корневой системы для пшеницы); среднее число корней для пшеницы – это отношение суммарной длины побегов или корней; суммарного числа корней проростков пшеницы к числу проросших семян.

Результаты измерений вносят в таблицу. При оформлении таблицы 6 для каждого из тестовых растений определяют разницу (в %) изученных показателей (средние значения из 3-х повторностей) между загрязненной и контрольной чистой почвой.

Делают соответствующие выводы о степени фитотоксичности углеводородзагрязненной почвы.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Таблица 6

Результаты исследования фитотоксичности почвы

Показатели	Образцы почвы								Разница между образцами, %
	Загрязненная				Чистая				
	1		3	Средн.	1	2	3	Средн.	
Редис									
Число проросших семян									
Всхожесть, %									
Средняя длина корня, мм									
Средняя длина побега, мм									
Пшеница									
Число проросших семян									
Всхожесть, %									
Среднее число корней									
Средняя длина корневой системы, мм									
Средняя длина побега, мм									

Работа 8. Определение фитотоксичности нефтезагрязненных почв по азотобактеру (метод Красильникова)

Свежеприготовленную агаровую среду Эшби разливают в стерильные чашки Петри и после застывания накрывают стерильными пластинками целлофана, которые тщательно расправляют на поверхности агара стерильным металлическим шпателем. Целлофан предварительно нарезают кружками диаметром, равным диаметру чашки Петри, помещают в свободную чашку Петри, смачивают водой и в таком виде стерилизуют в автоклаве.

На поверхность целлофана в центр чашки с агаром кладут комочек исследуемой нефтезагрязненной почвы (загрязненной искусственно (см. работу 7) или отобранной в реальных условиях нефтезагрязнения) диаметром 2 см, также увлажненной водой. Можно расположить не 1, а 4-5 комочков диаметром 1 см на равном расстоянии друг от друга. На другую чашку Петри аналогичным образом помещают контрольную незагрязненную почву. После наложения комочков почвы на целлофан чашки выдерживают в термостате в течение суток. Через сутки целлофан с почвой снимают с агара, а среду засевают суточной культурой азотобактера. Для этого по 0,1 мкл бактериальной суспензии (10^6 КОЕ/мл) стерильно наносят на агар в чашку Петри и растирают шпателем по поверхности.

При наличии в почве токсичных веществ на газоне азотобактера на поверхности агара через 1-2 сут. образуются стерильные зоны. Количественной мерой фитотоксичности служит диаметр образующейся стерильной зоны. Сравнивают результаты оценки нефтезагрязненной и чистой почвы, делают вывод о фитотоксическом эффекте нефтяного загрязнения.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Работа 9. Изучение влияния токсикантов на почвенные микроорганизмы

Оценка общесанитарного показателя вредности, характеризующего процессы изменения биологической активности почвы от загрязнения химическими веществами, проводится путем определения их подпороговой концентрации, которая не вызывает изменений общей численности микроорганизмов основных физиологических групп более чем на 50 %, а также ферментативной активности почвы более чем на 25 % относительно аналогичных показателей контрольной пробы.

Гигиеническое регламентирование экзогенных химических веществ в почве осуществляют путем учета численности чувствительных к токсикантам групп почвенного микробоценоза, например, целлюлозоразрушающих и аммонифицирующих микроорганизмов.

Задача 1. Оценка численности целлюлозоразрушающих микроорганизмов в образцах почвы

Ход исследования

В экспериментах используют 2 почвенных образца: 1) почва, загрязненная нефтью или нефтепродуктами в концентрации 50 г/кг; 2) чистая почва.

Численность целлюлозоразрушающих микроорганизмов определяют методом предельных разведений. Для этого 1 г почвенного образца помещают в 100 мл стерильной водопроводной воды, тщательно перемешивают. Из колбы стерильно переносят 1 мл суспензии в пробирку с 9 мл стерильного физиологического раствора (разведение 10^{-3}), из этой пробирки 1 мл переносят в следующую пробирку с физиологическим раствором (разведение 10^{-4}).

Высев анализируемой почвенной суспензии (0,1 мл, разведения 10^{-2}-10^{-4}) проводят на модифицированную среду Виноградского, следующего состава (г/л): $(NH_4)_2SO_4$ – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,5; NaCl – 0,5; агар – 20,0; вода водопроводная – 1 л; pH 7,0-7,2. Почвенную суспензию равномерно распределяют стерильным стеклянным шпателем по всей поверхности агара, на который затем накладывают кружки стерильной фильтровальной бумаги, служащей источником углерода, и притирают шпателем так, чтобы они плотно прилегали к нему.

Инокулированные чашки Петри помещают крышками вниз во влажную камеру с температурой 24-26^{o}C. Учет целлюлозоразрушающих микроорганизмов осуществляют на 7-14-ые сутки. По результатам учета количества целлюлозоразрушающих микроорганизмов делают вывод о степени загрязнении почвы.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Задача 2. Оценка численности аммонифицирующих микроорганизмов в образцах почвы

Оценка численности аммонифицирующих бактерий: численность бактерий-аммонификаторов определяют высевом в мясо-пептонный бульон (МПБ).

Ход исследования

Мясо-пептонный бульон разливают в пробирки до 1/3 высоты каждой и стерилизуют при 1 атм. Отдельно стерилизуют чашки Петри, в которых помещены отдельно 30 лакмусовых бумажек и 30 полосок фильтровальной бумаги, пропитанных уксуснокислым свинцом. Высев делают из разведений 10^{-4}-10^{-7}, приготовленных, как описано в предыдущем эксперименте. Объем посевного материала – 1 мл. Каждое разведение высевают в трехкратной повторности. Две пробирки оставляют стерильными до конца опыта в качестве контроля для оценки роста.

После внесения посевного материала между горлышком и пробкой каждой пробирки укрепляют, пользуясь обожженным в пламени пинцетом, полоски фильтровальной бумаги, пропитанной лакмусом и уксуснокислым свинцом. Продолжительность культивирования составляет 5-7 суток при температуре 28-30°С.

О развитии аммонифицирующих бактерий в МПБ судят по помутнению среды, образованию в ней хлопьев или (и) осадка, наличию пленки на поверхности, выделению NH_3 и H_2S. О выделении NH_3 свидетельствует посинение лакмуса, об образовании H_2S – почернение бумаги, пропитанной уксуснокислым свинцом. Показатели роста регистрируют в сравнении со стерильным МПБ в пробирке. Результаты наблюдений для каждого разведения отмечают в таблице 7 («+» – наличие признака; «-» – отсутствие признака).

Наиболее вероятное количество аммонифицирующих бактерий в 1 г почвы рассчитывают и записывают в определенном порядке.

Числовая характеристика –

Наиболее вероятное число клеток, соответствующее числовой характеристике (по таблице Мак-Креди) –

Количество клеток в 1 г исходного субстрата –

Таблица 7

Признаки развития аммонифицирующих бактерий в мясо-пептонном бульоне

Разведение	Повторность	Помутнение среды	Хлопья	Осадок	Выделение	
					NH_3	H_2S
10^{-4}	1 2 3					

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Снижение титра целлюлозоразрушающих и аммонифицирующих микроорганизмов на 50 % и более по сравнению с контролем служит показателем присутствия в почве токсических концентраций ксенобиотиков. Делают соответствующие выводы.

Работа 10. Изучение влияния токсикантов на биохимическую активность почв

Для диагностики негативных процессов в почве, вызванных воздействием токсических веществ, используют показатели биохимической активности почвы. Общий характер имеет величина каталазной активности, используют также полифенолоксидазную, дегидрогеназную активность и др. Активность ферментов в почве определяется с высокой точностью и является устойчивым и чутким показателем биогенности почв.

В экспериментах используют 2 почвенных образца: 1) почва, загрязненная сырой нефтью или нефтепродуктами в концентрации 50 г/кг; 2) чистая почва.

Задача 1. Определение каталазной активности почвы

Фермент каталаза осуществляет реакцию разложения H_2O_2 на воду и молекулярный кислород:

$$H_2O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{\text{каталаза}} O_2 + 2H_2O$$

Перекись водорода образуется в процессе дыхания живых организмов и в результате различных биохимических реакций окисления органических веществ. Высокоактивный кислород, образующийся при участии каталазы, обеспечивает доступным кислородом микроорганизмы, участвующие в процессах разложения органических загрязнителей.

Один из методов определения каталазной активности почвы основан на измерении скорости распада перекиси водорода при взаимодействии ее с почвой по количеству неразложившейся перекиси, которое определяется перманганатометрическим титрованием.

Ход исследования

5 г почвы помещают в колбу емкостью 100 мл, заливают 25 мл 2 %-ного раствора перекиси водорода и помещают в кювету с тающим льдом. Через определенные промежутки времени (0,5; 1,0 и 2 часа) из системы берут пробы по 5 мл, смешивают с 5 мл 10 %-ной серной кислоты и титруют 0,1 н. раствором $KMnO_4$ до слабо-розовой окраски. Каталазную активность почвы выражают в миллилитрах 0,1 н. $KMnO_4$ за 2 часа, которые представляют собой разность между опытными и контрольными определениями. Контрольные определения проводят аналогичным образом на навесках почвы, прогре-

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

тых в термостате в течение 1,5 часа при температуре 160-170°С для инактивации ферментов.

Задача 2. Определение дегидрогеназной активности почвы

Дегидрогеназы катализируют реакции отщепления водорода, т.е. дегидрирования органических веществ, и исполняют роль промежуточных переносчиков водорода. Для количественного определения активности дегидрогеназной реакции в качестве субстрата используют бесцветные соли тетразолия, в частности, 2,3,5-трифенилтетразолийхлорид (ТТХ), который, акцептируя мобилизованной дегидрогеназой водород, превращается в 2,3,5-трифенилформазан (ТФФ), имеющий красную окраску.

Ход исследования

1 г воздушно-сухой почвы помещают в стеклянную пробирку и доливают 2 мл 0,5 % раствора ТТХ, тщательно перемешивают и помещают в термостат на 24 часа при 30°С. После инкубации смесь снова тщательно перемешивают, дают отстояться в течение 10 минут, затем аккуратно удаляют пипеткой надосадочную жидкость. Для извлечения формазана, образовавшегося в процессе восстановления ТТХ, почву заливают 7,5 мл ацетона. Экстракцию проводят в течение 1 часа, перемешивая при этом несколько раз содержимое пробирок. Окрашенный экстракт отбирают и колориметрируют на ФЭК с синим светофильтром, используя кюветы толщиной 10 мм. Правила работы на фотоэлектроколориметре см. в Приложении.

Количество формазана рассчитывают по предварительно построенной калибровочной кривой и выражают в микролитрах водорода (мкл H_2/г почвы) с учетом того, что на образование 1 мг формазана необходимо 150,35 мкл водорода.

Расчет активности дегидрогеназ ведется по формуле

$$АД=С\cdot в\cdot 150{,}35/а\cdot Т\cdot 10,$$

где С – концентрация формазана, найденная по калибровочной кривой; а – навеска почвы (1 г); Т – время инкубации (24 ч); 10 мл – объем формазана, используемый при построении калибровочной кривой; в – количество ацетона, пошедшее на извлечение формазана (7,5 мл).

Для построения калибровочной кривой 25 мг ТФФ растворяют в 100 мл ацетона при нагревании до 30°С на водяной бане. Концентрация полученного основного раствора 0,25 мг/мл. Раствор готовят непосредственно перед употреблением.

Стандартные растворы ТФФ готовят из основного раствора, разводя его в 2, 5, 10, 20, 50 и 100 раз ацетоном. Для этого в градуированные пробирки помещают 5; 2; 1; 0,5; 0,2; 0,1 мл основного раствора ТФФ и доливают до 10 мл ацетоном. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и оставляют на 5 мин. Каждая концентрация готовится в 3-4 повторностях. В течение 1 ч после приготовления рабочие растворы должны быть проанализированы,

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

при этом не следует допускать попадания на них прямых солнечных лучей. Интенсивность окраски рабочих растворов ТФФ, содержащих от 0,0025 до 0,1250 мг/мл вещества, измеряют на ФЭК с синим светофильтром, используя кювету толщиной 10 мм.

По результатам измерения дегидрогеназной и каталазной активности в чистых и загрязненных образцах характеризуют соответствующие состояния почвенной микрофлоры.

Работа 11. Использование дождевых червей для оценки токсичности загрязненной почвы

Дождевые черви – постоянные обитатели почвы. Они играют особую роль в почвообразовательном процессе, обогащая почву азотом и биогенными элементами, участвуют в разложении растительного опада. Оценить степень воздействия экотоксикантов на почву можно с помощью дождевых червей.

В связи с эколого-физиологическими особенностями эти организмы контактируют с почвенными частицами, воздухом и влагой не только на поверхности кожных покровов, но и внутри пищеварительного тракта, непосредственно перерабатывая и накапливая большое количество почвы. Таким образом, они подвергаются прямому влиянию неорганических и органических веществ, находящихся в почве. Дождевые черви легко разводятся в лабораторных условиях, имеют короткое время регенерации и хорошо изучены.

Оценку токсичности почвы на дождевых червях проводят по методу, основанному на исследовании их выживаемости при воздействии токсичных веществ.

Для определения токсических свойств используют 4 почвенных образца: почва, загрязненная нефтью или нефтепродуктами в концентрации 5, 10, 25 г/кг и контрольная чистая почва. Тестирование проводят в 2-х повторностях по десять червей в каждой. Используются взрослые черви с пояском.

Ход исследования

В емкости помещают исследуемые почвенные образцы (1 кг), увлажняют до 15% содержания по весу. Влажность почвы поддерживают в процессе инкубации. Для предотвращения испарения воды и удаления животных, на контейнеры помещают неплотные крышки или сверху плотно фиксируют марлей. В каждый контейнер добавляют по 10 червей и культивируют их при 20-24^{o}C.

Численность выживших червей наблюдают через 7 и 14 дней. Полученные результаты заносят в таблицу 8. Дополнительно учитывают изменение поведенческих реакций у тест-организмов.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Таблица 8

Результаты определения токсических свойств почвы с использованием дождевых червей

Выживаемость червей	Образцы почв с концентрацией загрязнителя, г/кг											
	5			10			25			чистая		
	1	2	Средн.	1	2	Средн.	1	2	Средн.	1	2	Средн.
Через 7сут., абс.												
%												
Через 14 сут., абс.												
%												

Показателем выживаемости служит среднее количество червей, выживших в тестируемой почве, по сравнению с контролем (чистая почва). Критерием высокой токсичности является гибель 50% и более дождевых червей в тестируемой почве по сравнению с контролем.

Делают вывод о влиянии загрязнителя на токсичность почвы и зависимости токсического эффекта от его концентрации.

Работа 12. Биоиндикация токсичности природных вод с помощью дафний

Дафнии – наиболее часто используемый тест-объект для определения токсичности воды. Метод позволяет определить токсичность сточных и природных вод. Критерием острой токсичности является гибель 50 % и более дафний в анализируемой воде по сравнению с контролем в течение 24, 48 или 96 часов.

Ход исследования

Пробу природной воды отбирают объемом до 1 л. Пробу фильтруют через фильтровальную бумагу и заливают в емкости для биотестирования. Берут 3 сосуда для исследуемой воды и 3 сосуда для контрольной пробы, не содержащей токсичных веществ. Наливают в них по 100 мл исследуемой воды и по 100 мл чистой воды для контроля. В каждый сосуд помещают по 10 особей дафний. Их переносят стеклянной трубкой диаметром 5-7 мм сначала в сачок, а затем в сосуды, погрузив его в воду. Наблюдают за ходом эксперимента через 24, 48 и 96 часов. Дафний во время эксперимента не кормят. По окончании эксперимента проводят учет выживших дафний. Выжившими считаются дафнии, если они свободно передвигаются в толще воды или всплывают со дна сосуда не позднее 15 сек. после его легкого покачивания.

На основании полученных результатов в 3-х повторностях рассчитывают среднее арифметическое количество выживших дафний в контроле и опыте. Для расчета тест-параметра – процента гибели дафний в опыте по отношению к контролю – используют формулу:

САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

$100 \times (X_1 - X_2)/X_1$,

где X_1 и X_2 – среднее арифметическое количество (экз.) выживших дафний в контроле и опыте.

Проба воды оценивается как обладающая острой токсичностью, если за 24 часа биотестирования гибнет 50 % и более дафний по сравнению с контролем. Если в течение опыта в контрольном варианте произошла гибель более 10 % дафний, то полученные результаты не учитывают, опыт повторяют, предварительно проверив пригодность тест-объекта для биотестирования.

Работа 13. Биотестирование воды с использованием ампулярий

Использование в качестве тест-организмов молодых улиток ампулярий (*Pomacea* sp.) перспективно в связи с рядом имеющихся у них особенностей: они обладают интенсивным обменом веществ, чувствительны к наличию токсических веществ в воде, которые быстро оказывают влияние на обменные процессы в их организме, и это воздействие можно быстро обнаружить (от нескольких часов до двух суток).

Даже при очень низких содержаниях токсических веществ в воде (примерно 0,01-0,1 от предельно допустимой концентрации) изменяются поведенческие реакции ампулярий, они начинают меньше есть, медленнее ползать, нуждаться в большем или, наоборот, меньшем количестве кислорода, запираться в своей раковине крышечкой, отгораживаясь от вредного действия грязной воды.

Ход исследования

Для определения токсичности воды в биотесте в качестве тест-функции используют пищевое поведение моллюсков. Используют популяцию из 20-30 улиток ампулярий, содержащихся в отдельном аквариуме при pH 6,5-8. Перед экспериментом улиток не кормят в течение суток.

В кювету длинной 15-20 см, шириной 10-12 см наливают воды из аквариума (слой 3-4 см). Исследование проводят при температуре воздуха 24-28°С (оптимальная температура воды при биотестировании – 25°С). Из аквариума отбирают 6 улиток и располагают их у одной из стенок кюветы, а в 3 см от противоположной стенки помещают гранулу корма. С помощью секундомера определяют время поиска моллюсками пищевой приманки (от момента помещения в кювету до касания улиткой корма). Первый и последний результат отбрасывают. После контакта с кормом улитку немедленно убирают.

Кювету промывают и для каждых последующих 6-ти исследуемых ампулярий используют новую приманку и новую порцию воды из аквариума. Получив данные о 10-15 выборках, проводят статистическую обработку результатов. Рассчитывают среднее время поиска приманки улитками в от-

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

дельных группах и среднее этих средних. Среднее значение x рассчитывают по формуле:

$$x = \frac{X_1+X_2\ldots+X_n}{n} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} x_i$$

где x_i – значения отдельных наблюдений, n – количество наблюдений.

Затем определяют стандартное отклонение (S):

$$S = \sqrt{\sum (x_i - x)^2 / n - 1}$$

и стандартное отклонение распределения выборочных средних ($S_м$):

$$S_M = S / \sqrt{N}$$

Среднее значение времени поиска пищевой приманки и стандартное отклонение выборочных средних – это параметры поведения исследованной совокупности улиток в норме.

Для тестирования водной пробы в емкость наливают 1 л этой воды, при необходимости ее нагревают до 27°С, и помещают туда 6 улиток на 2 часа. Через 2 часа в кювету наливают тестируемую воду из емкости с улитками, помещают пищевую приманку и улиток в стартовую зону. Проводят эксперимент, как описано выше.

Рассчитывают значение функции нормализации (Z):

$$Z = (\overline{X} - x) / S_M,$$

где $\overline{X}$ – выборочное среднее для группы улиток, использованной в биотесте.

В норме значение функции нормализации не должно превышать 1,96, если это значение больше 3, то проба токсична. Чем больше величина нормализации, тем токсичнее проба воды.

На основании полученных данных делают вывод о токсичности тестируемой воды.

Работа 14. Исследование качества воды водоемов методом автографии на фотобумаге

Окислительно-восстановительные процессы в почвах и илах оказывают заметное влияние на развитие животного и растительного населения этих субстратов. В окислительной (аэробной) среде, достаточно увлажненной и

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

содержащей свободный кислород, образуются полностью окисленные соединения, служащие пищей для растений, например, нитраты, фосфаты, анионы многие микроэлементов. При малом содержании кислорода в субстрате развиваются восстановительные (анаэробные процессы). В этих условиях накапливаются восстановители, отрицательно влияющие на развитие растений. Длительный анаэробиоз (как и аэробиоз) нежелателен для почвенных организмов.

Промышленные выбросы угнетающе действуют на микробиологические процессы в почвах, способствуют созданию в них анаэробных условий. В загрязненных прудах, озерах и реках, потерявших способность к самоочищению, вода обеднена кислородом, а донные отложения представляют собой ядовитый, сильно восстановленный субстрат, непригодный для жизни донных животных.

Уровень восстановленности почвы, донных отложений и других субстратов можно ориентировочно определить с помощью аппликационного метода - автографии на фотобумаге. Метод основан на восстановлении бромистого серебра, находящегося в эмульсии засвеченной фотобумаги, восстановленными веществами изучаемого субстрата. При этом в эмульсионном слое фотобумаги образуется множество частиц металлического серебра в виде черных и бурых пятен. Интенсивность окраски пятен тем больше, чем выше восстановленность среды в местах соприкосновения фотоэмульсии с почвой.

Ход исследования

Образцы почвы, ила, взятые накануне, но не более чем за сутки до начала опыта, помещают в литровые химические стаканы. Образцы почвы заливают дистиллированной водой, а илов – водой из исследуемого водоема до их полного насыщения. Для заполнения водой всех пор субстрата образцам дают выдержку около часа. Фотобумагу (глянцевую, тонкую, нормальную) нарезают в виде полос размером 4×9 см, и после нумерации в соответствии с номерами образцов помещают вертикально во влажные образцы. Для этого торцом металлической линейки делают в образце щель глубиной около 8,5 см и шириной 4-5 см, опускают в нее полоску фотобумаги, а затем линейкой прижимают субстрат к фотобумаге. Не рекомендуется держать фотобумагу на свету более 15-20 минут.

После 72-часовой экспозиции фотобумагу извлекают из субстрата, быстро промывают в обычной, а затем в дистиллированной воде, закрепляют в течение 5 минут в 25 %-ном растворе гипосульфита и снова промывают. Высушивают полоски на фильтровальной бумаге так, чтобы эмульсионный слой был сверху.

Если образцы почвы или донных отложений взяты без нарушения их структуры, фотобумага покажет кроме уровня восстановленности (густота окраски) еще и распределение восстановленных зон в образце. Делают выводы.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Работа 15. Индикация загрязнения окружающей среды по качеству пыльцы

Качество пыльцевых зерен в большой степени зависит от уровня физического и химического загрязнения среды. Пыльца отличается высокой чувствительностью к действию отрицательных факторов и может являться индикатором загрязнения среды генетически активными компонентами. Методика анализа качества пыльцы заключается в определении процента ненормальных (абортивных) пыльцевых зерен.

Высокая чувствительность к действию мутагенов (этиленимин, нитрозоэтилмочевина, некоторые пестициды) проявляется у томатов. Генетически активные факторы среды резко нарушают процесс образования пыльцы у томатов, доводя до полного отсутствия в пыльниках нормальных пыльцевых зерен.

Ход исследования

Выращивают растения томатов одного сорта в присутствии мутагена и без него. Препаровальной иглой извлекают пыльцу из пыльников цветков и помещают на предметное стекло. С помощью пипетки наносят на пыльцу каплю слабого раствора йода и размещают каплю препаровальной иглой так, чтобы все пыльцевые зерна были в растворе, а не плавали на поверхности. Выдерживают препарат в таком виде в течение 2 минут, после этого накрывают каплю покровным стеклом и рассматривают препарат под микроскопом. По нескольким полям зрения подсчитывают количество нормальных и абортивных пыльцевых зерен (общая сумма 200-300). Для отличия нормальных зерен от ненормальных пользуются таблицей 9.

Таблица 9

Отличие нормальных пыльцевых зерен от абортивных

Нормальные пыльцевые зерна	Абортивные пыльцевые зерна
1) интенсивно окрашены	1) не окрашены (или окрашены слабо)
2) одинаковы по размеру	2) разных размеров
3) одинаковы по форме	3) неправильной формы

Определяют процент нормальных (или абортивных) пыльцевых зерен по каждому цветку, взятому для анализа. Обычно пыльца у растений, произрастающих в нормальных условиях, имеет хорошее качество, процент нормальных пыльцевых зерен близок к 100 %. Повышенное загрязнение может снизить процент нормальных пыльцевых зерен до 50 % и ниже. Делают вывод о степени загрязнения.

Контрольные вопросы и упражнения по теме 2

1. Что такое биотестирование, для чего оно используется? В чем отличие биоиндикационных методов?

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

2. Какие тест-объекты используются для экспериментов по биотестированию?
3. Что служит основанием для выбора тест-объекта?
4. Что такое токсикометрия? Охарактеризуйте основные ее параметры (DL_{50}, CL_{50} и др.).
5. Опишите виды и уровни предельно допустимых концентраций (ПДК).
6. Назовите принципы мониторинга почв и других объектов биосферы.
7. Что такое фитотоксичность химических элементов и соединений?
8. Перечислите гидробионтов, которые используются для биотестирования качества воды?
9. Как влияют токсичные вещества на почвенную биоту и биохимическую активность почвы?
10. Какие группы почвенных микроорганизмов является биоиндикаторными? При каких загрязнителях почвы изменяется их численность?
11. Активность каких почвенных ферментов используют в почвенно-экологическом мониторинге? Объясните, почему.
12. Как оценивают уровень загрязнения природных вод? Какие биоиндикаторы используются?
13. Как осуществляют биотестирование и биоиндикацию мутагенных, тератогенных и канцерогенных соединений?
14. Какие существуют проблемы при оценке токсичности мутагенных и канцерогенных соединений?
15. Опишите методику оценки суммарной мутагенной активности с помощью теста Эймса.

ТЕМА 3. БИОАККУМУЛЯЦИЯ ТОКСИКАНТОВ. МЕХАНИЗМЫ ИХ ДЕТОКСИКАЦИИ У ЖИВОТНЫХ И РАСТЕНИЙ

Работа 16. Исследование растений на присутствие токсикантов

Золой называется остаток, полученный после сжигания и прокаливания органического материала. Зола растений содержит в своем составе практически все элементы, входящие в их состав.

Ход исследования

Приготовление зольного раствора: для анализа предварительно высушенные растения озоляют, 1 г золы помещают в пробирку, смачивают ее несколькими каплями дистиллированной воды, добавляют 4-5 мл 25 %-ного раствора соляной кислоты и выдерживают на кипящей водяной бане 15-20 минут. Содержимое переносят в мерную колбу на 100 мл, затем пробирку дважды ополаскивают дистиллированной водой, сливая ее в ту же колбу, доводят объем до метки и тщательно перемешивают (раствор А).

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Определение серы: 5 мл раствора А переносят в пробирку, нагревают до кипения и приливают 3-4 мл 10 %-ного раствора хлорида бария. Выпадение белого осадка сульфата бария демонстрирует присутствие серы в зольном растворе.

Определение железа: 3-4 мл раствора А помещают в пробирку и приливают 4-5 капель 10 %-ного раствора роданида калия или аммония. Появление розового окрашивания указывает на то, что в золе растений содержатся соединения железа.

Определение свинца: для проведения качественного анализа готовят азотнокислую вытяжку. Зольный остаток 5-10 г растительной продукции растворяют в азотной кислоте, нейтрализуют раствором аммиака и проводят анализ с родизонатом натрия. Для этого 1 каплю исследуемого раствора помещают на лист фильтровальной бумаги, добавляют каплю свежеприготовленного 0, 2%-ного раствора родизоната натрия. В присутствии ионов свинца образуется синее кольцо или пятно. При добавлении 1 капли буферного раствора, содержащего в 10 мл 0,19 г гидротартрата натрия и 0,15 г винной кислоты и имеющего pH 2,8, синий цвет превращается в красный. Реакция очень чувствительна: открываемый минимум 0,1 мкг.

Основным источником загрязнения окружающей среды свинцом является автомобильный транспорт: вместе с выхлопными газами от автомобиля свинец, образующийся при сгорании этилированного бензина, попадает в атмосферу. В зависимости от интенсивности движения опасная зона вдоль автомагистралей может простираться от 10 до 500 м. В пределах этой зоны наблюдается *повышенное содержание свинца в объектах окружающей среды*, например, в растениях. Количество свинца уменьшается по мере удаления от дороги.

Ход исследования

Собирают около 100 г растительной пробы на расстоянии 2, 10, 50, 100 м от оживленной дороги, измельчают, добавляют смесь этилового спирта и воды (50 мл), упаривают экстракт, чтобы свинец перешел в раствор. В изучаемые экстракты по каплям добавляют раствор сульфида натрия, в результате чего выпадает черный осадок сульфида свинца разной интенсивности: чем ближе к дороге, тем осадка больше. Делают выводы.

Работа 17. Определение хлорофоса в кормах методом хроматографирования в тонком слое

Хлорофос – пестицид, инсектицид. Относится к производным фосфоновой кислоты (фосфорорганические соединения). Препарат широко приме-

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

няется для борьбы с различными вредителями растений, паразитами животных и синантропными насекомыми. Механизм действия хлорофоса, так же, как и у других фосфорорганических соединений, связан с нарушением передачи нервного импульса в ганглиях между ассоциативными нейронами и с подавлением активности ацетилхолинэстеразы.

По отношению к людям и теплокровным животным хлорофос среднетоксичен, но из-за возможного бластомогенного действия относится ко второму классу опасности. Имеет умеренные кумулятивные свойства, обладает раздражающим действием. При нарушении мер предосторожности, способа обработки препаратом, рекомендуемых норм и в результате несчастных случаев возможны проявления интоксикации, которые характерны при отравлении фосфорорганическими соединениями.

Ход исследования

Трава, корм, силос – навеску 20 г, экстрагируют 20 минут в 100 мл воды, второй раз в 70 мл воды. Водные растворы объединяют в делительной воронке, добавляя 1-1,5 г поваренной соли, экстрагируют три раза хлороформом по 50 мл, вытяжки обезвоживают безводным сернокислым натрием, фильтруют и выпаривают. Сухой остаток растворяют в 0,2-0,5 мл хлороформа, наносят на пластинку и хроматографируют.

На хроматографическую бумагу на расстоянии 1,5 см от края при помощи медицинского шприца или пастеровской пипетки, наносят исследуемую пробу в одну точку, так чтобы диаметр пятна не превышал 1 см. Справа и слева от пробы на расстоянии 2 см наносят стандартные растворы, содержащие 1 и 10 мкг (0,001 и 0,01 мг) исследуемого препарата.

Край пластинки с нанесенными растворами должен быть погружен в растворитель бензол не более чем 0,5 см. После того как фронт растворителя поднимется на 10 см, пластинку вынимают из камеры и оставляют на несколько минут для испарения растворителя. Пластинку вновь помещают в камеру для хроматографирования с подвижным растворителем (смесь гексана с ацетоном 1:1) и хроматографируют как указано выше. Высушенную пластинку опрыскивают проявляющим реактивом (1 % -ный раствор резорцина в 10 %-ном растворе КОН) и помещают в сушильный шкаф при 100^{o}С до появления оранжево-красных пятен.

Количественное определение производят путем сравнения размера пятна пробы с размером пятна стандартных растворов.

Расчет результатов анализа производят по формуле:

$$X = \frac{A \times 1000}{B};$$

где, X – содержание хлорорганических пестицидов в анализируемой пробе, мг/кг; A – количество пестицида, найденное путем визуального сравнения пробы со стандартными растворами путем измерения площади пятен, мг; B –

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИНГ. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

массы навески, мг. Делают вывод о содержании хлорофоса в исследуемом материале.

Работа 18. Изучение воздействия кадмия на лабораторных животных

Кадмий – тяжелый металл высокой степени токсичности. Обладает крайне низкой скоростью выведения из организма. Этот металл широко используется в никель-кадмиевых аккумуляторах, в качестве пигмента в лакокрасочном производстве, при изготовлении пластмасс. В организм человека и животных кадмий поступает в большей степени с продуктами питания (в основном растительного происхождения) и питьевой водой, в меньшей – с атмосферным воздухом. Значительный источник кадмия – курение (1-2 мкг поступает при выкуривании 1 сигареты). В организме этот токсикант вызывает гипертонию, накапливается в почках и снижает иммунитет.

Одним из цитотоксических эффектов кадмия является активация перекисного окисления липидов (ПОЛ). Токсичными для организма являются не столько перекиси, сколько продукты глубокого окисления липидов (альдегиды, кетоны, лактоны, кислоты, диеновые конъюгаты). Малоновый диальдегид (МДА) является конечным токсичным продуктом ПОЛ. Его концентрация увеличивается в органах и тканях при токсическом воздействии, что, прежде всего, свидетельствует о нарушении мембранных функций.

Активация глутатионовой системы – один из основных механизмов метаболизма кадмия. Ключевой фермент данной системы – глутатион-S-трансфераза (GST) – дезактивирует ксенобиотики путем конъюгации с восстановленным глутатионом (GSH), с их последующим выведением из организма.

Ход исследования

Подготовка исследуемого материала: за сутки до проведения исследования крысам опытной группы подкожно вводят раствор $Cd(NO_3)_2$ в дозе 2 мг/кг (LD_{50}=4,5 мг/кг), животным контрольной группы равный объем физиологического раствора.

Животных умерщвляют декапитацией под эфирным наркозом. Кровь собирают в гепаринизированные пробирки. Животных вскрывают, печень, почки, мозг, сердце извлекают, промывают в 0,9 %-ном растворе NaCl и подвергают растиранию в фарфоровой ступке. Собранную кровь подвергают центрифугированию в течение 10 мин при 3000 об/мин и отбирают сыворотку. Полученную взвесь форменных элементов центрифугируют в 0,9 %-ном растворе NaCl в объёмном соотношении 1:3 в течение 10 мин при 2000 об/мин, отбрасывая супернатант. Затем эту процедуру повторяют ещё раз. Для получения гемолизата эритроцитов к 0,1 мл отмытой эритроцитарной взвеси добавляют 1 мл дистиллированной воды.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Определение общей активности глутатион-S-трансферазы. Метод основан на определении скорости ферментативного образования GS-2,4-динитробензола в катализируемой ферментом реакции восстановленного глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом, водный раствор образующегося продукта имеет максимум поглощения при длине волны 340 нм.

0,1 мл гемолизата эритроцитов вносят в кювету спектрофотометра с длиной оптического пути 10 мм, содержащую 1,2 мл 2 мМ раствора 1-хлор-2,4-динитробензола и 1,2 мл 2 мМ раствора восстановленного глутатиона в 0,1 М фосфатном буфере (pH 6,5). Параллельно опытным исследуют контрольную пробу, в которую вместо биологического материала вносят 0,1 мл дистиллированной воды. После перемешивания содержимого кюветы включают секундомер и производят измерение оптической плотности при длине волны 340 нм против воды сразу же после запуска реакции и через 3 мин.

Расчет активности производят по формуле:

$$A = \frac{\Delta E \cdot V_{рс} \cdot 10^6 \cdot 11}{V_{пр} \cdot l \cdot \varepsilon \cdot t},$$

где A – активность фермента, мкмоль/(мин·л); ΔE – разность экстинкций проб до и после инкубации без величины разницы экстинкций в контроле; $V_{рс}$ – объём реакционной смеси (2,5 мл); $V_{пр}$ – объём пробы гемолизата эритровзвеси (0,1 мл); l – длина оптического пути (1 см); ε – молярный коэффициент светопоглощения образующегося продукта ($9600 М^{-1} \cdot см^{-1}$); t – время инкубации (3 мин); 10^6 – коэффициент пересчёта моль в мкмоль; 11 – степень разведения эритровзвеси в гемолизате.

Определение содержания восстановленного глутатиона. Метод основан на способности кислоторастворимых тиоловых группировок при взаимодействии с 5-5′-дитиобис-(2-нитробензойной кислотой) образовывать окрашенное соединение – тио-2-нитробензойную кислоту, водный раствор которой имеет максимум светопоглощения при 412 нм.

Ход исследования

Подготовка калибровочных растворов. Расчет содержания восстановленного глутатиона производится с помощью калибровочного графика.

Калибровочные растворы готовят путем серии последовательных разведений матричного раствора восстановленного глутатиона с концентрацией 2 ммоль/л в фосфатном буфере (pH 6,5). Для этого в центрифужную пробирку с обозначенной концентрацией 1 ммоль/л отбирают 0,6 мл матричного раствора, добавляют 0,6 мл 0,1 М фосфатного буфера pH 6,5 и хорошо перемешивают. Затем 0,6 мл раствора отбирают в следующую пробирку и вновь разбавляют таким же объемом буфера. Из последней пробирки с наименьшей

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

концентрацией удаляют 0,6 мл раствора. Таким образом должны быть получены растворы с концентрациями: 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 ммоль/л.

Далее калибровочные растворы обрабатываются в соответствии с изложенной ниже методикой. Значения оптической плотности продуктов реакции, измеренные на спектофотометре при длине волны 412 нм, вносят в таблицу 10 и используют для построения калибровочного графика.

Исследование проб: к 0,6 мл гемолизата эритроцитов и калибровочным растворам добавляют 0,2 мл 20 %-ного раствора сульфосалициловой кислоты. Пробы перемешивают и центрифугируют в течение 10 минут при 3000 об/мин. 0,2 мл супернатанта переносят в пробирки, содержащие 2,55 мл 0,1 М трис-HCl буфера с 0,01%-ным раствором этилендиаминотетраацетата (ЭДТА) и pH 8,5. К полученной смеси добавляют 25 мкл раствора 5-5′-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты). После перемешивания пробы производят измерение оптической плотности продуктов реакции на спектрофотометре при длине волны 412 нм против дистиллированной воды в кювете с длиной оптического пути 10 мм.

Таблица 10

Данные для построения калибровочной кривой

Концентрация, ммоль/л	2	1	0,5	0,25	0,125
Оптическая плотность растворов (D_{412})					

Определение малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты (Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г.)

При высокой температуре в кислой среде малоновый диальдегид (МДА) реагирует в кислой среде с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), образуя окрашенный триметиновый комплекс с максимумом поглощения при 532 нм. Молярный коэффициент экстинкции этого комплекса ε равен $1{,}56 \cdot 10^5$ $см^{-1}М^{-1}$.

Подготовка биологического материала. Навеску ткани (печень, почки, сердце, мозг), около 1 г, растирают в охлаждённой фарфоровой ступке. К полученному гомогенату добавляют 10 мл 0,025 М трис-HCl буфера, содержащего 0,175 М хлорид калия.

Ход исследования

Приготовленный описанным выше способом тканевый гомогенат в буферном растворе помещают в центрифужные пробирки и осаждают белок 1 мл 17 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Образующийся осадок отделяют центрифугированием в течение 10 мин при 6500 об/мин. Надосадочную жидкость по 2 мл переносят в пробирки, добавляют 1 мл 0,8 %-ного раствора ТБК и помещают пробы на 10 мин в кипящую водяную баню. В качестве контроля используют пробы, содержащие вместо надосадочной жидкости буферный раствор (pH 7,4). После развития розовой окраски пробы

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

охлаждают до комнатной температуры и измеряют оптическую плотность при 532 нм (на спектрофотометре в кювете с длиной луча 1 см) против контрольной пробы. Количество малонового диальдегида рассчитывают, используя указанную выше величину молярного коэффициента экстинкции, и полученный результат выражают в нмолях на пробу.

По результатам проведенной работы заполняют предлагаемую таблицу 11 и делают вывод о влиянии подкожного введения кадмия на процесс перекисного окисления липидов в органах и активность глутатионовой системы эритроцитов белых крыс.

Таблица 11

Влияние ионов кадмия на процессы ПОЛ и показатели глутатионовой системы

Измеренные параметры	Контрольная группа	Подопытная группа
Активность GST эритроцитов, мкмоль/(мин·л)		
Содержание GSH эритроцитов, моль/л		
Содержание МДА в печени, нмоль/л		

Контрольные вопросы и упражнения по теме 3

1. Каковы пути поступления токсичных веществ в организм из внешней среды? Назовите факторы, влияющие на токсический эффект при различных путях поступления.
2. Что такое абсорбция токсикантов? Опишите особенности абсорбции токсикантов при различных путях поступления.
3. Что такое пресистемная элиминация ядов? Приведите примеры этого явления.
4. Перечислите виды возможного токсического действия на организм.
5. Опишите механизмы проникновения токсикантов через мембраны и последствия этого для клетки и организма в целом.
6. Дайте определение понятиям – депонирование, летальный синтез, конъюгация, выведение токсичных веществ.
7. В чем биологический смысл процесса биотрансформации токсикантов?
8. Как осуществляется ферментативная биотрансформация водорастворимых ксенобиотиков?
9. Какие ферментативные реакции 1-ой и 2-ой фазы биотрансформации токсикантов происходят в организме? Опишите их.
10. Какие ксенобиотики подвергаются ферментативным реакциям окисления, восстановления, гидролиза?
11. Какие 2 реакции восстановления хинонов могут происходить в организме? Какая из этих реакций связана с окислительным стрессом?
12. Что такое цитохром P_{450}, какое значение имеет этот белок в детоксикации ксенобиотиков?

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

13. Чем отличаются реакции метилирования и ацетилирования от других реакций 2-ой фазы биотрасформации?
14. Какие косубстраты принимают участие в реакциях 2-ой фазы биотрасформации?
15. Опишите один из путей метаболизма токсикантов – образование свободных радикалов.
16. Какие реакции конъюгации с глутатионом известны? Опишите их.

ТЕМА 4. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА И ДЕТОКСИКАЦИОННОЙ ТЕРАПИИ

Химико-токсикологическое исследование биологического материала на наличие токсических веществ состоит из нескольких этапов: изолирование исследуемых соединений из объектов биологического происхождения, очистка полученных вытяжек от примесей, выделение исследуемых веществ из предварительно очищенных вытяжек, идентификация и количественное определение выделенных веществ. для выполнения отдельных этапов химико-токсикологического анализа применяются соответствующие химические, физические и физико-химические методы. Для изолирования токсических веществ из органов трупов в основном применяются методы экстракции, выщелачивания, разрушения биологического материала, перегонки с водяным паром и др. Очистка вытяжек из биологического материала осуществляется с помощью методов экстракции, диализа, хроматографии в тонких слоях сорбентов, адсорбционной молекулярной хроматографии на колонках, гель-хроматографии и др.

Значительно большее число методов применяется для идентификации и количественного определения токсических веществ, выделенных из биологического материала. для идентификация указанных веществ применяются качественные реакции, методы хроматографии в тонких слоях сорбентов, газожидкостной хроматографии, спектроскопии в УФ- и ИК-областях, электрофореза, микрокристаллоскопии, микродиффузии и др. Одну из групп методов, применяемых для обнаружения токсических веществ, составляют фармакологические, биохимические и другие методы.

Работа 19. Потенциометрическое определение значений pH и редокс-потенциалов модельных биологических сред (кровь, моча)

На формирование токсического эффекта влияет физико-химические свойства химического вещества и биологической среды: агрегатное состояние вещества, размер частиц дисперсной фазы, природа химических связей, структура молекул токсиканта, способность к образованию координацион-

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

ных связей с биолигандами, относительная молекулярная масса, летучесть, липофильность, гидрофильность, pH и окислительно-восстановительный потенциал биосреды и ксенобиотика. Чрезвычайно важной характеристикой токсиканта, используемой для прогнозирования механизмов токсичности, являются окислительно-восстановительные потенциалы токсикантов и биосред.

Задача 1. Измерение pH проб биологической жидкости

Необходимо измерить pH нескольких проб биологической жидкости (моча). Найти среднее значение по каждой пробе. Показать соответствие/несоответствие полученных значений физиологической норме.

Ход исследования

В стакан с пробой биологической жидкости (моча) помещают электрод pH-метра, включают pH-метр. Проводят измерение pH биологической жидкости. Заносят полученный результат в таблицу 12. Повторяют измерение ещё два раза. Выключают pH-метр и помещают электрод в стакан с дистиллированной водой. Рассчитывают среднее значение pH пробы. Повторяют измерения для оставшихся четырех проб биологической жидкости.

Таблица 12

Результаты определения среднего значения проб pH мочи

№	Значения pH			$pH_{ср}$
	I	II	III	
1				
2				
3				
4				
5				

Интервал pH мочи – физиологическая норма (справочные данные): 4,8-7,2.

Делают вывод о соответствии интервала определенных значений pH справочным данным.

Задача 2. Экспериментальное определение pK_a токсиканта (методом потенциометрического титрования)

Токсичность химических веществ зависит от их растворимости в жидких биологических средах. Степень ионизации химического вещества зависит от значений его pK_a и pH биологической среды. По теории Бренстеда-Лоури частица является основанием или кислотой в зависимости от того, с чем она реагирует. Кислотно-основное равновесие по Бренстеду-Лоури смещено от более сильной кислоты к более слабой. Сила кислоты характеризуется константой кислотности (K_a) (иногда вместо константы кислотности используют ее отрицательный логарифм pK_a). Чем больше константа кислотности (и, соответственно, чем меньше pK_a), тем сильнее кислота.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Необходимо экспериментально определить pK_a токсиканта (методом потенциометрического титрования.

Ход исследования

В колбу помещают 10 мл исследуемой жидкости с предварительно измеренным значением pH (яд кислотной природы). Далее постепенно добавляют по 1 мл раствора щелочи, каждый раз отмечая значение pH, измеренного на pH-метре, до прекращения изменения pH. Результаты заносят в таблицу 13.

Строят график зависимости значений pH от объема добавленной щелочи.

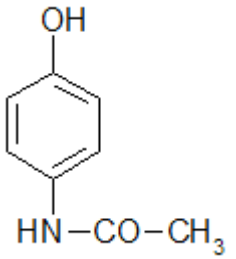
Таблица 13

Результаты потенциометрического титрования остатков жидкости с места отравления

V (NaOH), мл	pH

Делают вывод, в котором подтверждают природу яда (слабая кислота/слабое основание) с указанием значения pK_a и обоснование необходимости подкисления/подщелачивания мочи для более полного выведения ксенобиотика.

Работа 20. Химико-токсикологический анализ таблеток, найденных на месте происшествия (на примере парацетамола)



Парацетамол – N-(4-гидроксифенил)ацетамид. Применяется в медицинской практике в качестве анальгезирующего, жаропонижающего и слабого противовоспалительного средства. Этот препарат может вызывать побочные эффекты, при длительном применении, особенно в больших дозах, парацетамол может оказывать нефротоксическое и гепатотоксическое действие. Парацетамол всасывается в верхних отделах кишечника, метаболизируется в печени, выделяется в основном почками. При применении парацетамола следует следить за функцией печени, состоянием кроветворной системы, возможны аллергические реакции. Частота отравления жаропонижающими и нестероидными противовоспалительными средствами составляет примерно 12 %.

Парацетамол проявляет слабые кислотные свойства ($pK_a = 9{,}38$), вследствие своей липофильности быстро всасывается из ЖКТ. Определение парацетомола в плазме крови при передозировке можно проводить и через 4 часа после отравления, что связано с увеличением периода его полувыведения при повреждении печени токсическими дозами лекарственного вещества.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Токсические концентрации парацетамола в плазме выше 50 мкг/мл указывают на острое отравление и высокую вероятность гепатотоксического действия.

Задача: В лабораторию для проведения химико-токсикологического анализа с места происшествия поступил образец – белый порошок. По словам пострадавшего, для снятия симптомов простуды им было принято неизвестное лекарственное средство, хранившееся в домашней аптечке и использованное ранее с этой же целью. Предварительные скрининговые испытания позволили предположить, что исследуемый порошок – парацетамол.

Проведите следующие подтверждающие испытания.

Качественный анализ порошка

– укажите цвет, фазовое состояние (аморфный или кристаллический), запах, растворимость в воде, растворе щелочи, эфире и этаноле лекарственного вещества исследуемого образца;

– для идентификации парацетамола в биопробе проведите извлечение из подкисленного раствора хлороформом. ТСХ-система – хлороформ : этанол (99:1). Проявите 5 %-ным раствором $FeCl_3$ (синее окрашивание пятен).

– получите УФ-спектр 0,0008 %-ного водного раствора исследуемого порошка в интервале длин волн от 200 до 400 нм.

Ход исследования

1. Около 0,045 г (точная навеска) исследуемого порошка помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют 60 мл воды, перемешивают в течение 10 мин, доводят объем раствора до метки.

2. Один мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

3. Получают спектр поглощения исследуемого раствора в интервале длин волн от 200 до 400 нм, используя кварцевую кювету толщиной 10 мм.

4. Наличие полосы поглощения с максимумом при 243 нм позволяет сделать вывод, что исследуемый порошок содержит парацетамол.

Количественный анализ

Измерения проводят с использованием раствора рабочего стандартного образца (РСО).

Ход исследования

1. Для приготовления около 0,04 г (точная навеска) стандартного образца парацетамола помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют 60 мл воды, перемешивают до растворения, доводят объем раствора водой до метки. Один мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и вновь доводят объем раствора до метки.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

2. Снимают на спектрофотометре в программе «фотометрическое измерение» показания поглощения раствора стандартного образца и исследуемого раствора парацетамола.

3. Рассчитывают содержание лекарственного вещества (5) в исследуемом порошке парацетамола.

Делают заключение по результатам эксперимента, в котором указывают: 1) парацетамол является (не является) действующим лекарственным веществом в исследуемом порошке (биоматериале), найденном на месте происшествия; 2) содержание действующего вещества в испытуемом образце составляет…

Работа 21. Изучение механизмов действия антидотов различной химической природы

Антидот (противоядие, «даваемое против») – фармакологическое средство, применяемое при лечении отравлений и способствующее обезвреживанию яда или предупреждению и устранению вызываемого им токсического эффекта. Антидотная терапия в большинстве случаев высокоспецифична и поэтому с оптимальной эффективностью может быть использована при достоверной клинико-лабораторной идентификации острого отравления. В противном случае при ошибочном введении антидота в большой дозе возможно его токсическое влияние на организм. Эффективность антидотной терапии значительно снижена на терминальной стадии острых отравлений при тяжелых нарушениях кровообращения и газообмена, что требует одновременного проведения реанимационных мероприятий.

В зависимости от механизма действия выделяют несколько групп антидотов:

- сорбенты – антидоты, действие которых основано на физических процессах (активированный уголь, вазелиновое масло, полифепан);

- антидоты, обезвреживающие яд путем химического взаимодействия с ним (перманганат калия, гипохлорит натрия), что приводит к образованию менее токсичных веществ;

- противоядия, конкурирующие с ядом в действии на ферменты, рецепторы или образующие в организме соединения, обладающие высоким сродством к яду (реактиваторы холинэстеразы, налоксон, нарканти), комплексообразователи (унитиол, трилон Б, тетацин-кальций, пентацин), метгемоглобинобразователи (амилнитрит, натрия нитрит, метиленовый синий), последние применяются при отравлении синильной кислотой и цианидами. К этой группе относят и функциональные антагонисты (атропин-прозерин);

- иммунологические противоядия, применяемые при отравлении животными и растительными ядами (противозмеиная, противоботулиническая, антидигоксиновая и др. сыворотки).

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Задача 1. Сравнительный анализ адсорбционной способности антидотов-адсорбентов (активированный уголь, полифепан)

Активированный уголь является универсальным антидотом. Он сорбирует яды и препятствует их всасыванию благодаря высокой поверхностной активности. Применяют в дозе 0,2-0,5 г/кг массы тела измельченным в водной взвеси.

«Полифепан» – макропористый, мягкоскелетный сорбент, не травмирующий (в отличии от активированного угля и других жесткоскелетных препаратов) слизистую оболочку кишечника, способен к сорбции макромолекул и бактериальных клеток. Полифепан связывает различные микроорганизмы, продукты их жизнедеятельности, токсины экзогенной и эндогенной природы, аллергены, тяжелые металлы, радиоактивные изотопы, и способствует их выведению через ЖКТ.

1-ый вариант

Ход исследования

Готовят $1{,}5\times10^{-3}$ %-ный раствор метиленового синего (модель ксенобиоика) и измеряют его абсорбции (A_0) на фотоэлектроколориметре при длине волны 665 нм (толщина кюветы 1 см). Правила работы на фотоэлектроколориметре см. в Приложении.

Активированный уголь и полифепан растирают в ступке. Точные навески полученных порошков (около 0,1 г) помещают в цилиндры с притертой пробкой объемом 50 мл и добавляют по 15 мл раствора метиленового синего. Смеси энергично взбалтывают в течение 5 мин, оставляют на 0,5 часа, после чего отфильтровывают. Фильтраты помещают в кюветы толщиной 1 см и измеряют абсорбцию (A_1 и A_2) при той же длине волны (665 нм). Результаты заносят в таблицу 14.

Таблица 14

Сравнение эффективности адсорбции метиленового синего активированным углем и полифепаном фотоколориметрическим методом

Проба	A_{665}	Эффективность адсорбции, $k_{адс}$	Вывод об адсорбционной активности антидотов
Исходный раствор метиленового синего		A_0	
Раствор после обработки активированным углем		A_0/A_1 =	
Раствор после обработки полифепаном		A_0/A_2 =	

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

2-ой вариант

Ход исследования

Готовят $7{,}5\times10^{-3}$ %-ный раствор метиленового синего (проба №1). Кювету фотоэлектроколориметра (толщина кюветы 1 см) заполняют раствором и измеряют абсорбцию A_0 при длине волны 665 нм. Правила работы на фотоэлектроколориметре см. в Приложении.

В 4 конические колбы на 100 мл наливают 10 мл раствора (пробы №2-5). Колбы устанавливают на магнитные мешалки, включают их, обеспечивая одинаковую скорость перемешивания. В момент включения секундомера в каждую колбу высыпают заранее приготовленные навески (по 0,02 г) активированного угля. Через 5 мин пробу №2 отфильтровывают через складчатый фильтр и определяют оптическую плотность (абсорбцию света) A_1. Также поступают с другими растворами (пробы №3-5), измеряя их абсорбцию (A_3, A_4, A_5) через 7, 10 и 12 мин соответственно. Результаты заносят в таблицу 15. Аналогичный опыт проводят с полифепаном.

Таблица 15

Кинетика связывания метиленового синего активированным углем/полифепаном

№ пробы	Время от момента введения адсорбента (антидота)	Значение A_{665}	lg A_{665}
1	0		
2	5		
3	7		
4	10		
5	12		

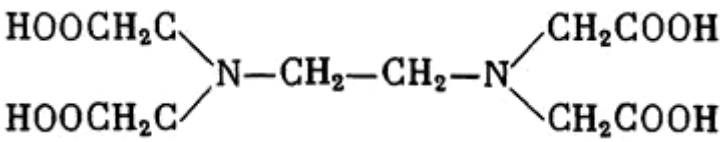
Строят кинетические кривые A= F(t) в арифметических (t-A) и полулогарифмических (lgA-t) координатах. По наклону полученных прямых определяют константы скорости связывания токсиканта (метиленового синего) с антидотом-адсорбентом. Делают вывод об эффективности антидотов.

Задача 2. Изучение механизмов взаимодействия антидотов-хелатообразователей (ЭДТА, унитиол) с тяжелыми металлами (Pb^{2+}, Cd^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+})

В последние десятилетия наблюдается все возрастающий интерес токсикологов к особому классу химических соединений, получивших название комплексонов. Эти вещества отличаются способностью образовывать прочные неионизирующие водорастворимые комплексы со многими неорганическими катионами, в том числе, с тяжелыми металлами. Молекулы комплексонов практически не подвергаются расщеплению или какому-либо изменению в биологической среде, что является их важной фармакологической особенностью.

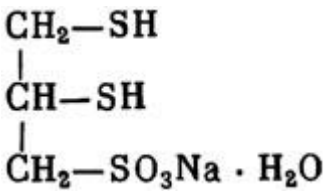
САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

В качестве антидотов среди комплексонов наибольшее распространение получили различные соли этилен-диаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА).



Как видно из приведенной формулы, ЭДТА – аминополикарбоновая (четырехосновная) кислота, она способна образовывать прочные комплексные соединения со многими металлами. Однако сильнее это свойство проявляется у ее солей – натриевых, кальциевых, кобальтовых и др. $CaNa_2$ЭДТА (тетацин) нашел широкое применение в клинике профессиональных заболеваний и продолжает оставаться незаменимым антидотом свинца и по сей день. Совершенно идентично тетацин обменивает ион кальция на ионы других двухвалентных металлов: ртути, кобальта, кадмия, бария.

Унитиол – это 2,3-димеркантопропансульфонат натрия, синтезированный в начале 50-х годов киевскими токсикологами и химиками под руководством академика АМН СССР А.И. Черкеса и профессора В.Е. Петрунькина. Унитиол хорошо растворим в воде, он прочно вошел в арсенал антидотно-лечебных средств; накоплен большой опыт успешного его использования при отравлениях различными соединениями мышьяка, ртути, свинца, кадмия, никеля, хрома, кобальта, ряда радиоактивных элементов.



Ход исследования

В штатив помещают 8 пробирок (2 ряда по 4 пробирки). В пробирки ближнего и дальнего ряда наливают по 1 мл 0,01 моль/л растворов нитратов: $Pb(NO_3)_2$, $Cd(NO_3)_2$, $Zn(NO_3)_2$, $Cu(NO_3)_2$. Во все пробирки добавляют несколько капель 1 ммоль/л р-ра натрия гидроксида (так, чтобы не растворились осадки амфотерных гидроксидов цинка и кадмия). Далее в ближний ряд пробирок добавляют 1 каплю 0,1 моль/л раствора ЭДТА, а в дальний ряд – 1 каплю 0,1 моль/л раствора унитиола. Отмечают наблюдаемые изменения в таблице 16.

Таблица 16

Результаты наблюдений взаимодействия ионов токсичных элементов с антидотами

Реагент	Наблюдения			
	Pb^{2+}	Cd^{2+}	Zn^{2+}	Cu^{2+}
1 ммоль/л р-р NaOH				
0,1 моль/л р-р ЭДТА				
0,1 моль/л р-р унитиола				

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Делают выводы о механизмах взаимодействия и прочности связывания отдельных ионов антидотами-хелатообразователями.

Контрольные вопросы и упражнения по теме 4

1. Перечислите физико-химические параметры вещества, влияющие на его токсичность.
2. Назовите наиболее важное физико-химическое свойство токсиканта, обусловливающее его пассивную диффузию через мембрану.
3. От чего зависит распределение ядов в тканях?
4. Когда необходимо учитывать кислотно-основные свойства ядов?
5. Как проявляется корреляция «структура-токсикологический эффект»? Приведите примеры.
6. На чем основаны спектральные методы анализа веществ?
7. От чего зависят молярный и удельный коэффициенты экстинкции?
8. Какие длины волн соответствуют видимой области электромагнитного спектра, микроволновой, рентгеновской, области ИК, УФ?
9. Какую зависимость характеризует закон Бугера-Ламберта-Бера?
10. Дайте определение понятиям антидот, антидотная терапия, детоксикация.
11. Что включает неотложная помощь при острых отравлениях?
12. Перечислите методы активной детоксикации, симптоматической терапии.
13. Какие методы используют для определения токсичных веществ в биологических компонентах, продуктах питания, лекарственных препаратах и природных объектах?

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Рекомендуемая литература

1. Бадюгин И.С., Каратай Ш.С., Константинова Т.К. Экстремальная токсикология: руководство для врачей / Под ред Е.А. Лужникова – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 416 с.
2. Беленков Ю.Н. Свободнорадикальные процессы в норме и патологических состояниях. Пособие для врачей. – М., 2001. – 78 с.
3. Бингам Ф.Т., Коста М., Эйхенбергер Э. Некоторые вопросы токсичности ионов металлов. – Москва: Мир, 1993. – 368 с.
4. Военная токсикология, радиобиология и медицинская защита: Учебник для слушателей и курсантов военно-медицинских вузов / Куценко С.А., Бутомов Н.В., Гребенюк А.Н. и др., Под ред. С.А. Куценко. – СПб.: Изд-во Военно-медицинской академии, 2003. – 524 с.
5. Егорова Н.А. Экстраполяция токсикологических данных с животных на человека. – М.: Медицина, 2009. – 208 с.
6. Исидоров В.А. Экологическая химия: Учебное пособие для вузов. – СПб.: Химиздат, 2001. – 304 с.
7. Келина Н.Ю., Безручко Н.В. Токсикология в таблицах и схемах / Н.Ю. Келина, Н.В. Безручко. – Ростов н/Д: Феникс, 2006. – 144 с.
8. Кузнецов А.Е., Градова Н.Б. Научные основы экобиотехнологии. – М.: Мир, 2006. – 504 с.
9. Куценко С.А. Основы токсикологии: Разделы: токсикометрия, токсикокинетика, токсикодинамика, экотоксикология и др.: Учеб. пособие для мед вузов Санкт-Петербурга, 2004. – 720 с.
10. Мелехова О.П. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование. – М.: Академия, 2008. – 288 с.
11. Общая токсикология / Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова. – М.: Медицина, 2002. – 608 с.
12. Пурыгин П.П., Белоусова З.П. Основы химической токсикологии. Учебное пособие. – Самара: Издательство «Самарский университет», 2003. – 51 с.
13. Раменская Г.В., Родионова Г.М., Кузнецова Н.И., Петухов А.Е. ТСХ-скрининг токсикологически значимых соединений, изолируемых экстракцией и сорбцией / Г.В. Раменская и др., Под ред. А.П. Арзамасцева. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 240 с.
14. Ревич Б.А. Экологическая эпидемиология: Учебник для высш. учеб. заведений / Б.А. Ревич, С.А. Авалиани, Г.И. Тихонова, Под ред. Б.А. Ревича. – М.: Издательский центр «Академия», 2004. – 384 с.
15. Токсикологическая химия: учебник для вузов / Под ред. Т.В. Плетеневой. – 3-е изд., исп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 512 с.
16. Федорова А.И., Никольская А.Н. Практикум по экологии и охране окружающей среды: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений. – М.: Гуманит. изд. центр ВЛАДОС, 2003. – 288 с.
17. Хабриев Р.У. Токсикологическая химия. Аналитическая токсикология. Учебник (+ CD-ROM). – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
18. Экология и охрана окружающей среды при химическом загрязнении: учеб. пособие / Л.К. Садовникова, Д.С. Орлов, И.Н. Лозановская. 3-е издание, перераб. – М.: Высш. шк., 2006. – 334 с.
19. Экологический мониторинг: шаг за шагом / Веницианов Е.В. и др., Под ред. Е.А. Заика. – М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2003. – 237 с.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Приложение 1

Правила работы в химической лаборатории

Работать в лаборатории разрешается только в халатах. Длинные волосы должны быть подобраны. Все процедуры при выполнении работы можно проводить только на своем рабочем месте или в вытяжном шкафу.

При возникновении каких-либо неясностей работу прекратить и обратиться за разъяснением к преподавателю или лаборанту.

В процессе работы все флаконы с реактивами должны находиться на отведенных для них местах. Необходимо соблюдать большую осторожность при работе с кислотами и щелочами.

Запрещается отмеривать реактивы путем всасывания ртом в пипетку.

Запрещается закрывать пальцем отверстия пробирок и колб при взбалтывании растворов.

При нагревании пробирки в пламени горелки следить, чтобы отверстие пробирки не было направлено на кого-либо из работающих.

Во избежание выброса содержимого из пробирки нагрев производить постепенно, постоянно встряхивая ее и периодически вынимая из пламени.

Во избежание ожогов и поражений от брызг и выбросов не следует наклоняться над сосудом, в который налита какая-либо жидкость.

Пролитый реактив немедленно удалить со стола.

При попадании на кожу кислоты или щелочи необходимо тотчас же пораженный участок обильно промыть водой, обработать нейтрализующими веществами:
2 %-ным раствором бикарбоната натрия или 2 %-ным раствором уксусной кислоты.

Запрещается принимать пищу в лаборатории.

Запрещается трогать и включать приборы без разрешения преподавателя.

После окончания работы показать преподавателю результаты эксперимента и, получив разрешение на окончание работы, привести в порядок свое рабочее место.

Использованную посуду освободить от содержимого, сполоснуть и сдать лаборанту.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Приложение 2

Правила работы на фотоэлектроколориметре (ФЭК)

Общие замечания. Определение концентрации веществ в растворе с помощью фотометрических приборов основано на способности растворов поглощать часть световой энергии при прохождении через них пучка света. Явление поглощения света раствором количественно описывает закон Ламберта–Бера, согласно которому

$$\lg \frac{Jo}{J} = \varepsilon \cdot C \cdot L,$$

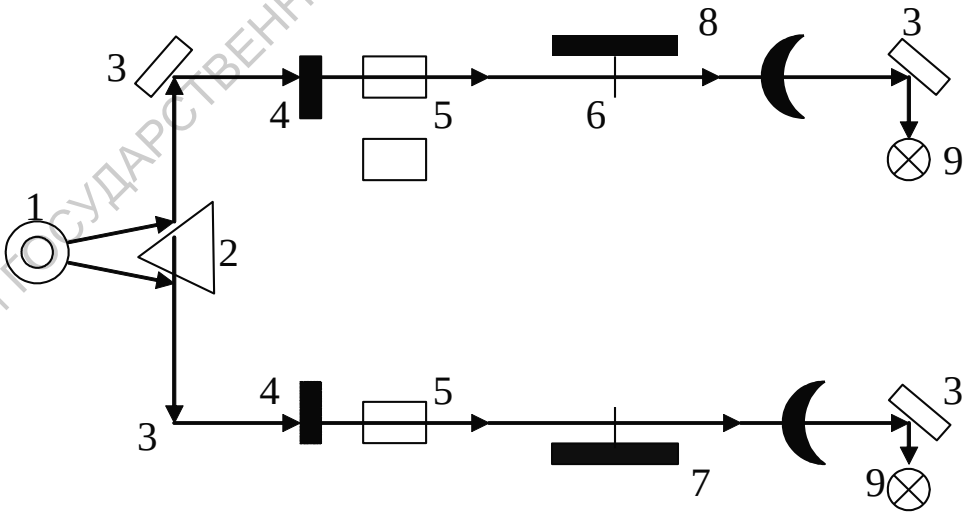
где *Jo* – начальная интенсивность света, прошедшего через раствор; *J* – интенсивность света; ε – молярный коэффициент экстинкции, зависящий от природы вещества, поглощающего свет, и длины волны поглощаемого света; C – концентрация растворенного вещества, моль/л; L – толщина слоя раствора, см.

Величина, стоящая в левой части уравнения, характеризует степень ослабления интенсивности света при прохождении его через раствор. Эту величину называют оптической плотностью раствора (D) или его экстинкцией (E).

Упрощенная формула записи закона Ламберта–Бера (E=C·L) показывает, что экстинкция прямо пропорциональна толщине слоя и концентрации раствора; это обстоятельство и используется в биохимии при фотометрическом определении концентрации веществ с помощью специальных приборов – фотоэлектроколориметров (ФЭК) и спектрофотометров, позволяющих определять экстинкции растворов.

Принципы работы фотоэлектроколориметра. Фотоэлектроколориметр (ФЭК) предназначен для измерения экстинкции прозрачных окрашенных растворов (колориметрия), а также для измерения величины светорассеяния непрозрачных растворов и суспензий (нефелометрия). Каждый ФЭК снабжен набором светофильтров, позволяющих варьировать длину волны света, проходящего через раствор (в переделах видимой части спектра), а также комплектом стеклянных кювет с различными расстояниями между рабочими гранями для проведения измерения при различной толщине слоя раствора (L).

Принципиальная оптическая схема ФЭКа представлена на рисунке.



Пучок света от источника (1) падает на призму (2), которая делит его на два потока: левый и правый. Левый световой поток является компенсационным, правый – измерительным. Отразившись от зеркала (3) и пройдя через светофильтры (4), пучки света идут параллельно, проходя через кюветы (5), и попадают на фотоэлементы (9), соединенные с гальванометром. В правый поток света помещают опытную (с раствором) или контрольную (с растворителем) кюветы; в левом потоке всегда находится только кювета с растворителем. При равенстве световых потоков, падающих на фотоэлемент, стрелка гальвано-

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

метра находится в среднем (нулевом) положении. Если правый световой пучок проходит через кювету с окрашенным или светорассеивающим раствором, то его интенсивность ослабляется, по сравнению с левым пучком, проходящим через кювету с растворителем. Выравнивание интенсивностей световых потоков проводят с помощью специальных барабанов – левого (7) и правого (8), при вращении которых световые потоки регулируются с помощью раздвижных диафрагм (6).

При проведении колориметрических или нефелометрических измерений в правый световой поток сначала помещают кювету с исследуемым раствором и уравнивают потоки вращением левого барабана, а затем – кювету с контролем, и уравнивают потоки правым барабаном.

Промышленность выпускает ряд моделей колориметров, имеющих весьма сходные конструкции и различающихся только особенностями фотоэлементов и количеством светофильтров. Ниже приведено краткое описание прибора КФК-2.

Колориметр фотоэлектрический концентрационный (КФК-2) предназначен для количественного определения веществ в окрашенных растворах по их оптической плотности или коэффициенту светопропускания в диапазоне волн 315-980 нм. КФК-2 состоит из оптического блока (передняя часть прибора), где находятся осветитель, светофильтр, оптика, кюветное отделение, фотометрическое устройство и регистрирующий прибор, и блока питания (задняя часть), где расположены стабилизатор напряжения с выпрямителем и силовой трансформатор.

Источником света в колориметре служит галогенная лампа. Приемниками излучения являются фотоэлемент Ф-26 для работы в диапазоне волн 315-540 нм и фотодиод ФД-24К для работы в специальном диапазоне 590-980 нм.

Световой поток лампы с помощью специальных устройств конденсируется, усиливается и проходит через светофильтр, кювету с исследуемым раствором и падает на приемник излучения. При этом световое излучение преобразуется в электрические сигналы, которые подаются на измерительный прибор. Показания микроамперметра пропорциональны световому потоку, проходящему через исследуемый раствор.

Использование конкретного цветового светофильтра позволяет пропускать через раствор лучи определенной длины волны, поглощение которых характерно для исследуемого вещества. В КФК-2 имеется набор из 11 светофильтров. Приведенная ниже таблица позволяет ориентировочно выбрать светофильтр для измерения оптической плотности некоторых окрашенных растворов.

Окраска исследуемого раствора	Цвет необходимого светофильтра	Длина волны пропускаемого света, нм
Желтая	Синий	420–450
Оранжевая	Синий	430–460
Красная	Зеленый	460–500
Пурпурная	Зеленый	490–530
Синяя	Оранжевый	590
Сине-зеленая	Красный	600–650
Голубая	Красный	750
Сине-фиолетовая	Красный	750

Обычно эффективную длину волны и цвет светофильтра указывают в используемом методе.

Известно, что чем толще слой жидкости, через который проходит луч света, тем больше поглощение светового пучка и тем выше показание оптической плотности исследуемого раствора. К колориметру прилагается набор кювет, отличающихся расстоянием между рабочими гранями, через которые проходит световой поток. Это расстояние (в мм)

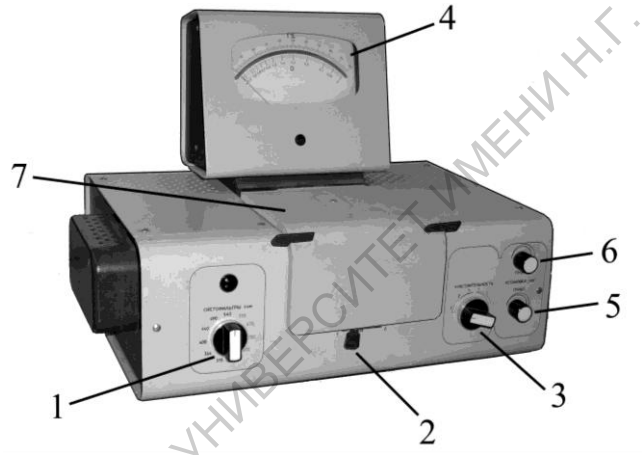
САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

указано на одной из рабочих граней. На боковой стенке кювет имеется метка, до которой необходимо наливать жидкость. При работе с летучими растворами кюветы закрывают специальными крышками.

Набор кювет обеспечивает возможность работы с толщиной слоя исследуемого раствора от 1 до 50 мм. Подбор кювет осуществляется таким образом, чтобы оптическая плотность исследуемого раствора не была ниже величины 0,15 и выше 0,7. Предварительный выбор кювет производится визуально, соответственно интенсивности и окраски раствора. Если раствор интенсивно окрашен, следует пользоваться кюветами с малой рабочей длиной. В случае слабоокрашенных растворов рекомендуется работать с кюветами большей рабочей длины.

Все кюветы перед каждым измерением тщательно промывать и высушивать. Не касаться рабочих стенок кюветы пальцами!

Общая схема прибора КФК-2 и обозначения



1 – Рукоятка установки светофильтра (около рукоятки маркировка по длине волны).
2 – Ручка перемещения кювет в кюветном отделении.
3 – Ручка включения чувствительности фотоприемников (обозначена цифрами 1, 2 и 3 черного цвета при работе в диапазоне волн от 315 до 540 нм и красного цвета – в диапазоне от 590 до 980 нм).
4 – Микроамперметр (по верхней шкале измеряют коэффициент светопропускания (от 0 до 100%), а по нижней – оптическую плотность раствора (от 0 до 1,5).
5 – Ручка «грубой» настройки микроамперметра.
6 – Установка «точной» настройки микроамперметра.
7 – Крышка кюветного отделения.

Правила работы на КФК-2

I. Подготовка прибора к работе

1. Установить нужный светофильтр (рукояткой 1).
2. Рукоятку 3 (чувствительность фотоэлемента) установить на цифру 1 соответствующего цвета: при работе в диапазоне волн от 315 до 540 нм чувствительность обозначена цифрами черного цвета и в диапазоне от 590 до 980 нм – красного цвета.
3. Проверить, выключен ли микроамперметр (рукоятки 5 и 6 должны быть повернуты до отказа влево).

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

4. Прибор включить (вилку в сеть; тумблер, расположенный на задней стенке в нижнем левом углу, переключить в положение «вкл»). При этом загорается лампочка накаливания.
5. Прибор прогреть в течение 15-20 минут.

II. Измерение оптической плотности раствора

1. Кювету с контролем или растворителем поставить в дальнее (от исследователя) гнездо кюветодержателя; кювету с исследуемым раствором (опытом) – в ближнее гнездо кюветодержателя.
2. Кювету с контролем (или растворителем) поместить в световой поток поворотом ручки 2 до отказа влево.
3. Закрыть крышку кюветного отделения (7).
4. Установить стрелку микроамперметра на 0 по нижней шкале поворотом ручки 5 («грубой» настройки). В случае необходимости воспользоваться ручкой 6 («точной» настройки).

Примечание. Если не удается вывести стрелку микроамперметра на 0, то необходимо повысить чувствительность фотоэлемента. Для этого необходимо:

а) микроамперметр выключить (рукоятки 5 и 6 до отказа влево);

б) рукоятку переключения чувствительности фотоэлемента (3) поставить на цифру 2 соответствующего цвета;

в) вывести стрелку микроамперметра на 0 по нижней шкале (то есть повторить действия, указанные в пункте 4).

Если и в этом случае стрелка микроамперметра не выводится на 0, необходимо еще раз повысить чувствительность фотоэлемента, повторяя все действия, перечисленные в пунктах «а», «б» и «в», но установив рукоятку 3 на цифру 3 соответствующего цвета.

5. Заменить в световом потоке кювету с контролем на кювету с исследуемым раствором (опытом), поворачивая рукоятку 2 до отказа вправо.
6. Записать величину оптической плотности исследуемого раствора по нижней шкале микроамперметра.
7. Микроамперметр выключить (рукоятки 5 и 6 до отказа влево).

III. Завершение работы на приборе

1. Реактивы из кювет вылить.
2. Кюветы сполоснуть дистиллированной водой и поставить в чашку Петри вверх донышком (кюветы необходимо полоскать только после полного завершения работы или методики, в промежутках между отдельными измерениями этого делать не следует!).
3. Прибор выключить (тумблер, расположенный на задней стенке в левом углу, переключить в положение «выкл.»; вилку вынуть из розетки).
4. Крышку кюветного отделения закрыть.

Примечание. При работе на КФК-2 необходимо соблюдать следующие правила:

1. До включения прибора в сеть проверить заземление.
2. Не оставлять прибор включенным без надобности.
3. Следить за чистотой прибора, не проливать реактивы.
4. Не хлопать крышкой кюветного отделения.
5. Особенно осторожно обращаться с кюветами – не царапать, протирать только мягкой и чистой тряпочкой (марлей).
6. При смене светофильтра работу продолжать не ранее чем через 5 минут.
7. При переключении светофильтров и замене кювет в кюветодержателе микроамперметр должен быть выключен (рукоятки 5 и 6 должны находиться в крайнем левом положении!).

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Приложение 3

Реактивы и оборудование

Работа 1-2. Методы идентификации нитратов и нитритов

Материалы исследования и реактивы

1. Серная кислота, конц.
2. Дифениламин кристаллический.
3. Реактив Грисса: раствор А – 0,5 г сульфаниловой кислоты растворяют в 150 мл 12 %-ной уксусной кислоты. Раствор Б – 0,2 г α-нафтиламина растворяют в нескольких каплях ледяной уксусной кислоты и смешивают с 150 мл 12 %-ной уксусной кислоты. Перед употреблением растворы А и Б смешивают в равных объемах.
4. Физиологический раствор – 0,9%-ный раствор NaCl.
5. Риванольный раствор – таблетку риванола растворяют при нагревании в 200 мл 8%-ного раствора HCl.
6. Бихромат калия, 0,1 %-ный раствор.
7. KNO_2.
8. KNO_3.
9. Раствор салицилата натрия, 0,5 %-ный.
10. Щелочной раствор сегнетовой соли: 400 г NaOH и 60 г сегнетовой соли растворяют в 1 л дистиллированной воды.
11. Нарезанная пластинками свекла.
12. Исследуемый раствор №1 (0,1%-ный раствор KNO_2).
13. Исследуемая вода из водоема.

Оборудование

1. Штативы с пробирками.
2. Миллиметровая бумага.
3. ФЭК.
4. Карандаш по стеклу.
5. Мерные колбы на 500, 250 и 100 мл.
6. Градуированные пипетки.
7. Стеклянные кюветы.

Работа 3. Обнаружение тяжелых металлов и других токсических неорганических соединений

Выявление тяжелых металлов

Материалы исследования и реактивы

1. KJ, насыщенный раствор.
2. KJ, 5 %-ный раствор.
3. $CuSO_4$, 5 %-ный раствор.
4. Дистиллированная вода.
5. Йодид меди: 5,3 г йодида калия растворить в минимальном количестве воды, добавить 40 мл 10 %-ного раствора сульфата меди и через несколько минут профильтровать. Образовавшийся осадок промыть дистиллированной водой до полного обесцвечивания промывных вод. Фильтр с осадком проколоть, смыть дистиллированной водой в колбу и довести до объема 50 мл.
6. Аммиак, 10 %-ный раствор.
7. $K_4[Fe(CN)_6]$, 5 %-ный раствор.
8. Уксусная кислота (конц.).

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

9. Уксусная кислота, 10 %-ный раствор.
10. $Pb(CH_3COO)_2$, 5 %-ный раствор.
11. H_2SO_4, 1 %-ный раствор.
12. Этиловый спирт.
13. NaOH, 10 %-ный раствор.
14. $K_2Cr_2O_7$, 5 % и 10 %-ный растворы.
15. HNO_3.
16. CH_3COONa, 0,5 %-ный раствор.
17. Исследуемые растворы № 2 (0,05%-ный раствор Hg_2Cl_2), 3 (0,05%-ный раствор $PbCl_2$, 4 (0,1%-ный раствор $CuSO_4$).
18. Исследуемая вода из водоема.
19. Стандартный раствор, содержащий 0,1 мг/мл свинца.

Оборудование

1. Стаканчики на 50 мл.
2. Медная проволока, обработанная азотной кислотой (1:1).
3. Водяная баня.
4. Стеклянные палочки.
5. Фильтровальная бумага.
6. Фарфоровые чашки.
7. Предметные стекла.
8. Штативы с пробирками.
9. Миллиметровая бумага.
10. ФЭК.
11. Стеклянные кюветы.

Обнаружение токсичных неорганических соединений

Материалы исследования и реактивы

1. H_2SO_4, 10 %-ный раствор.
2. CH_3COONa, насыщенный раствор, подкисленный 0,2 мл конц. уксусной кислоты.
3. $K_2Cr_2O_7$, 5 %-ный раствор.
4. HNO_3, конц.
5. H_2O_2.
6. KSCN.
7. $K_3[Fe(CN)_6]$.
8. $K_4[Fe(CN)_6]$.
9. HCl.
10. KCl, 1 н. раствор.
11. NaOH, 6 н. раствор.
12. Индикатор – конго красное.
13. Раствор – осадитель алюминия (в 200 мл насыщенного раствора хлористого аммония прибавляют1 мл 25 %-ного раствора аммиака. Реакция осадителя должна быть в пределах 7,8-7,9.
14. Исследуемый раствор №5.
15. Исследуемая вода из водоема.
16. Исследуемая почва, pH<5.

Оборудование

1. Штативы с пробирками.
2. Водяная баня.
3. Стаканы на 200-500 мл.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

4. Градуированные пипетки.
5. Бумажные фильтры.
6. Магнитная мешалка.
7. Воронки стеклянные.
8. Карандаш по стеклу.
9. ФЭК.
10. Стеклянные кюветы.

Работа 4. Обнаружение мочевины в объектах окружающей среды

Материалы исследования и реактивы

1. HNO_3, конц.
2. Кристаллическая мочевина.
3. NaOH, 10 %-ный раствор.
4. $CuSO_4$, 1 %-ный раствор.
5. Исследуемый раствор №6.

Оборудование

1. Штативы с пробирками.
2. Предметные стекла.
3. Спиртовки.

Работа 5. Токсичные органические вещества, качественное обнаружение их в окружающей среде

Материалы исследования и реактивы

1. NaOH, 10 %-ный раствор.
2. $AgNO_3$, .2 %-ный раствор.
3. HNO_3, конц.
4. Реактив Люголя.
5. Исследуемые растворы № 7, 8, 9, 10, 11, 12.
6. Раствор фуксинсернистой кислоты: 1 г фуксина основного или парафуксина для фуксинсернистой кислоты растворяют в 500 мл воды на кипящей водяной бане. Раствор охлаждают до температуры 18-20°С, фильтруют в мерную колбу, вместимостью 1 л, и прибавляют 30 мл 20%-ного раствора калия пиросернистокислого (или 25 мл 20%-ного раствора натрия пиросернистокислого), через 20 мин к смеси прибавляют 10 мл концентрированной соляной кислоты, доводят объем раствора водой до метки и выдерживают не менее суток.
7. Основной раствор формальдегида с концентрацией 4 мг/мл.
8. H_2SO_4, конц.
9. Формалин.
10. $FeCl_3$, 5 %-ный раствор.
11. Глюкоза, 2 %-ный раствор.
12. Реактив Фолина.
13. Na_2CO_3, 20 % раствор.
14. Стандартный раствор фенола (10 мг/мл).

Оборудование

1. Штативы с пробирками.
2. Бумажные фильтры.
3. Стеклянные воронки.
4. Миллиметровая бумага.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

5. Водяная баня.
6. ФЭК.
7. Спектрофотометр.
8. Стеклянные и кварцевые кюветы.

Работа 6. Определение концентрации НПАВ в модельных сточных водах

Материалы исследования и реактивы

1. Стандартный раствор НПАВ: Тритон Х-100 (1 мг/мл).
2. HCl, 1:1.
3. Фосфорно-молибденовая кислота, 10 %-ный раствор.
4. Роданид аммония (NH_4CNS), 10 %-ный раствор.
5. Хлористое олово ($SnCl_2$), 10 %-ный раствор.
6. Na_2SO_4 безводный.
7. Хлороформ.
8. Модельные сточные воды.

Оборудование

1. Штативы с пробирками.
2. Пипетки на 5, 2, 1 мл.
3. ФЭК (кюветы с рабочей длиной 1 см).
4. Миллиметровая бумага.
5. Карандаши по стеклу.

Работа 7. Определение фитотоксичности углеводородзагрязненных почв методом проростков

Материалы исследования и реактивы

1. Почва.
2. Сырая нефть или нефтепродукты (дизельное топливо, моторное масло и др.).
3. Семена пшеницы и редиса.

Оборудование

1. Чашки Петри.
2. Термостат.
3. Пинцеты.
4. Линейки.

Работа 9. Определение фитотоксичности нефтезагрязненных почв по азотобактеру (метод Красильникова).

Материалы исследования и реактивы

1. Почва.
2. Сырая нефть или нефтепродукты (дизельное топливо, моторное масло и др.).
3. Агаризованная среда Эшби, состав, г/л: манит – 20; K_2HPO_4 – 0,2; $MgSO_4$ – 0,2; NaCl – 0,2; K_2SO_4 – 0,1; $CaCO_3$ – 5,0; агар-агар – 15, вода водопроводная – 1 л.
4. Суточная культура азотобактера.
5. Этиловый спирт.

Оборудование

1. Чашки Петри стерильные.
2. Стерильные пластинки целлофана.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

3. Металлические шпатели.
4. Дозатор на 100-200 мкл.
5. Стерильные наконечники.
6. Термостат (*t*= 28-30°С).
7. Пинцеты.
8. Линейки.
9. Стеклянный стаканчик на 50 мл.
10. Спиртовка.

Работа 9. Изучение влияния токсикантов на почвенные микроорганизмы

Материалы исследования и реактивы

1. Почва.
2. Сырая нефть или нефтепродукты (дизельное топливо, моторное масло и др.).
3. Стерильная водопроводная вода (100 мл в колбе).
4. Стерильный физиологический раствор (пробирки по 9 мл).
5. Среда Виноградского, состав (г/л): $(NH_4)_2SO_4$ – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5; NaCl – 0,5; агар – 20,0; вода водопроводная – 1 л; pH 7,0-7,2.
6. Этиловый спирт.
7. МПБ (пробирки по 5 мл).
8. Полоски лакмусовой бумаги (стерильные).
9. Полоски фильтровальной бумаги, пропитанной насыщенным раствором уксуснокислого свинца (стерильные).

Оборудование

1. Чашки Петри.
2. Термостат (*t*= 24-28°С).
3. Пинцеты.
4. Колбы на 250 мл.
5. Установка для выращивания микроорганизмов.
6. Дозаторы на 100-200 мкл, 1000 мкл.
5. Стерильные наконечники к дозаторам.
6. Шпатель стеклянный или металлический.
7. Кружки стерильной фильтровальной бумаги.
8. Стеклянный стаканчик на 50 мл.
9. Спиртовка.
10 Пробирки стерильные с ватно-марлевыми пробками.
11. Таблица Мак-Креди.

Работа 10. Изучение влияния токсикантов на биохимическую активность почв

Материалы исследования и реактивы

1. Почва.
2. Сырая нефть или нефтепродукты (дизельное топливо, моторное масло и др.).
3. H_2O_2, 2 %-ный раствор.
4. H_2SO_4, 10 %-ный раствор.
5. $KMnO_4$, 0,1 н. раствор.
6. 2,3,5 – ТТХ, 0,55%-ный раствор.
7. Основной раствор трифенилформазана (формазан: 2,3,5-ТФФ): 2,3,5-ТТХ растворяют в 5 мл дистиллированной воды. 1,26 г гидросульфата натрия ($NaHSO_3$) растворяют в 5 мл дистиллированной воды. Растворы сливают, после выпадения темно-красного осадка смесь фильтруют через стеклянный пористый фильтр и осадок промывают на фильтре ди-

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

стиллированной водой до отсутствия реакции на хлориды (с 0,5%-ным раствором $AgNO_3$). Осадок (2,3,5-трифенилформазан) высушивают в сушильном шкафу.
8. Ацетон.

Оборудование
1. Колбы на 50, 100 мл.
2. Кювета с тающим льдом.
3. Сушильный шкаф (t =160-170^{o}C).
4. Бюретки для титрования на 50 мл.
5. Пробирки градуированные.
6. Термостат (t =30°C).
7. Водяная баня.
8. Стеклянные пипетки.
9. Миллиметровая бумага.
10. ФЭК.
11. Стеклянные кюветы.

Работа. 11. Использование дождевых червей для оценки токсичности загрязненной почвы

Материалы исследования и реактивы

1. Почва.
2. Сырая нефть или нефтепродукты (дизельное топливо, моторное масло и др.).
3. Взрослые дождевые черви.

Оборудование
1. Емкости пластиковые с крышками для культивирования дождевых червей.

Работа 12. Биоиндикация токсичности природных вод с помощью дафний

Материалы исследования и реактивы

1. Исследуемая вода из водоема, 1 л.
2. Чистая вода.
3. Дафнии (60 особей).

Оборудование
1. Емкости для биотестирования стеклянные.
2. Стеклянные воронки.
3. Фильтры бумажные.
4. Сачок.
5. Стеклянные трубки диаметром 5-7 мм.

Работа 13. Биотестирование воды с использованием ампулярий

Материалы исследования и реактивы

1. 20-30 улиток ампулярий.
2. Корм для улиток.
3. Исследуемая вода из водоема, 1 л.

Оборудование
1. Аквариум с чистой водой.
2. Емкость для загрязненной воды.
3. Кюветы.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

4. Пластилин.
5. Сачок.
6. Секундомер.
7. Термометр.
8. Нагревательный прибор.

Работа 14. Исследование качества воды водоемов методом автографии на фотобумаге

Материалы исследования и реактивы

1. Образцы почвы, ила.
2. Исследуемая вода из водоема.
3. Дистиллированная вода.
4. Гипосульфит, 25 %-ный раствор.

Оборудование

1. Химические стаканы, емкостью 1 л.
2. Фотобумага (глянцевая).
3. Ножницы.
4. Линейки металлические.

Работа 15. Индикация загрязнения окружающей среды по качеству пыльцы

Материалы исследования и реактивы

1. Растения томатов.
2. Нитрозоэтилмочевина.
3. Слабый раствор йода.

Оборудование

1. Препаровальные иглы.
2. Предметные и покровные стекла.
3. Пипетки.
4. Микроскоп.

Работа 16. Исследование растений на присутствие токсикантов

Материалы исследования и реактивы

1. Исследуемые растения.
2. HCl, 25 %-ный раствор.
3. $BaCl_2$, 10 %-ный раствор.
4. KSCN, 10 %-ный раствор.
5. HNO_3.
6. NH_4.
7. Родизонат натрия, 0,2 %-ный раствор.
8. Буферный раствор: в 10 мл 0,19 г гидротартрата натрия и 0,15 г винной кислоты, pH 2,8.
9. Этиловый спирт:вода (1:1).
10. Сульфид натрия.

Оборудование

1. Штативы с пробирками.
2. Водяная баня.
3. Колбы мерные на 100 мл.
4. Фарфоровые ступки с пестиками.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

5. Ножницы.
6. Пипетки.
7. Спиртовки.
8. Фильтровальная бумага.

Работа. 17. Определение хлорофоса в кормах методом хроматографирования в тонком слое

Материалы исследования и реактивы

1. Исследуемые растения.
2. NaCl.
3. Хлороформ.
4. Na_2SO_4, безводн.
5. Подвижный растворитель *н*-гексан – ацетон (1:1).
6. Бензол.
7. 1% резорцин в 10 %-ном растворе КОН.
8. Стандартные растворы, содержащие 1 и 10 мкг (0,001 и 0,01 мг) исследуемого препарата.

Оборудование

1. Стеклянные стаканы на 250 мл.
2. Делительные воронки.
3. Стеклянные воронки.
4. Бумажные фильтры.
5. Водяная баня.
6. Хроматографическая бумага.
7. Хроматографическая камера.
8. Медицинский шприц.
9. Сушильный шкаф (t=100^{0}C).

Работа 18. Экспериментальное отравление лабораторных животных кадмием

Приборы и материалы исследования

1. Коммерческий раствор $Cd(NO_3)_2$ с концентрацией 1 г/л.
2. Физиологический раствор (0,9%-ный NaCl).
3. Раствор гепарина.
4. Дистиллированная вода.
5. Спектрофотометр.
6. Центрифуга (2000-3000 оборотов в минуту, 6000 оборотов в минуту).
7. Зонд для перорального введения токсического вещества.
8. Ножницы для декапитации, маленькие ножницы для размельчения ткани.
9. Кювета кварцевая с длиной оптического пути 1 см.
10. Секундомер.
11. Пипетки объемом 0,1 мл (4 шт.), 0,2 мл (1 шт.), 1 мл (4 шт.), 2 мл (2 шт.).
12 .Пробирки конические, центрифужные.
13. Навеска ткани животных (печень, мозг, почки, сердце).
14. Фарфоровые ступки с пестиком.
15. Водяная баня.
16. Пробки для конических пробирок.

Реактивы

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Определение общей активности глутатион-S-трансферазы.
1) 0,1 М калий-фосфатный буфер с pH 6,5: 13,6 г дигидрофосфата калия (KH_2PO_4) растворяют в 500 мл дистиллированной H_2O, 0,1М раствором гидроксида натрия (NaOH) доводят pH до 6,5, раствор разбавляют водой до 1л.
2) 2мМ раствор восстановленного глутатиона: 0,61 мг восстановленного глутатиона растворяют в 1 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера с pH 6,5, готовят в день исследования в необходимом объеме.
3) Абсолютный метанол.
4) 2мМ раствор 1-хлор-2,4-динитробензола: 10 мг 1-хлор-2,4-динитробензола растворяют в 1 мл абсолютного метанола, добавляют 23 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера (pH 6,5) готовят непосредственно перед определением.

Определение содержания восстановленного глутатиона.
1) 2 мМ раствор восстановленного глутатиона: см. выше.
2) 20 %-ный раствор сульфосалициловой кислоты.
3) 0,1 М трис-HCl буфер с pH 8,5, содержащий 0,01 %-ный ЭДТА: 12,1 г основного трис(гидроксиметил)-аминометана и 100 мг ЭДТА растворяют в 500 мл дистиллированной H_2O; 1 М раствором HCl доводят pH до 8,5 и водой доводят объем до 1 л.
4) Абсолютный метанол.
5) 0,4 %-ный метаноловый раствор 5,5'дитиобис(2нитробензойной кислоты): готовят непосредственно перед определением.

Определение малонового диальдегида.

1) 0,025 М трис – HCl буфер (pH 7,4) содержащий 0,175 М KCl: 3,03г основного трис(гидроксиметил)-аминометана и 13,03 г хлористого калия растворяют в 500 мл дистиллированной H_2O; 1 М раствором HCl доводят pH до 7,4 и водой доводят объем до 1 л.
2) 17 %-ный раствор ТХУ.
3) 0,8 %-ный водный раствор 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК).

Работа 19. Потенциометрическое определение значений pH и редокс-потенциалов модельных биологических сред (кровь, моча)

Реактивы

1. HCl.
2. NaOH.

Приборы и материалы исследования

1. Пробы биологической жидкости (моча, кровь).
2. pH-метр.
3. Стеклянные стаканы.
4. Дистиллированная вода.

Работа 20. Химико-токсикологический анализ таблеток, найденных на месте происшествия (на примере парацетамола)

Реактивы

1. HCl.
2. NaOH.
3. $K_2Cr_2O_7$.
4. эфир.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

5. этанол.
6. хлороформ.
7. ТСХ-система – хлороформ : этанол (99:1).
8. $FeCl_3$, 5 %-ный р-р.

Приборы и материалы исследования

1. Порошок парацетомола.
2. Мерные колбы на 50 и 100 мл.
3. Дистиллированная вода.
4. Спектрофотометр.
5. Кварцевые кюветы толщиной 10 мм.
6. Пластины для ТСХ.

Работа 21. Изучение механизмов действия антидотов различной химической природы

Реактивы

1. ЭДТА, 0,1 моль/л р-р.
2. NaOH, 1 ммоль/л р-р.
3. унитиол, 0,1 моль/л р-р.
4. $Pb(NO_3)_2$, 0,01 моль/л р-р.
5. $Cd(NO_3)_2$, 0,01 моль/л р-р.
6. $Zn(NO_3)_2$, 0,01 моль/л р-р.
7. $Cu(NO_3)_2$, 0,01 моль/л р-р.
8. метиленовый синий, $1{,}5\times10^{-3}$ %-ный р-р; $7{,}5\times10^{-3}$ %-ный р-р.

Приборы и материалы исследования

1. Стеклянные пробирки.
2. Цилиндры с притертой пробкой объемом 50 мл.
3. Дистиллированная вода.
4. Фотоэлектроколориметр.
5. Кюветы толщиной 10 мм.
6. Активированный уголь.
7. Полифепан.
8. Конические колбы на 100 мл.
9. Магнитные мешалки.
10. Секундомер.
11. Бумажные фильтры.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Содержание

ПРЕДИСЛОВИЕ……. 4

ТЕМА 1. АНТРОПОГЕННЫЕ ФАКТОРЫ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ. МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ТОКСИЧНЫХ ВЕЩЕСТВ...…… 5
Работа 1. Методы идентификации нитратов и нитритов …….. 5
Работа 2. Количественное определение нитритов и нитратов в природных водах…… 7
Работа 3. Обнаружение тяжелых металлов и других токсических неорганических соединений…….. 9
Работа 4. Обнаружение мочевины в объектах окружающей среды…….. 16
Работа 5. Токсичные органические вещества: характеристика и обнаружение их в окружающей среде…… 16
Работа 6. Определение концентрации неионогенных поверхностно-активных веществ (НПАВ) в модельных сточных водах……... 21
Контрольные вопросы и упражнения по теме 1……. 23

ТЕМА 2. БИОТЕСТИРОВАНИЕ И БИОИНДИКАЦИЯ ТОКСИКАНТОВ..... 24
Работа 7. Определение фитотоксичности углеводородзагрязненных почв с помощью фитотеста на проростках растений …….. 24
Работа 8. Определение фитотоксичности нефтезагрязненных почв по азотобактеру (метод Красильникова)…….. 26
Работа 9. Изучение влияния токсикантов на почвенные микроорганизмы……..... 27
Работа 10. Изучение влияния токсикантов на биохимическую активность почв… 29
Работа 11. Использование дождевых червей для оценки токсичности загрязненной почвы……... 31
Работа 12. Биоиндикация токсичности природных вод с помощью дафний……... 32
Работа 13. Биотестирование воды с использованием ампулярий…..... 33
Работа 14. Исследование качества воды водоемов методом автографии на фотобумаге……. 34
Работа 15. Индикация загрязнения окружающей среды по качеству пыльцы…… 36
Контрольные вопросы и упражнения по теме 2……. 36

ТЕМА 3. БИОАККУМУЛЯЦИЯ ТОКСИКАНТОВ. МЕХАНИЗМЫ ИХ ДЕТОКСИКАЦИИ У ЖИВОТНЫХ И РАСТЕНИЙ ……..... 37
Работа 16. Исследование растений на присутствие токсикантов…..…… 37
Работа 17. Определение хлорофоса в кормах методом хроматографирования в тонком слое…… 38
Работа 18. Изучение воздействия кадмия на лабораторных животных……..…….. 40
Контрольные вопросы и упражнения по теме 3……. 43

ТЕМА 4. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА И ДЕТОКСИКАЦИОННОЙ ТЕРАПИИ……. 44

Работа 19. Потенциометрическое определение значений pH и редокс-потенциалов модельных биологических сред (кровь, моча)…… 44
Работа 20. Химико-токсикологический анализ таблеток, найденных на месте происшествия (на примере парацетамола)…… 46
Работа 21. Изучение механизмов действия антидотов различной химической природы……. 48
Контрольные вопросы и упражнения по теме 4……. 52

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Рекомендуемая литература……... 53

ПРИЛОЖЕНИЯ…….. 54
Приложение 1. Правила работы в химической лаборатории…… 54
Приложение 2. Правила работы на фотоэлектроколориметре…….. 55
Приложение 3. Реактивы и оборудование……... 59
Содержание……. 69

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО