

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СТАВРОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра химии и защиты растений

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ

Методические указания
по выполнению лабораторных работ
для студентов всех форм обучения

направление 05.03.06 Экология и природопользование

Ставрополь
2019

1. Общие положения.

Целями освоения дисциплины «Экологическая токсикология» являются изучение основных токсикантов в окружающей среде; способов снижения загрязненности окружающей среды токсикантами, принципов экологического нормирования; овладение методами обработки, анализа и синтеза полевой и лабораторной токсикологической информации и использование теоретических знаний в практике; способность к использованию теоретических знаний в практической деятельности.

Данный курс будет способствовать формированию у студентов экологического мировоззрения и воспитанию способности оценки своей профессиональной деятельности с точки зрения охраны природы и здоровья человечества.

Процесс изучения дисциплины направлен на формирование следующих компетенций ОП ВО и овладение следующими результатами обучения по дисциплине:

Код компетенции	Содержание компетенции	Перечень планируемых результатов обучения по дисциплине
ОК-9	способностью использовать приемы оказания первой помощи, методы защиты в условиях чрезвычайных ситуаций	Знать: классы опасности токсикантов и их возможное воздействие на живые организмы
		Уметь: использовать приемы оказания первой помощи
		Владеть: приемами оказания первой помощи
ПК-11	способностью проводить мероприятия и мониторинг по защите окружающей среды от вредных воздействий; осуществлять производственный экологический контроль	Знать: перечень мероприятий по защите окружающей среды от воздействия токсикантов
		Уметь: проводить мониторинг воздействия токсикантов на ОС и проводить мероприятия по профилактике и защите окружающей среды от загрязнения токсикантами
		Владеть: основными методиками определения токсикантов в природных средах

3. Место дисциплины в структуре образовательной программы

Дисциплина Б1.В.ДВ.06.01 «Экологическая токсикология» является дисциплиной вариативной части (дисциплина по выбору).

Изучение дисциплины осуществляется:

- для студентов очной формы обучения в 4 семестре.

Для освоения дисциплины «Экологическая токсикология» студенты используют знания, умения и навыки, сформированные в процессе изучения дисциплин школьной программы и 1-3 семестров:

Химия

Биология

Общая экология

Освоение дисциплины «Экологическая токсикология» является необходимой основой для последующего изучения следующих дисциплин:

Безопасность жизнедеятельности
Экологический мониторинг
Нормирование и снижение загрязнения окружающей среды
Техногенные системы и экологический риск
Методы исследований в агрохимии
Мониторинг почвенного плодородия
Техногенные системы и экологический риск
Практика по получению первичных профессиональных умений и навыков, в том числе первичных умений и навыков научно-исследовательской деятельности
Подготовка и сдача государственного экзамена
Радиоэкология

2. Порядок проведения лабораторных работ

Лабораторные (исследовательские) работы помогут студентам систематизировать знания по учебной дисциплине «Экологическая токсикология», освоить методы анализа, научиться самостоятельно прорабатывать научную и учебную литературу.

Перед занятием рекомендуется ознакомиться с изучаемой темой по источникам, которые указаны в Рабочей программе курса, изучить тему лекции, соответствующей данной лабораторной работе. Если в процессе подготовки у студента появляются вопросы, студент может задать их лектору или преподавателю, ведущему лабораторные занятия в консультационные часы или в начале занятия.

Освоение материала и выполнение заданий вынесенных на самостоятельное изучение перед лабораторным занятием является обязательным требованием.

Лабораторная работа выполняется в соответствии с методическими указаниями в присутствии преподавателя. В рабочую тетрадь записываются основные пункты выполнения работы, расчеты, вносятся рисунки (если таковые требуются), результаты и выводы.

В завершении работы преподаватель делает вывод о правильности выполнения работы и оценивает ее соответственно ФОС.

3. Содержание лабораторных работ

Лабораторная работа 1. Техника безопасности при работе с токсикантами в лабораторных условиях. Классификация основных разделов токсикологии.

Цель занятия: рассмотреть технику безопасности при работе в лаборатории, изучить правила работы с пестицидами в лабораторных условиях.

I. ОБЩИЕ ПРАВИЛА РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ

1. Во время работы в лаборатории необходимо соблюдать чистоту, тишину, порядок и правила техники безопасности. Беспорядочность, поспешность или неряшливость часто приводят к несчастным случаям с тяжелыми последствиями, поэтому запрещается посторонним лицам посещать студентов, работающих в лаборатории, и отвлекать их.

2. Запрещается пить в лаборатории воду, принимать пищу, курить.

3. Экономьте газ, воду, электричество. По окончании пользования газом, водой и электричеством необходимо закрыть краны и выключить электроприборы.

4. При неисправности электрической проводки, газо- или водопроводной сети, лабораторной аппаратуры, приборов, немедленно сообщите лаборанту или преподавателю о замеченной неисправности.

5. Не следует превышать установленных норм расхода реактивов, оставлять без надобности горящими газовые горелки или включенными электрические приборы. Не бросайте в раковины бумагу, песок и другие твердые вещества. Бережно и аккуратно обращайтесь с посудой и оборудованием.

6. Приступайте к каждой работе только с разрешения преподавателя. Запрещается производить в лаборатории какие-либо работы, не связанные непосредственно с выполнением темы лабораторной работы.

7. Перед проведением каждой работы следует тщательно осмотреть аппаратуру и посуду, убедиться в правильности установки прибора и в соответствии взятых реактивов с указанием в описании работы. Категорически запрещается оставлять действующие приборы без наблюдения. Не приступайте к работе до полного уяснения техники её выполнения.

8. Во время нагревания жидкости в пробирках (или колбах) не направляйте отверстие пробирки (или колбы) на себя или на соседа; не заглядывайте в пробирки или колбы сверху, так как в случае возможного выброса из пробирки нагретого вещества могут быть несчастные случаи.

9. Тонкостенную химическую посуду нагревайте не на открытом огне, а на асбестовой сетке.

10. Категорически запрещается работать в лаборатории одному в отсутствие лаборанта или преподавателя.

11. Уходя из лаборатории, необходимо выключить газ, воду и электричество.

II. ПРАВИЛА РАБОТЫ С ПЕСТИЦИДАМИ.

1. Работать с пестицидами разрешается только в спецодежде (в халатах).

2. Все работы с пестицидами проводятся только в вытяжных шкафах с включенной вентиляционной тягой и полузакрытыми шторами.

3. Вынос пестицидов и их растворов из вытяжных шкафов запрещается.

4. Не разрешается нахождение в вытяжных шкафах посторонних предметов (книг, тетрадей, ручек и т.д.). Записи в рабочих тетрадях проводить только на письменных столах.

Прежде чем приступить к анализам, необходимо:

а) ознакомиться и усвоить методику предстоящих анализов;

б) подготовить рабочее место: поставить ближе к месту работы все необходимые препараты, реактивы, дистиллированную воду, химическую посуду и другой подсобный материал (штативы с пробирками, колбы, цилиндры, пипетки, шпатели, зажимы т.д.);

5. Для качественных анализов следует брать очень небольшие количества пестицидов. Порошкообразные препараты переносить в пробирки стеклянными шпателями, жидкие - пипетками с помощью груши (причем для каждого препарата должен быть индивидуальный шпатель или пипетка). После взятия пробы склянки с пестицидами должны быть немедленно и тщательно закрыты.

6. Взвешивать пестициды разрешается только в заранее приготовленной посуде. Нельзя снимать излишки или досыпать недостающее количество пальцами. При взвешивании жидких веществ нельзя пользоваться открытой посудой.

7. Не допускать попадания пестицидов на чашки весов и столы, случайно рассыпанные или разлитые препараты необходимо обезвредить и удалить.

8. Большие количества пестицидов взвешивают только под тягой.

9. Приливание растворителей и реактивов производят с помощью капельницы или пипеток. Перемешивать растворы пестицидов можно только или легким постукиванием по стенкам химической посуды, или стеклянной палочкой.

10. Не закрывайте отверстие пробирок при встряхивании пальцами!

11. Нагревать пестициды необходимо на водяной бане, а кипячение проводить в тиглях на асбестовой сетке.

12. Запрещается нагревать и кипятить растворы ядохимикатов на открытом пламени горелки.

13. При экстрагировании пестицидов из растительных субстратов и почвы эфиром, ацетоном и др. легковоспламеняющимися веществами следить, чтобы близко не было огня или включенных электроприборов.

14. Определить специфичность запаха химикатов можно лишь осторожно, направляя к себе пары движением руки, не вдыхая при этом полной грудью и не наклоняясь над препаратом.

15. После окончания анализов использованную посуду ополоснуть водой, реактивы поставить на полочки, выключить газ и воду.

16. После окончания работы необходимо снять халат, обязательно вымыть руки с мылом.

III. КЛАССИФИКАЦИЯ ОСНОВНЫХ РАЗДЕЛОВ ТОКСИКОЛОГИИ

В настоящее время в токсикологии определяются три основных направления; теоретическое (экспериментальное), профилактическое (гигиеническое) и клиническое.

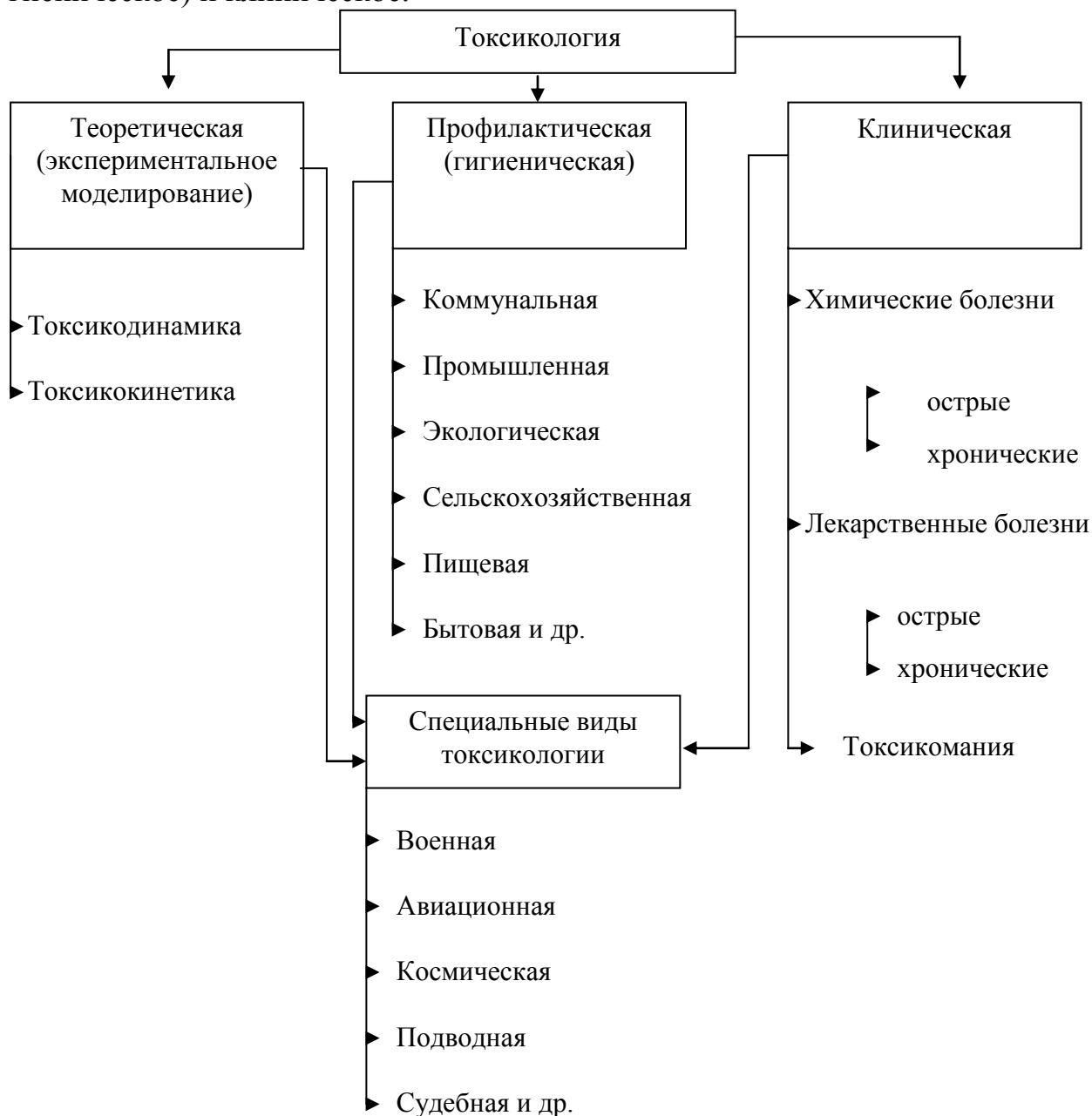


Схема 1. Основные разделы токсикологии.

Теоретическая токсикология решает проблемы выявления основных законов взаимодействия организмов и ядов. Она включает два основных раздела:

1) **токсикодинамику**, раздел токсикологии, рассматривающий действие яда на организм;

2) **токсикокинетику**, раздел токсикологии, изучающий ответную реакцию организма на яд.

Профилактическая токсикология изучает проблемы определения степени опасности и разработку мер и способов предотвращения и защиты от токсического воздействия химических веществ в окружающей человека среде. Поэтому она имеет экологический характер и включает следующие основные разделы: промышленный, сельскохозяйственный, экологический, коммунальный, пищевой, бытовой и др.

Клиническая токсикология исследует заболевания химической этиологии, т.е. болезни человека, возникающие вследствие токсического влияния химических соединений окружающей его среды.

Кроме того, выделяются специальные виды токсикологии, которые изучают отравление людей в любых условиях или обстоятельствах при воздействии определенного типа токсических веществ. Это военная, авиационная, космическая, судебная и прочие виды токсикологии, которые обычно включают в себя элементы всех основных направлений – теоретического, гигиенического и клинического.

Для будущих инженеров, специалистов в области охраны окружающей среды и сельского хозяйства наибольший интерес представляют промышленная, экологическая и сельскохозяйственная токсикологии, задачами которой являются:

- гигиеническое нормирование содержания вредных веществ в объектах производственной среды и биосредах;
- гигиеническая экспертиза токсичных веществ;
- гигиеническая стандартизация сырья и продуктов.

Гигиеническое нормирование ограничивает содержание вредных веществ путем установления **предельно допустимых концентраций** в воздухе рабочей зоны и на коже. Гигиеническая экспертиза представляет собой наиболее массовый вид токсикологической оценки вредных веществ, предусматривающий определение смертельных доз и концентраций при различных путях введения, адекватным путям поступления ядов в производственных условиях. Гигиеническая стандартизация сырья и продуктов предполагает ограниченное содержание токсичных примесей в промышленном сырье и готовых продуктах с учетом их вредности и опасности.

Лабораторная работа 2. Методы определения токсичности вредных веществ (на примере пестицидов)

Цель занятия: знать основные методы определения токсичности вредных веществ (на примере пестицидов), научиться выбирать тест-

объекты, способы введения и дозировку вредных веществ, научиться проводить учет действия вредных веществ на тест-объект.

Определение степени токсичности пестицидов для различных объектов проводят при первичных оценках биологической активности новых химических соединений, при установлении избирательности их действия, при изучении действия препаратов на теплокровных животных и человека, для сравнения эффективности различных препаративных форм пестицидов и разных способов их применения.

1. ТЕСТ-ОБЪЕКТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ ПЕСТИЦИДОВ.

Выбор тест-объектов определяется биологической активностью пестицидов. При испытании инсектицидов в качестве тест-объектов наиболее часто используют насекомых, которые в меньшей степени зависят в своем развитии от сезонности, или способны давать в течение года много поколений. К ним относятся жуки (долгоносики, мучные хрущаки, колорадский жук), тли, мухи, растительноядные клещи, мелкие ракообразные (дафнии, креветки).

При изучении фунгицидной активности тест-объектами служат грибы - возбудители различных болезней. Их выращивают на агаровых средах или инокулируют суспензией спор поверхность почвы в чашках Петри (*Botrytis cinerea*); инфицируют суспензией спор (*Fusarium* sp.) зерновки, которые раскладывают на агаровую среду и инкубируют в термостатах; конидиями *Erysiphe polyphaga* заражают огурец в фазе двух семядольных листьев, суспензиями спор *Prytophthora infestans* - растения томата высотой 10-15 см, конидиями *Erysiphe graminis* - растения ячменя в фазе развитого первого листа. Действие фунгицидов определяют по степени уменьшения зоны роста на агаровой среде (почве) или по степени поражения растений.

При определении гербицидной токсичности в качестве биотестов используют семена и проростки различных культур, чаще всего зерновых культур, подсолнечника, свеклы, люпина посевного, горчицы белой, сорных растений (щирица, куриное просо, марь белая и др.), выращиваемых в лабораторных условиях. В процессе наблюдений учитывают накопление сухой массы, высоту растений, формативные изменения.

2. СПОСОБЫ ВВЕДЕНИЯ, ДОЗИРОВАНИЯ ПЕСТИЦИДОВ И УЧЕТА ИХ ДЕЙСТВИЯ НА ТЕСТ-ОБЪЕКТ.

2.1. Способы введения пестицидов в тест-объект.

Выбор способа введения препаратов в организм и их дозирование зависят от целей работы, свойств пестицидов, особенностей тест-объекта и биологической среды. Пестициды наносят непосредственно на тест-объект, дают с пищей или вносят в среду его обитания.

Для нанесения жидких препаратов используют специальные лабораторные опрыскиватели, с помощью которых обрабатывают биообъекты или чашки Петри, предназначенные для насекомых.

Особое внимание обращают на качество, равномерность опрыскивания (с этой целью во многих конструкциях лабораторных опрыскивателей предусмотрены вращающиеся столики), а также на нормы расхода жидкости. Подвижных насекомых перед опрыскиванием анестезируют серным эфиром или CO_2 и только после этого помещают в чашки Петри и опрыскивают.

2.2. Способы дозирования пестицидов. Существует несколько способов дозирования.

1) Введение пестицида в среду культивирования растений, микроорганизмов или насекомых. При этом необходимо небольшое количество препарата равномерно распределить в среде (песке, почве, агар-агаре и др.) Сначала готовят раствор препарата, известное количество которого вносят в среду и тщательно распределяют его многократным перемешиванием или переливанием, если среда жидкая.

2) Растворение пестицида в органических растворителях (ацетон, ксилол, спирт). Растворы пестицида в органических растворителях вносят в сосуды, распределяя их пипеткой по дну сосуда так, чтобы после испарения растворителя получался равномерный слой осадка инсектицида. Насекомых помещают в чашки только после полного испарения растворителя.

3) Растворы инсектицидов наносят на поверхность тела насекомых микропипетками или прикосновением к насекомому петлей (диаметром 0,4 - 0,8 мм, сделанной из платиновой проволоки сечением 0,5-0,6 мм) с набранной каплей раствора. (Чтобы определить массу одной капли, в предварительно и взвешенный бюкс наносят петлей 20 - 30 капель и снова взвешивают его. По разности масс определяют массу взятых капель и рассчитывают массу одной капли.) Важно, чтобы пестицид наносили на одну и ту же часть тела насекомого (грудь, спинку или брюшко).

4) При изучении кишечного действия инсектицидов пестицид вводят в желудок, чтобы насекомое не контактировало с ним. Например, для листогрызущих насекомых готовят специальные приманки «сэндвичи». Листовые диски, вырезанные с помощью пробочника, помещают под колпак опрыскивателя. Рассчитывают количество инсектицида, нанесенного на единицу площади и на диск. Сверху диск покрывают точно таким же диском, но не обработанным препаратом, а равномерно смазанным тонким слоем крахмального клейстера. Диски закрепляют на пробке с помощью тонкой булавки.

Приманку скармливают одному насекомому или группе. Остаток приманки учитывают, измеряя его площадь по миллиметровой бумаге - это необходимо для того, чтобы точно рассчитать количество инсектицида, съеденного насекомыми.

Действие фумигантов испытывают под специальным колпаком, оценивая их токсичность по гибели насекомых с учетом времени экспозиции объектов в отравленной атмосфере. Дозируют фумиганты по массе или объему.

При изучении системного действия инсектицидов насекомых подсаживают на не обработанный пестицидом лист, а препарат наносят на другой лист или в зону корней.

Для получения количественных показателей токсичности пестицидов, и в частности СД₅₀, необходимо воздействовать на объект разными дозами, и лучше неслучайно взятыми, а отличающимися друг от друга на один на тот же процент. Дозы пестицида, вызывающие у биотеста эффект больше 1 и меньше 100%, называют эффективными дозами.

3. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ПРИОБРЕТЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ПЕСТИЦИДАМ У ВРЕДНЫХ ОРГАНИЗМОВ

Приобретенная устойчивость к пестицидам - резистентность развивается в популяциях вредных организмов при систематических обработках ряда поколений одним и тем же препаратом или препаратами, близкими по механизму действия.

Резистентность возникает в результате уничтожения чувствительных к применяемому пестициду особей популяций и отбора наиболее устойчивых.

3.1. Определение устойчивости паутинного клеща к инсектоакарицидам. Обыкновенный паутинный клещ относится к самым опасным многоядным вредителям сельскохозяйственных культур. Высокий потенциал размножения и быстрая смена поколений позволяют этому виду легко развивать резистентность к различным пестицидам. Выявлены популяции, устойчивые одновременно к 8- 12 препаратам.

Сбор и содержание биоматериала. Растения с клещами срезают и доставляют в лабораторию в капроновых, бумажных, бязевых пакетах, снабженных этикетками с указанием даты и места сбора. Заселенные листья можно непосредственно использовать в опыте. Для корма клещей в лабораторных условиях выращивают кормовые растения (например, фасоль). Можно также использовать незаселенные листья или части растений полевой культуры. Оптимальные для содержания клещей условия: температура 24-27 °С, относительная влажность 70—90% и длительность светового дня 18 ч. В этих условиях развитие одного поколения клеща длится 8-10 дней, что позволяет быстро размножить даже небольшие пробы биоматериала.

Определение уровня устойчивости взрослых клещей. Чистые растения за сутки до опыта заселяют клещами, прикалывая на них кусочки ли-

стве с большим количеством самок. Попавших на растение личинок, нимф и самцов клещей в учет результатов опыта не включают.

При постановке опытов непосредственно на полевых станках половозрелых самок клеща пересаживают на свежие, чистые верхушки или листья растений с помощью мягкой кисточки за 2 ч до обработки.

Заселенные самками клеща растения или листья погружают по одному на 3 сек. в раствор изучаемого препарата. Для начального выявления устойчивых особей в популяции готовят диагностическую концентрацию препарата, опыт ставят в 4-5 повторностях.

При определении уровня устойчивости препарат разводят в 4-5 концентрациях с таким расчетом, чтобы могла быть зарегистрирована гибель от 10 до 95 % клещей.

Для каждой концентрации берут 4-5 повторностей; в каждой повторности для получения надежных результатов следует иметь не менее 100 самок клеща. Контролем служат 2-3 зараженных растения, которые погружают в воду на 3 сек.

Обработанные растения ставят по одному в стакан с водой, подставляя под черешки кружки из плотной бумаги, обмазанные по краям вазелином. Учет гибели подвижных клещей проводят через 24 ч после обработки. Листья срезают и под биноклем или с помощью лупы (8-10-кратное увеличение) подсчитывают живых и мертвых клещей. Клещей, упавших на бумажный кружок, также учитывают. Затем вычисляют процент гибели по концентрациям с учетом смертности в контроле. Полученные цифры используют для вычисления $СК_{50}$.

4. МЕТОДЫ ПЕРВИЧНЫХ ИСПЫТАНИЙ ИНСЕКТИЦИДНОЙ И АКАРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ.

При первичных испытаниях веществ на инсектицидную токсичность в качестве тест-объектов используют насекомых из различных систематических групп. Испытываемые препараты наносят на поверхность тела (контактная токсичность), скармливают с пищей (кишечная токсичность), вводят через органы дыхания (фумигационная токсичность) или в ткани растений, соком которых питаются насекомые (системная токсичность). Рекомендуемые концентрации (д. в.) испытываемых фосфорорганических веществ для мух - 0,15 %, жуков - 0,1, клещей - 0,06%, тлей - 0,015 % (системно - 0,15%). Эталон берут в концентрациях в 10 раз меньших, чем исследуемый препарат.

4.1. Испытание контактной токсичности путем непосредственной обработки насекомых. Препарат в виде раствора суспензии, эмульсии наносят на насекомых с помощью специальных лабораторных опрыскивателей. Необходимо обеспечить равномерную обработку, недопуская слияния капель и отрицательного влияния растворителя на тест-объект (количество жидкости составляет 0,05 - 0,1 мл на 100 см² обрабатываемой

площади). При высокой подвижности насекомых их рекомендуется предварительно анестезировать.

Тест-объект: комнатные мухи и рисовые долгоносики.

Эталон: карбофос (каратэ и др.).

Выполнение работы: комнатных мух или долгоносиков анестезируют диоксидом углерода или серным эфиром. Раскладывают на диски из фильтровальной бумаги или стеклянные стаканчики, диаметром 5-6 см, высотой 7 см, по 20 особей на каждый и помещают в устройство для опрыскивания. Жуков рисового долгоносика по 20-25 шт. помещают в стаканчики диаметром 3 см и высотой 3-4 см. При опрыскивании комнатных мух и рисовых долгоносиков используют одинаковые концентрации: 0,15% для фосфорорганических и 0,5% для остальных групп соединений. Стаканчики с насекомыми закрывают тканью или специальными сетками. Учет гибели насекомых ведут через 24 часа, а жуков через 48 часов.

Оценка результатов. Подсчитывают число погибших насекомых, вычисляют процент смертности. Оценку токсичности препаратов дают по пятибалльной системе.

4.2 Испытание контактной токсичности новых веществ путем нанесения их на поверхность сосудов. Обработкой поверхностей, на которые затем помещают насекомых, достигается более равномерное распределение пестицида, но уменьшается вероятность контакта насекомых с веществом, поэтому нормы расхода жидкости при опрыскивании приходится увеличивать до 0,5 мл на 100 см² обрабатываемой площади. Промежутки между нанесением препаратов на поверхность сосудов и контактом с ними насекомых должны быть по возможности минимальными.

Тест-объект: черная свекловичная тля.

Эталон: Би-58 новый.

Выполнение работы. Стеклянные стаканчики диаметром 3 см и высотой 4-5 см опрыскивают под колпаком лабораторного опрыскивателя, расходуя по 25 мл спиртовых или ацетоново-водных растворов исследуемых веществ в концентрации 0,01%. После подсыхания жидкости в стаканчики подсаживают по 30 самок тлей лабораторной популяции. Эффект действия препаратов определяют через 24 часа путем учета погибших особей.

4.3. Испытание контактной токсичности новых веществ путем обработки высечек из листьев растений с посаженными на них тест-объектами. Высечки листьев помещают в чашки Петри на фильтровальную бумагу, переносят на них клещей и после опрыскивания раствором определенной концентрации учитывают их гибель.

Тест-объект: обыкновенный паутинный клещ.

Эталон: карбофос (акарин и др.)

Выполнение работы. Выращивают фасоль обыкновенную на любых питательных средах. В отдельном боксе на растениях фасоли разводят паутинного клеща.

С незараженных растений берут высечки диаметром 2,5 см и помещают их по 2—3 на фильтровальную бумагу в чашки Петри. Тонкой кисточкой собирают клещей и по 20 особей переносят на высечки растений. Затем чашки с высечками и клещами опрыскивают фосфорорганическими соединениями в концентрации 0,06 % д. в. Эталон используют в концентрации в 10 раз меньшей, чем испытываемые препараты. Опрыскивание проводят до полного смачивания высечек.

Гибель клещей учитывают через двое суток с помощью лупы, дающей семикратное увеличение.

5. ИСПЫТАНИЕ ВЕЩЕСТВ НА ФУНГИЦИДНУЮ АКТИВНОСТЬ СПОСОБОМ ОПРЫСКИВАНИЯ РАСТЕНИЙ

5.1 Испытание веществ на фунгицидную активность способом опрыскивания растений.

I. Тест-объект: *Erysiphe polyphaga*, растение - огурец.

Эталон: топсин-М (топаз и др.).

Выполнение работы. Выращенные в теплицах в небольших сосудах растений огурца в фазе двух семядольных листьев опрыскивают рабочим составом (500 мг д.в. в 1 мл) из расчета 5 мл на сосуд. После высыхания растения заражают колониями гриба, стряхивая конидия с сильно зараженных листьев. После этого растения инкубируют в тепличной камере в течение 7 дней.

II. Тест-объект: *Erysiphe graminis*, растение - ячмень.

Эталон: Колоссаль (титул, фалькон и др.).

Выполнение работы. Растения ячменя, выращенные до образования первого развитого листа, опрыскивают рабочим составом испытываемого препарата (500 мг д. в. в 1 мл) из расчета 5 мл на 1 сосуд. После высыхания растения заражают путем стряхивания конидий с сильно пораженных листьев. Растения инкубируют в тепличной камере при 18-20 °С в течение 6 дней.

5.2 Испытание веществ на фунгицидную системную активность способом полива растений.

Растения, тест-объекты и эталоны - те же, что и в работе по испытанию веществ на фунгицидную активность способом опрыскивания растений (см. раздел 5.1).

Выполнение работы отличается лишь тем, что растения не опрыскивают рабочими составами, а дважды (с интервалом в 1 сутки) поливают их из расчета 20 мл на 1 сосуд.

Оценка результатов. При первичном скрининге с системой растение-хозяин – патоген оценку поражения листьев проводят по следующей шкале:

Поражение площади листьев, %	Оценка, балл
0-5	4
5-25	3
25-50	2
50 и более	1

Оборудование и реактивы: боксы для работы с микроорганизмами; камеры для выращивания растений в теплицах; автоклав; чашки Петри; пробирки, мерные колбы на 100 и 250 мл; цилиндры на 10 и 100 мл, пипетки градуированные на 1,5 мл; пипетки на 10 и 20 мл; сосуды для выращивания растений; почва, просеянная через мелкое сито; линейки; фильтровальная бумага; семена ячменя, огурца, томата; агар-агар, испытываемые вещества, эталоны: карбофос (акарин и др.), би-58 новый, каратэ, топсин М (топаз и др.), колоссаль (титул, фалькон и др.).

Практическая часть занятия проводится в малых группах по 2-3 человека с обменом мнениями по окончании работы. Закрепление материала проводится по типу «каждый учит каждого».

Лабораторное занятие 3. Качественный анализ пестицидов

Цель занятия: научиться проводить качественный анализ пестицидов.

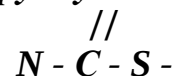
Качественный анализ используется для идентификации в исследуемом объекте, атомов, молекул, простых или сложных веществ. Задача качественного анализа сводится обычно к обнаружению катионов и анионов, присутствующих в анализируемой пробе. Качественный анализ необходим для обоснования выбора метода количественного анализа того или иного материала или способа разделения смеси веществ.

Качественный химический анализ используют в сельскохозяйственном производстве и при решении проблем защиты окружающей среды. В агрохимической службе он применяется для распознавания минеральных удобрений, а в контроле загрязненности окружающей среды – для обнаружения пестицидных остатков.

1. КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ВЕЩЕСТВ, СОДЕРЖАЩИХ СЕРУ И АЗОТ.

К пестицидам, в состав которых входят сера и азот, относятся: цинеб, поликарбацин (не используются), дитан-М-45, ТМТД, витавакс 200.

Идентификация, соединений, содержащих группу S



Производные дитиокарбаминовой кислоты при щелочном гидролизе разлагаются с образованием соответствующей кислоты, которая дает с ионами меди труднорастворимые соли характерного бурого цвета.

Выполнение реакции. Небольшое количество анализируемого вещества помещают в пробирку, добавляют 1-2 мл раствора едкого натра и кипятят в течение 2-3 мин. Содержимое пробирки охлаждают, фильтруют и делят на 2 части. Одну часть фильтрата нейтрализуют разбавленной серной кислотой и добавляют несколько капель уксуснокислого раствора хлорида меди и 3-5 капель хлороформа. В присутствии дитиокарбаматов слой хлороформа окрашивается в красно-бурый цвет. Положительную реакцию дают цинеб, поликарбацин, дитан-М-45, ТМТД.

Реактивы: 10%-ный водный раствор NaOH, кислота серная разбавленная, уксуснокислый хлорид меди (смесь в равных объемах 1 %-ного водного раствора хлорида меди и разбавленной в отношении 1:1 уксусной кислоты), хлороформ.

2. КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ВЕЩЕСТВ, СОДЕРЖАЩИХ ЦИНК.

Распознавание цинксодержащих веществ. Цинковые соли дитиокарбаминовых кислот можно легко идентифицировать с помощью цветных реакций.

Выполнение реакции. Оставшуюся часть фильтрата (реакция 1.1) анализируют следующим образом: на фильтровальную бумагу наносят несколько капель исследуемого раствора и несколько капель нитрата кобальта. Бумагу высушивают и сжигают в тигле. Зеленый цвет золы свидетельствует на наличие ионов Zn в растворе. Положительный результат дают цинеб, поликарбацин, дитан-М-45.

Распознавание цинеба и поликарбацина. Поскольку эти вещества очень близки по своим свойствам, для их распознавания используют физико-химические методы (инфракрасная и ультрафиолетовая спектрофотометрия), а также различную растворимость в слабых водных растворах щелочей.

Выполнение реакции. Проводят пробу на растворимость анализируемых веществ в слабом щелочном растворе, используя в качестве растворителя 1 - 3%-ный водный раствор едкого натра. В пробирку помещают пробу ($0,1 \pm 0,01$ г) исследуемого вещества и добавляют по порциям 3 мл растворителя комнатной температуры. При добавлении каждой порции пробирку встряхивают, при разогревании жидкости ее охлаждают до комнатной температуры.

Вещество, растворимое в щелочной среде, идентифицируют как поликарбацин.

Реактивы. 1-3% раствор NaOH.

3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЕЩЕСТВ, НЕ СОДЕРЖАЩИХ ЦИНК.

Обнаружение ТМТД. Тетраметилтиурамдисульфид в ацетоновом растворе, реагируя с солями меди, дает характерную салатовую окраску, быстро темнеющую на свету. Химизм данной реакции до конца не ясен. Однако с ее помощью можно легко распознать ТМТД.

Выполнение реакции. Небольшое количество вещества растворяют в пробирке в 1 - 2 мл ацетона. Затем по каплям добавляют водный раствор медного купороса. Появление интенсивного салатового цвета свидетельствует о наличии ТМТД в пробе.

Реактивы: ацетон, 5 %-ный водный раствор медного купороса.

4. КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ

Предварительная идентификация веществ, содержащих фосфор, проводится по продуктам их щелочного гидролиза.

Выполнение реакции. К небольшому количеству исследуемого вещества в пробирке добавляют 2 - 3 мл щелочи, перемешивают содержимое и кипятят в течение 1—2 мин. Затем раствор фильтруют и фильтрат используют для дальнейшего анализа.

Материалы и реактивы: 10 %-ный раствор едкого натра, пробирки, воронки, фильтровальная бумага, спиртовка.

Распознавание Парашюта 45 % МКС

В щелочной среде парашют гидролизуетсЯ до диметилтиофосфорной кислоты и пара-нитрофенола, последний обнаруживается по реакции с хлорным железом.

Пара-нитрофенол дает интенсивную сине-фиолетовую окраску с раствором FeCl_3 .

Выполнение реакции. В пробирку наливают 1—2 мл фильтрата после реакции гидролиза и добавляют несколько капель раствора FeCl_3 . При наличии в пробе метафоса появляется сине-фиолетовая окраска.

Реактивы: 1 %-ный водный раствор хлорного железа.

Лабораторная работа 4. Методы биоиндикации и биотестирования

Цель занятия: ознакомиться с понятиями биоиндикация, биотестирование. Рассмотреть основные методы биоиндикации и биотестирования.

Биоиндикация - способ оценки антропогенной нагрузки по реакции на нее живых организмов и их сообществ. Биологические методы оценки - это характеристика состояния экосистем по растительному и животному населению.

Биоиндикатор - группа особей одного вида или сообщества, по наличию или по состоянию которых, а также по их поведению судят о естественных и антропогенных изменениях в окружающей среде. Присутствие индикаторных видов растений или животных позволяет более глубоко судить о качестве биоценозов. Биоиндикация предусматривает выявление уже состоявшегося или происходящего загрязнения окружающей среды по функциональным характеристикам особей и экологическим характеристикам сообществ организмов. Постепенные же изменения видового состава биоценоза формируются в результате длительного отравления, и явными они становятся только в случае далеко идущих изменений. Таким образом, видовой состав живых организмов из загрязняемого биоценоза служит итоговой характеристикой токсикологических свойств среды за некоторый промежуток времени и не дает ее оценки на момент исследования.

1. БИОИНДИКАЦИЯ ВОДОЕМОВ

При сбросе в водоем токсических веществ, содержащихся в промышленных сточных водах, происходит угнетение и обеднение фитопланктона. При обогащении водоемов биогенными веществами, содержащимися, например, в бытовых стоках, значительно повышается продуктивность фитопланктона. При перегрузке водоемов биогенами возникает бурное развитие планктонных водорослей, окрашивающих воду в зеленый, сине-зеленый, золотистый, бурый или красный цвета ("цветение" воды). "Цветение" воды наступает при наличии благоприятных внешних условий для развития одного, редко двух-трех видов. При разложении избыточной биомассы, выделяется сероводород или другие токсичные вещества. Это может приводить к гибели зооценозов водоема и делает воду непригодной для питья. Многие планктонные водоросли в процессе жизнедеятельности нередко выделяют токсичные вещества. Увеличение в водоемах содержания биогенных веществ в результате хозяйственной деятельности человека, сопровождаемые чрезмерным развитием фитопланктона, называют антропогенным эвтрофированием (заболачиванием) водоемов.

К биологическим индикаторам относятся: водоросли (показатель заболачиваемости водоема), зоопланктон (показатель заболачиваемости, загрязнения), простейшие, зообентос (придонные животные) (индикаторы загрязнения донных отложений и придонного слоя воды), высшая водная растительность.

Биоиндикация токсичности природных вод с помощью дафний.

Работа проводится в малых группах по 2-3 человека.

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 ч.

Культура дафний. Исходный материал приобретается в специальных учреждениях и организациях.

Отбор пробы. Пробу природной (сточной) воды отбирают объемом до 1 л. До биотестирования возможно хранение ее не более 6 часов при температуре 4°C. Далее пробу фильтруют через фильтровальную бумагу и заливают в емкости для биотестирования.

Проведение опыта. 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. Исследуемую воду можно разбавить водой, не содержащей токсичных веществ.

Контрольную (разбавляющую) воду готовят отстаиванием в течение 7 суток водопроводной воды средней (не более 3,0 мг-экв./л) жесткости, проверяя pH (7,0-8,2), температуру (20°C), содержание кислорода (не менее 2 мг/л – при снижении делают продувку с помощью микрокомпрессора или от футбольного мяча). В процессе биотестирования продувку делать не рекомендуется.

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 или 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 с после его легкого покачивания.

Проведение подсчета. 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:

$$100 \times \frac{(X_1 - X_2)}{X_1}$$

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 ч. биотестирования в ней 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.

При определении пригодности биообъекта для тестирования, а также для показа в демонстрационном эксперименте используют токсичное вещество – дихромат калия ($K_2Cr_2O_7$). В разбавленных до 1-2,5 мг/л растворах гибель дафний должна приближаться к 50%. Разбавленный раствор дихромата калия получают, добавляя 1-2,5 мл маточного раствора (1 г $K_2Cr_2O_7$ в 1 л дистиллированной воды) к 1 л контрольной воды.

Материалы и реактивы: культура дафний, пробы природной, сточной воды, сосуды для воды на 100-200 мл, микрокомпрессор, фильтровальная бумага, рН-метр, дихромат калия ($K_2Cr_2O_7$).

2. МЕТОДЫ БИОТЕСТИРОВАНИЯ.

Биотестирование - использование в контролируемых условиях биологических объектов (тест-объектов) для выявления и оценки действия факторов (в том числе и токсических) окружающей среды на организм, его отдельную функцию или систему организмов.

Проведение биотестирования можно проводить на нескольких уровнях:

- на уровне клетки
- на уровне органов
- на уровне организма и популяции

Хорошие результаты дает анализ бентосных (придонных) беспозвоночных. Оценка чистоты водоемов делается по преобладанию, либо отсутствию тех или иных таксонов.

Таблица 4.1. Шкала загрязнений по индикаторным таксонам

Индикаторные таксоны	Эколого-биологическая полноценность, класс качества воды, использование
Личинки веснянок, плоские личинки поденок, ручейник - риактофилла	Очень чистая. Полноценная. Питьевое, рекреационное, рыбохозяйственное.
Крупные двусторчатые моллюски (перловица), плавающие и ползающие ручейник-нейреклизис, вилхвостки, водяной клоп	Чистая. Полноценная. Питьевое, рекреационное, рыбохозяйственное, орошение, техническое.
Моллюски-затворки, горошинки, роющие личинки поденок, ручейники при отсутствии реактофиллы и нейреклизис, личинки стрекоз плосконожки и красотки, мошки	Удовлетворительно чистая. Полноценная. Питьевое с очисткой, рекреационное рыбоводство, орошение техническое.

Шаровки, дрейсена, плоские пиявки, личинки стрекоз при отсутствии плосконожки и красотки, водяной ослик	Загрязненные. Неблагополучные. Ограниченное рыбоводство, ограниченное орошение
Масса трубочника, мотыля, червеобразные пиявки при отсутствии плоских, крыски, масса мокрецов	Грязные. Неблагополучные. Техническое.
Макробеспозвоночных нет	Очень грязные. Неблагополучные. Техническое с очисткой

Реакция на соли тяжелых металлов

Среди поллютантов агроценоза особое положение занимают соли тяжелых металлов. Специальные биотесты для определения эффективности общего действия поллютантов сводятся к оценке степени изменения морфометрических и биохимических показателей, оценке энергии прорастания, энергии роста корней, поражаемости растений под влиянием загрязнителя. Степень депрессии растений после обработки определяется физиологическими методами. Удачным тест-объектом являются различные виды рясок. В зависимости от концентрации металлов происходят видимые изменения в росте, окраске, рассоединении листочков. Шкала для определения изменений представлена в табл. 4.2.)

Таблица 4.2. Реакция ряски малой (*Lemna minor*) на соли тяжелых Металлов

Металл и его концентрации	Показатели по тестам			
	Специфическая окраска листочков	Рассоединение листочков	Козфф. роста	Реакция
Эталон	Интенсивно зеленая	нет	1,55	нет
Cu 0,1-0,25	белая	нет	нет	нет
0,025	белая	100%	нет	нет
0,001-0,0001	потеря окраски от периферии к центру	100%	нет	нет
Fe 0,1-0,25	белая	100%	нет	корни белые
0,025	--	--	--	--
0,001	светло-зеленая	нет	1,2	
0,0001	белая	нет	1,55	
Zn 0,1-0,25	обесцветились от периферии к центру	нет	нет	корни белые
0,025	--	нет	нет	нет
0,001	зеленая	нет	1,2	нет
0,0001	светло-зеленая	нет	1,1	нет
Ba 0,1-0,25	от белой до темно-желтой	100%	нет	нет
0,025	белая, но концы листочка зеленые	100%	нет	нет
0,001	белая, зеленая только	70%	нет	нет

	точка роста			
0,0001	зеленая	нет	1,4	нет
Со 0,1-0,025	белая, зеленые только жилки	100%	нет	нет
0,001	светло-зеленая	100%	нет	нет
0,0001	бледно-зеленая, местами белая	нет	нет	листецы подсохли

Первая часть занятия - ознакомление с методами биотестирования и видимыми эффектами проводится в виде презентации. Вторая часть занятия проводится в виде лабораторной работы. В конце занятия проводится блиц-опрос студентов.

Лабораторная работа 5. Оценка токсичности продуктов на инфузориях *Tetrahimena periformis*

Цель работы: познакомиться с веществами способными оказывать токсический эффект на организм человека; научиться исследовать продукты на токсичность методом биотестирования.

Химические соединения, загрязняющие внешнюю среду и продукты питания, способны оказывать на организм специфическое действие, проявляющееся не в период воздействия и не сразу после окончания, а в отдаленные периоды жизни индивидуумов.

Эксперименты на теплокровных животных по изучению отдаленных последствий действия химических веществ длятся несколько лет и требуют больших затрат.

В качестве тест-объекта для обнаружения токсичных веществ используются одноклеточные животные – инфузории *Tetrahimena periformis*. На этих организмах разработана ускоренная методика определения токсичных веществ.

Благодаря сочетанию в инфузориях признаков клетки и организма на них можно изучать как клеточные так и организменные реакции на токсическое воздействие.

Порядок работы: Не менее чем за 24 часа до исследований набрать воду в стеклянную колбу, прокипятить в течение 1 часа на водяной бане, закрыть стерильным тампоном и поставить отстаиваться, использовать верхний слой.

Взять навеску исследуемого продукта (5г), тщательно измельчить, поместить в коническую колбу и прилить 5 мл 1%-ного раствора ацетона, встряхивать в течение 15 минут с открытым горлышком. По истечении времени – фильтруют через складчатый фильтр.

В пенициллиновый флакон прилить 3 мл заранее прокипяченной воды и 0,5 мл среды с культурой *Tetrahimena periformis*. Использовать данный флакон как контрольный. Во второй флакон прилить 3 мл полученного фильтрата и 0,5 мл взвеси культуры инфузорий (опытный флакон). На

покрывное стекло нанести каплю из флакона с контролем и накрыть покрывным стеклом. Рассмотреть при малом увеличении. Подсчитать видимое количество инфузорий и рассмотреть их морфофункциональное состояние. Также поступить с опытным образцом.

Провести учет результатов, продельвая пункт 4 и 5, через 15, 30 и 45 минут. Учет результатов проводится по морфофункциональным изменениям *Tetrahimena periformis*: деформация клеток, поведение (подвижность), гибель клеток и лизис клеток.

Реактивы и материалы: взвесь культуры *Tetrahimena periformis*; вода водопроводная, исследуемые продукты; фарфоровая ступка и пестик; пенициллиновые флаконы с пробками; предметные и покрывные стекла; микроскоп; стеклянные палочки; бумажные фильтры; 1 %-ный раствор ацетона; встряхиватель.

Лабораторная работа 6. Исследование запыленности воздуха

Цель занятия: научиться определять запыленность воздуха, оценивать качественный состав пыли и экологическое состояние помещения.

Работа проводится в малых группах (по 2 человека), каждой группе дается индивидуальное задание исходя из темы лабораторной работы.

Задание 1. Определить запыленность воздуха.

Порядок работы. На 3 предметных стекла нанесите по 1 капле воды. Установите их в местах, указанных преподавателем, на 15 мин. По истечении этого срока накройте капли с осевшими пылинками покрывными стеклами, приготовив, таким образом микропрепараты.

Поместите микропрепарат на предметный столик микроскопа. Добейтесь увеличения, при котором в поле зрения помещается наибольшая часть капли. Сосчитайте количество пылинок в капле, зарисуйте и опишите их качественный состав (вид, структуру, взаимное расположение, особенности строения).

Варианты выбора условий отбора проб пыли: при открытой и закрытой форточке; в разных помещениях: в аудитории, в коридоре; за пределами помещения: на стройке, в парке, вблизи автомобильной или железной дороги; на разной высоте от пола: 20см, 1м, 1,5м.

Материалы, реактивы, оборудование: Вода дистиллированная, растворы азотной и соляной кислот (10%), весы аналитические, лопатка для отбора образцов отложений пыли, микроскоп с объективом «×8» (восьмикратное увеличение), пипетка, покрывные и предметные стекла для микроскопа.

Задание 2. Оценить качественный состав пыли и экологическое состояние помещения.

Порядок работы. Образец сухой пыли соберите из отложения лопаткой (с участка в 3-5 см) и поместите на предметное стекло. Приготовьте микропрепарат сухой пыли, накрыв образец покровным стеклом. Поместите микропрепарат на предметный столик микроскопа. Добейтесь увеличения, при котором в поле зрения помещается наибольшая часть образца.

Рассмотрите микропрепарат в микроскоп и опишите, из чего состоит пыль (вид, форма, размеры, взаимное расположение, цвет частиц).

Поднимите препаровальной иглой покровное стекло и нанесите на образец пыли каплю азотной или соляной кислоты. Сразу верните на место покровное стекло. Имея в виду, что соляная кислота растворяет частицы известняковых пород и водорастворимые соли, а азотная - и эти, и большинство других минеральных солей, рассмотрите препарат и сделайте вывод о произошедших изменениях.

Проанализируйте полученные результаты и сделайте выводы о качественном составе пыли, об относительной запыленности воздуха в разных точках объекта обследования. Оцените экологическое состояние помещения, пользуясь сведениями из приведенной ниже таблицы 6.1.

Таблица 6.1. Предельно допустимые концентрации для взвешенных веществ (пылей) различной природы

Тип вещества	ПДК (среднесуточная), мг/мэ
Пыль, не идентифицированная по составу	0,015
Неорганические вещества	
Хлорид натрия	0,15
Фосфоцементная пыль	0,5
Цемент	0,02
Сажа	0,05
Свинец и его соединения	0,0003
Угольная зола ТЭЦ (щелочная, мелкодисперсная)	0,02
Органические вещества, препараты бытовой химии	
Текстолит	0,04
Чистящее средство "Пемолукс"	0,02
СМС типа "Кристалл" (по алкилсульфонату натрия)	0,01
Биогенные вещества	
Белок пыли витаминно-белкового концентрата	0,001
Комбикорм	0,01
Хлопок	0,05
Углеродные волокнистые материалы	0,05

Практическое занятие проводится в виде исследовательской работы, проводимой в малых группах (по 2-3 человека). Студенты полу-

чают задания, выполняют его и в конце занятия проводят блиц-семинар, на котором делятся полученными данными.

Лабораторная работа 7. Определение окисляемости природных и сточных вод

Цель работы: ознакомиться с перманганатным методом определения окисляемости природных и сточных вод.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Окисляемость воды является одним из важных химических показателей при санитарно-гигиенической оценке качества воды. Большой окисляемостью характеризуются воды, загрязненные хозяйственно-бытовыми и сточными водами. Окисляемость выражается в количестве миллиграммов кислорода в 1 л воды. Она вызывается присутствием в природных и сточных водах различного рода восстановителей как органического, так и минерального (неорганического) происхождения. К неорганическим восстановителям, находящимся в водах, относятся сероводород, соединения железа (II), сульфиты, аммиак, нитриты и др.

В сточных водах окисляемость обусловлена в большей мере органическими веществами. В чистых природных водах она составляет 2-5 мг/л O_2 , а более загрязненные речные и озерные воды обладают окисляемостью в 5-12 мг/л O_2 .

Восстановительная способность органических веществ различна и зависит как от их природы, так и от условий, в которых протекают окислительно-восстановительные процессы. Поэтому величина окисляемости зависит не только от общего содержания органических веществ в воде, но и от условий ее определения.

Окисляемость может быть определена перманганатным (с использованием перманганата калия) и бихроматным (с использованием бихромата калия) методами

Более полное окисление органических соединений достигается при использовании бихромата калия. Окисляемость, определенная бихроматным методом, называют химическим потреблением кислорода (ХПК). Недостатком этого метода является применение сульфата серебра, так как некоторые вещества в отсутствие этого соединения не окисляются.

Перманганатный метод определения окисляемости недостаточно точен, тем не менее, его используют чаще.

В качестве окислителя при этом методе используют раствор перманганата калия, который в этом случае сам является индикатором.

При окислении всех веществ, содержащихся в исследуемой пробе, одна избыточная капля раствора вызывает появление розовой окраски.

При небольшом содержании хлоридов окисляемость определяют в кислой среде. При большом содержании их (выше 300 мг/л) - в щелочной.

При наличии в воде значительных количеств минеральных восстановителей (солей двухвалентного железа, сероводорода и др.), окисляющихся перманганатом калия, надо в отдельной пробе на холоде оттитровать перманганатом калия эти соединения и израсходованный объем раствора перманганата калия вычесть из общего объема, пошедшего на определение окисляемости воды.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. В коническую колбу для титрования отобрать 250 мл исследуемой воды, полученной у преподавателя, добавить к ней из мерного цилиндра 5 мл 25%-ного раствора серной кислоты.

2.2. К подкисленной пробе воды из бюретки прилить 20 мл 0,1 Н раствора перманганата калия.

2.3. Колбу с полученным раствором нагреть на плитке до кипения и кипятить в течение 10 мин. За это время в воде происходят процессы окисления находящихся в ней восстановителей за счет перманганата калия. Раствор при этом не должен терять розовой окраски, указывающей на наличие избытка перманганата калия.

Примечание. Если при кипячении этого раствора происходит изменение его окраски, то необходимо повторить опыт, либо с большим количеством перманганата калия, либо разбавить исследуемую воду в несколько раз дистиллированной водой.

2.4. По истечении 10 мин прекратить кипячение раствора и прилить к нему из бюретки 20 мл 0,1 Н раствора щавелевой кислоты (или оксалата натрия).

При этом происходит восстановление избытка перманганата калия, неизрасходованного на окисление восстановителей, находящихся в исследуемой воде. Раствор обесцвечивается. В нем будет находиться избыток щавелевой кислоты.

2.5. Этот раствор оттитровать 0,1 Н раствором перманганата калия до появления устойчивого (неисчезающего в течение 2-3 мин) слабого розового окрашивания. Измерить объем, мл, пошедшего на титрование раствора перманганата калия и рассчитать окисляемость исследуемой воды по следующей формуле, мг/л:

$$\text{Окисляемость} = \frac{N_{KMnO_4} \cdot V_{KMnO_4} \cdot 1000}{V_{H_2O}} \cdot 8$$

где N_{KMnO_4} – нормальность перманганата калия,

V_{H_2O} – объем воды

V_{KMnO_4} – объем перманганата калия

8 - миллиэквивалентная масса кислорода, мг.

Материалы и реактивы: исследуемые образцы сточных и природных вод; колбы конические на 100, 250 мл; мерные цилиндры на 50, 100 мл; бюретки для титрования на 25 и 50 мл; 25%-ный раствор серной кислоты; 0,1 Н раствор перманганата калия; 0,1 Н раствор щавелевой кислоты (или оксалата натрия); дистиллированная вода, вытяжной шкаф, электроплита.

Лабораторная работа 8. Методы определения остаточных количеств пестицидов в биологических средах и сельскохозяйственной продукции

Цель занятия: ознакомиться с методами определения остаточных количеств пестицидов в биологических средах, освоить колориметрический метод на примере определения количества пестицида на семенах озимой пшеницы.

Одно из отрицательных последствий широкого применения пестицидов – загрязнение остатками этих веществ воздуха, воды, почвы, растений и других биологических объектов. Во избежание этого явления применение химических средств защиты растений строго регламентировано, установлены максимально допустимые уровни остатков пестицидов и их метаболитов в продуктах питания и кормах, предельно допустимые концентрации (ПДК) в воде, воздухе, почве.

Контроль за уровнем остаточных количеств пестицидов в различных средах ведут лаборатории санэпидемстанций, токсикологические лаборатории станций защиты растений.

Количественный анализ связан с рядом трудностей, в первую очередь с малым содержанием вещества в пробе и большим количеством коэкстрактивных веществ, мешающих анализу. Поэтому каждый анализ требует очистки и концентрации экстрактов и включает в себя следующие этапы:

- 1) отбор средних проб;
- 2) экстракцию пестицида;
- 3) очистку и концентрирование экстракта;
- 4) количественное определение пестицида инструментальными методами.

1. ПРАВИЛА ОТБОРА ОБЪЕДИНЕННЫХ (СРЕДНИХ) ПРОБ

Отбор проб – важная операция, поскольку на основании анализа объединенной (средней) пробы делают заключение обо всей партии (пищевых продуктов, почвы, воды). Необходимо отобрать пробу таким образом, чтобы она полностью охарактеризовала анализируемый объект.

Из партии пищевого продукта, с участка сельскохозяйственной культуры или из водоема отбирают несколько проб, тщательно их перемешивают и составляют средний образец. Размер отбираемой из него объединенной пробы зависит от вида исследуемого материала и целей анализа. Ориентировочно объединенная проба пищевых продуктов, почвы и воды, направляемых в лабораторию должна составлять, кг, не менее:

зерно зерновых и бобовых культур -	3
овощей, плодов, ягод -	5
травы и листьев -	3
сена -	1
почвы -	0,5-1
воды -	2 л

В полевых условиях образцы целых растений отбирают по диагоналям прямоугольника на равных расстояниях. Средний образец составляют из 20-30 растений, а для многолетних кормовых культур отбирают по 1/4 куста от 10-15 растений, от которых в лаборатории отделяют листья, стебли и корни. Для объединенной пробы берут по одной части листьев, стеблей и корней, перемешивают, взвешивают и измельчают. Приготовленную таким образом пробу используют для анализа.

Средний образец овощей (томат, перец, баклажан, огурец, лук и листовые овощи) и корнеклубнеплодов отбирают по диагонали участка с промежутками в 6 - 10 растений. Плоды берут с различных ярусов не менее чем с 10 растений (лучше с 20-25), а листья - с верхнего, среднего и нижнего ярусов с 3-5 растений в каждой точке отбора. Урожай каждого из 10 растений картофеля делят пополам так, чтобы в каждую половину вошли в одинаковых количествах крупные, средние и мелкие клубни. Все пробы смешивают в средний образец.

Для взятия средних образцов плодовых и ягодных культур выбирают не менее 10 деревьев или кустов, расположенных по диагоналям участка. В больших садах для этих целей используют наиболее типичные участки. С отдельных деревьев и кустов плоды, ягоды и гроздья винограда берут с разных ярусов и сторон по отношению к частям света.

Полученные таким образом образцы используют для отбора объединенной пробы плодов, овощей и корнеплодов. Для этого каждый плод делят на четыре части и берут его четвертую часть.

Затем пробу перемешивают, взвешивают, измельчают и в таком виде подвергают анализу.

Средний образец зерна, семян масличных культур и других сыпучих продуктов массой 20-30 кг отбирают совком или щупом из разных участков партии. Отбор объединенной пробы этих продуктов проводят методом квартования, то есть крестообразного деления.

Пробы почвы берут в 5-6 местах (0,5 кг в каждом месте) по диагонали участка площадью 1-5 га с различной глубины, исходя из поставленной задачи. В лаборатории почву высушивают до воздушно-сухого состояния в защищенном от прямых солнечных лучей месте. После сушки образцы измельчают и берут из них объединенную пробу методом квартования. Перед анализом почву просеивают через сито с диаметром отверстий 1 мм.

Пробы воды из открытых малых и средних водоемов отбирают на расстоянии 2-5 м от берега. При ширине водоема 15- 20 м и глубине до 1 м пробу воды лучше брать на середине водоема, на глубине 0,5 м. Кроме пунктов водоиспользования, пробы рекомендуется отбирать в местах впадения притоков, ручьев и потоков дождевых и талых вод в открытые водоемы, а также в местах выклинивания талых вод.

Анализ образцов растений на содержание остатков пестицидов следует проводить сразу же после их взятия. Если нет такой возможности, то образцы нужно хранить в условиях, при которых обеспечивается полная сохранность в них остатков пестицидов. Для кратковременного хранения (от 3 до 12 ч) растительные пробы помещают в холодильник при температуре от 5 до 10 °С, а для длительного (несколько дней) - от -10 до - 30 °С.

При изучении поступления, распределения и накопления пестицидов в растительном организме содержание их следует определять только в сырых (свежих) пробах.

Все образцы, поступающие в лабораторию, должны быть хорошо упакованы, правильно подписаны и сопровождаться паспортом, где указывают: 1) когда и где отобран образец; 2) - тип почвы, на котором выращивали данную культуру; 3) название растения; 4) наименование применявшегося пестицида; 5) время обработки; 6) физиологическое состояние во время обработки, а для молодых растений - время со дня посева; 7) препаративную форму пестицида; 8) норму расхода на 1 га; 9) концентрацию применяемого рабочего раствора; 10) растворитель, который использовали для приготовления рабочего раствора; 11) расход рабочего раствора на I га; 12) число обработок; 13) погодные условия в день обработки; 14) за сколько дней до уборки проведено последнее опрыскивание.

2. СПОСОБЫ ЭКСТРАКЦИИ ПЕСТИЦИДОВ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Существует много способов экстракции: экстракция встряхиванием с органическим растворителем, гомогенизация, перегонка с водяным паром, вакуумная перегонка, кодистилляция в токе азота и др. Однако наиболее широко применяют экстракцию органическим растворителем путем пере-

мешивания или встряхивания. При этом решающее, значение имеет выбор растворителя, который должен хорошо растворять пестицид и плохо - примеси. К таким растворителям относятся пентан, м-гексан, петролейный эфир. Широко используют и более активные растворители - хлороформ, ацетон, а также смеси полярных и неполярных растворителей.

Экстракцию методом встряхивания с растворителем применяют при анализе воды, почвы, кормов и переработанных фруктов и овощей, то есть в тех случаях, когда пестицид не поглощен тканями и остатки его, находятся на поверхности исследуемого объекта.

Если предполагают, что пестицид проник внутрь тканей, то используют метод гомогенизации в органическом растворителе на специальных приборах - гомогенизаторах. Такой метод наиболее приемлем при анализе продуктов животноводства, органов и тканей животных, а также растительного материала, когда изучают метаболизм пестицидов. Другие методы экстракции применяют реже и для специальных целей.

3. ОЧИСТКА ЭКСТРАКТОВ

Для получения точных и достоверных результатов полученный экстракт подвергают очистке различными способами.

К одному из наиболее распространенных относится метод распределения между двумя несмешивающимися жидкостями, основанный на различии коэффициентов распределения пестицидов и коэкстрактивных веществ. Например, при анализе фосфорорганических инсектицидов применяют перераспределение между водным раствором ацетонитрила и гексаном, хлористым метилом и гексаном, оводненным ацетоном и хлороформом. Для объектов, содержащих большое количество жиров и восков, используют метод осаждения коэкстрактивных веществ из раствора охлажденного ацетона.

Наряду с указанными способами очистки применяют и другие методы очистки: омыление, сульфирование, окисление, восстановление, перегонку с водяным паром, вакуумную перегонку, сублимацию, выбор которых зависит от особенностей анализа пестицида.

4. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТКОВ ПЕСТИЦИДОВ

Несмотря на широкое применение пестицидов во всем мире, их количество в биологических средах относительно невелико - в пределах 1 мг на 1 кг объекта (предельно допустимые концентрации и максимально допустимые уровни остатков пестицидов в воздухе, воде, почве и продуктах сельского хозяйства довольно малы, составляют от сотых долей до нескольких миллиграммов на 1 кг).

Все это требует разработки и использования высокочувствительных, легкодоступных методов идентификации и количественного определения микроколичеств пестицидов.

Для анализа остатков пестицидов применяют различные методы, позволяющие определить очень малые их количества:

Метод анализа	Определяемые количества, г
Полярография	$10^{-5}—10^{-6}$
Спектрофотометрия	$10^{-6}—10^{-8}$
Масс-спектрометрия	$10^{-10}—10^{-11}$
Радиохимический анализ	$10^{-10}—10^{-13}$
Тонкослойная и бумажная хроматография	$10^{-6}—10^{-7}$
Газовая хроматография с применением детекторов:	
микрокулонометрического	$10^{-8}—10^{-9}$
пламенно-фотометрического	$10^{-9}—10^{-10}$
термоионного	$10^{-10}—10^{-11}$
электронного захвата	$10^{-11}—10^{-13}$

Наиболее распространены методы хроматографии в тонком слое и газовой или газожидкостной хроматографии, первый - в силу своей простоты, доступности и быстроты анализа, а второй - из-за высокой точности и универсальности.

4.1. Колориметрический метод определения количества протравителя раксил (бункер и др.) на семенах озимой пшеницы. Метод основан на изменении интенсивности светового потока, прошедшего через окрашенный раствор. Измеряя светопоглощение такого окрашенного раствора или сравнивая полученную окраску с окраской раствора известной концентрации, определяют содержание вещества в растворе.

Для определения концентрации исследуемого раствора измеряют его оптическую плотность (D) и оптическую плотность эталонного раствора ($D_{\text{эт}}$) с известной концентрацией ($C_{\text{эт}}$). Расчет проводят по формуле:

$$C = \frac{D}{D_{\text{эт}}} \cdot C_{\text{эт}}$$

Проведение анализа. Семена озимой пшеницы (100 г), предположительно протравленные раксилем (бункером), помещают в колбу емкостью 250 мл. Добавляют 50 мл дистиллированной воды и тщательно встряхивают. Воду с растворенным в ней протравителем, пропускают через бумажный фильтр. Процедуру повторяют. Объем воды с пестицидом доводят до 100 мл.

Заблаговременно готовят раствор протравителя, с известной концентрацией.

Измеряют оптическую плотность растворов при длине волны света 490-500 нм (сине-зеленый светофильтр). Расчет концентрации пестицида производят по указанной ранее формуле.

Оборудование и реактивы: семена озимой пшеницы, протравленные препаратом раксил (бункер и др.), протравитель семян раксил (бункер и др.) - 1-10 мл, колбы конические (250 мл) – 3 шт. мерный цилиндр на 100 мл, пипетка стеклянная на 1-10 мл, вода дистиллированная, фотоэлектрокolorиметр ФЭК-56М, фильтры бумажные.

Вторая часть занятия проводится на базе учебно-испытательной лаборатории СтГАУ. Проводится ознакомительная экскурсия в лабораторию токсикологии, на которой студенты рассматривают приборы по изучению остаточных количеств пестицидов

Первая часть занятия проводится в виде экскурсии в токсикологическую лабораторию (при УНИЛ), на которой студенты знакомятся с этапами анализа, оборудованием, методами определения, значимостью методик.

4. Содержание отчета по лабораторной работе

Отчет о проведенной лабораторной работе записывается в конце работы. В рабочую тетрадь вносятся рисунки (если таковые требуются), результаты и выводы.

5. Список литературы

а) Основная

1. ЭБС «Znanium»: Экологическая токсикология и биотестирование водных экосистем: Учебное пособие / С.В. Котелевцев, Д.Н. Маторин, А.П. Садчиков - М.: НИЦ ИНФРА-М, 2015. - 252 с. - Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/473568>

2. ЭБ «Труды ученых СтГАУ»: Экологическая токсикология [электронный полный текст] : учеб.-метод. пособие по выполнению лабораторных работ и проведению семинарских занятий для студентов всех форм обучения направления 05.03.06 "Экология и природопользование" / Л. В. Мазницына, Ю. А. Безгина, Н. Н. Глазунова, О. В. Шарипова ; СтГАУ. - Ставрополь : Параграф, 2014. - 635 КБ.

б) Дополнительная

1. ЭБС «Лань»: Ганиев, М.М. Химические средства защиты растений [Электронный ресурс] : учеб. пособие / М.М. Ганиев, В.Д. Недорезков. —

Электрон. дан. — Санкт-Петербург : Лань, 2013. — 400 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/30196>. — Загл. с экрана.

2. ЭБС «Лань»: Сотникова, Е.В. Техносферная токсикология [Электронный ресурс] : учебное пособие / Е.В. Сотникова, В.П. Дмитренко. — Электрон. дан. — Санкт-Петербург : Лань, 2015. — 432 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/64338>. — Загл. с экрана.

3. ЭБС «Лань»: Королев, Б.А. Практикум по токсикологии [Электронный ресурс] : учебник / Б.А. Королев, Л.Н. Скосырских, Е.Л. Либерман. — Электрон. дан. — Санкт-Петербург : Лань, 2016. — 384 с. — Режим доступа: <https://e.lanbook.com/book/87580>. — Загл. с экрана.

4. ЭБС «Znanium»: Основы токсикологии: Учебное пособие/Кукин П.П., Пономарев Н.Л., Таранцева К.Р. - М.: НИЦ ИНФРА-М, 2016. - 280 с. - Режим доступа: <http://znanium.com/catalog/product/429207>

5. Мосина, Л. В. Агроэкология. Сельскохозяйственная экотоксикология : учеб. пособие. Модуль 7. - М., 2000. - 184 с. - (Taxis).

6. Агроэкология : учебник для студентов вузов по агроном. специальностям / под ред. В. А. Черникова, А. И. Чекереса. - Москва : КолосС, 2000. - 536 с. : ил. - (Учебники и учебные пособия для студентов вузов. Гр. МСХ РФ).

7. Каплин, В. Г. Основы экотоксикологии : учеб. пособие для студентов вузов по специальностям: 110102 «Агроэкология» и 110203 «Защита растений». - М. : КолосС, 2007. - 232 с. : ил. - (Гр. МСХ РФ).

8. Проблемы агрохимии и экологии (периодическое издание).

в) Перечень ресурсов информационно-телекоммуникационной сети "Интернет" (далее - сеть «Интернет»), необходимых для освоения дисциплины.

1. Клиническая токсикология [Электронный ресурс]. – Режим доступа <http://www.medline.ru/public/clinic/terap/toxicology.phtml>, свободный, загл. с экрана.

2. Министерство природных ресурсов и охраны окружающей среды Ставропольского края [Электронный ресурс]. - Режим доступа <http://mpr.stavkrai.ru>, свободный, загл. с экрана.

3. Министерство природных ресурсов и экологии Российской Федерации [Электронный ресурс] : Режим доступа <http://www.mnr.gov.ru>, свободный, загл. с экрана.

4. Федеральный закон об охране окружающей среды [Электронный ресурс] / Консультант плюс. - Режим доступа http://www.consultant.ru/popular/okrsred/70_1.html, свободный, загл. с экрана

5. Эйхлер, Э. Яды в нашей пище [Электронный ресурс] / Э.Эйхлер – М., 1997 - 2019. - Режим доступа <http://n-t.ru/ri/eh/yd.htm>, свободный, загл. с экрана.