

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
профессионального образования
«ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ СИСТЕМ УПРАВЛЕНИЯ И
И РАДИОЭЛЕКТРОНИКИ» (ТУСУР)

Кафедра радиоэлектронных технологий и экологического мониторинга (РЭТЭМ)

Е.Г. Незнамова

Методические указания к выполнению практических заданий по дисциплине
«Экологическая токсикология»

Практическая работа 1. **Определение степени повреждения листовой пластинки токсичными выбросами автотранспорта**

Задание: 1. Ознакомиться с методом диагностики здоровых и поврежденных тканей растений.

2. Собрать материал.

3. Определить степень повреждения листьев.

4. Провести сравнительный анализ повреждений листьев по видовой принадлежности растений и месту сбора материалов.

5. Оценить асимметрию листовой пластинки собранных листьев.

6. Оформить работу, сделать выводы.

Материалы и оборудование: листья древесных растений (20 штук), емкости для вымачивания листьев в воде (25-30С°) и растворе соляной кислоты (0.2н), линейка, подносы для раскладывания листьев.

Краткая теоретическая часть. Растения, произрастающие вдоль дорог, в городской черте наиболее подвержены воздействию выбросов автотранспорта. Оксиды азота, монооксид углерода в большом количестве способны вызвать нарушения фотосинтетического аппарата растения, что выражается внешне в изменении окраски листовой пластинки. Поврежденные ткани обладают способностью к потемнению, образованию рыжих, коричневатых пятен. Если нарушения не столь значительны, то внешне они не проявляются, но при определенных методах изучения возможна диагностика и малых степеней нарушения.

Сбор материала. Сбор материала осуществляется группой по 3 человека непосредственно перед исследованиями. Исследователи набирают не менее 20 листьев с растения одного вида. При этом отмечают: 1) место произрастания растения (в условиях города отмечаются названия ближайших улиц, в полевых условиях – ближайшие населенные пункты и удаленность от них); 2) рельеф местности; 3) удаленность растения от автодороги.

Метод диагностики здоровых и поврежденных тканей растений.

Простейшим методом диагностики является воздействие на листовые пластинки слабым раствором соляной кислоты.

Собранные листья вначале тщательно осматривают, отмечая наличие различного рода изменений нормального облика листовой пластинки. Затем листья вымачивают 20 минут в теплой (25-30 С°) воде для размягчения тканей, после чего помещают в 0.2н раствор соляной кислоты и выдерживают в нем 15-20 минут.

Листья достают, помещают на бумагу и проводят осмотр, отмечая вновь появившиеся бурые пятна. Затем определяют процент поврежденных листовых пластинок по формуле: $N_{п}/N_{и} * 100\%$,

где: $N_{п}$ - количество поврежденных листовых пластинок, $N_{и}$ – количество исследованных листовых пластинок.

После этого визуальным методом оценивают площадь пораженной ткани листовых пластинок, выражая ее также в процентах относительно всей поверхности листа. Площадь пораженной ткани: рассчитывают средний процент пораженной площади листовой пластинки по всей выборке.

Оценка асимметрии листовой пластинки проводится визуальным способом – лист растения складывается пополам по центральной жилке. При выраженной асимметрии при помощи линейки проводятся измерения от центральной жилки листа вправо и влево до боковых краев листовой пластинки. Можно замерить разницу между половинками листа при сгибании листа по центральной жилке. Таким образом, в каждом случае отмечается цифровые различия правой и левой части листа. Затем определяется средний размах отклонений ширины правой и левой частей листовых пластинок всей выборки: сумма всех

отклонений делится на число всех исследованных листьев.

Результаты исследований заносят в общую таблицу (табл.1). Затем проводится сравнительная оценка всех результатов, полученных участниками работы. Исследователи оформляют работу, сопровождая ее соответствующими выводами.

Таблица 1. Характеристика древостоя центральной части г.Томска по степени повреждения тканей листовой пластинки

Место сбора	Вид растения	Доля пораженных листьев, (%)	Доля пораженной ткани, (%)	Среднее значение асимметрии листовой пластинки, мм

Практическая работа №2. Токсикометрическая оценка биологической активности токсикантов

Задание: Ознакомьтесь с теоретической частью, разберите алгоритм оценки токсичности вещества по Спирмену — Керберу. С измененными данными показателя «Число погибших животных» (табл.1) рассчитайте генеральную среднюю дозу эффекта LD_{50} .

Теоретическая часть. При испытании инсектицидов, лекарственных, радиоактивных и других биологически активных веществ обнаруживается, что особи однородной группы реагируют на одну и ту же дозу по-разному, (т.е. имеет место индивидуальная изменчивость) и что разные дозы могут вызывать одинаковый эффект у целой группы индивидов. Отсюда следует, что о силе действия на организм биологически активных веществ можно судить лишь по среднему результату.

Дозы сильнодействующих веществ испытывают на однородных группах (мыши, крысы и другие объекты) по 6 - 10 особей в группе. На каждой группе изучают одну дозу. Обычно применяют 5 - 9 доз в возрастающем по силе действия порядке. Опыт проводят одновременно на всех группах особей. При этом учитывают число особей, у которых обнаружился эффект, и число тех, у которых видимого эффекта от действия доз не обнаружено. О среднем результате судят по обнаружению эффекта действия доз у 50% подопытных индивидов.

Определить дозу, вызвавшую видимый эффект или летальный исход у 50% подопытных индивидов, можно разными способами - графически и аналитически. Установлено, что индивидуальные реакции подопытных животных на воздействие биологически активных веществ распределяются, как правило, нормально. Зависимость между дозой и эффектом действия графически выражается в виде S-образной кривой, или *кумуляты*. Кумулята, называемая *кривой эффекта доз*, может быть получена, если по оси абсцисс откладывают дозы вещества, а по оси ординат - эффект воздействия этих доз на подопытных животных. Центральная точка кумуляты совпадает с центром распределения. Опуская из этой точки перпендикуляры на оси координат, можно определить среднюю дозу эффекта. Проще, однако, среднюю дозу эффекта определить аналитическими способами, один из которых рассматривается далее.

Способ Спирмена — Кербера. Достоинство этого способа заключается в том, что он позволяет не только рассчитать среднюю дозу эффекта M , но и построить доверительный интервал для генеральной средней μ . Среднюю дозу эффекта определяют по формуле:

$$M = m - d (P_1 - 0.5), \quad (1)$$

где m — минимальная доза, вызывающая эффект у 100% подопытных индивидов; d — разница между дозами; P_1 — суммарная доля реагирующих на дозы индивидов.

Среднее квадратическое отклонение вычисляют по следующей формуле:

$$S_m = d \sqrt{2P_2 - P_1^2 - P_1 - 1/12} \quad \dots \quad (2)$$

Здесь P_2 — сумма ряда накопленных долей реагирующих на дозы индивидов.

Пример. На группе, состоящей из десяти лабораторных мышей, испытывали действие ядовитого вещества. Дозы яда рассчитывали в миллиграммах на 1 кг массы тела подопытных животных. Эффект действия яда учитывали по летальным исходам. Результаты опыта приведены в таблице.

В данном случае $n=10$, $d=10$, $m=180$ мг/кг, $P_1=4,0$ и $P_2=11,8$. Подставляем известные величины в формулы (1) и (2): $m=LD_{50}=180-10(4,0-0,5)=180-35=145$ мг/кг, получаем $S_m=18,75$.

Найденные величины $m=145$ и $S_m = 18,75$ позволяют построить доверительный интервал для генерального параметра, т. е. истинной средней дозы эффекта: $m \pm \Delta_m$, где $\Delta_m = tS_m$ — величина предельной ошибки средней m .

В данном случае $S_m = S_m / \sqrt{n} = 18,75 / \sqrt{10} = 18,75 / 3,16 = 5,93$. Отсюда для 5%-ного уровня значимости и соответственно $t=1,96$ нижняя граница доверительного интервала составляет

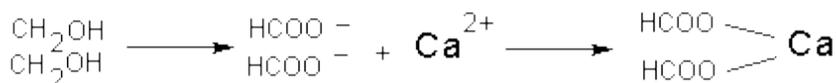
$145 - 1,96 \cdot 5,93 = 145 - 11,62 = 133,38 \sim 133$ мг/кг и верхняя граница $145 + 11,62 = 156,62 \sim 157$ мг/кг.

Это означает, что с вероятностью $P = 0,95$ можно утверждать, что генеральная средняя доза эффекта LD_{50} находится в пределах от 133 до 157 мг/кг.

Таблица 1. Результаты опытов, используемые при расчетах

Доза, мг/кг	110	120	130	140	150	160	170	180	Сумма
Число погибших животных	0	1	3	4	6	7	9	10	-
Доля погибших животных	0	0,1	0,3	0,4	0,6	0,7	0,9	1,0	4,0
Накопленная доля погибших животных	0	0,1	0,4	0,8	1,4	2,1	3,0	4,0	11,8

Развивающаяся гипокальциемия имеет определенное значение для развития и проявления интоксикации. Аналогичным образом действует щавелевая кислота, образующаяся в организме в процессе метаболизма этиленгликоля при интоксикации последним:



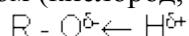
Поскольку степень диссоциации многих веществ в водном растворе существенно зависит от pH среды, количество образовавшихся за счет ионной связи комплексов токсикант-мишень также зависит от этого показателя.

Ковалентная связь. Для образования ковалентной связи, взаимодействующие атомы должны иметь на внешней электронной орбите неспаренные электроны. Эти электроны занимают одну и ту же орбиталь, а образовавшаяся общая пара формирует силу притяжения между атомами. В результате образования такой общей пары электронов каждый из взаимодействующих атомов приобретает "завершенный набор" электронов и образовавшееся соединение становится стабильным. Энергия ковалентной связи велика и составляет 200 - 400 кДж/мол

Высокая стабильность связи этого типа означает практически необратимый характер присоединения токсиканта к структуре-мишени. Примерами веществ, образующих с биомолекулами подобную связь, являются ФОС (взаимодействуют с серином, входящим в структуру активного центра ацетилхолинэстеразы), иприты (взаимодействуют с пуриновыми основаниями нуклеиновых кислот), а также целый ряд других распространенных токсикантов (метилбромид, метилхлорид, этиленоксид и др.). Вследствие прочности образовавшейся связи, разрушение комплекса токсикант-биомишень возможно только с помощью специальных средств (например, реактиваторов ХЭ при интоксикации ФОС). Восполнение содержания поврежденной токсикантом биологической структуры возможно также за счет синтеза её de novo. Так, восстановление активности АХЭ в тканях лабораторных животных отравленных зоманом проходит со скоростью синтеза энзима нервными клетками.

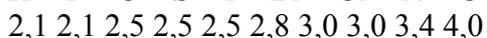
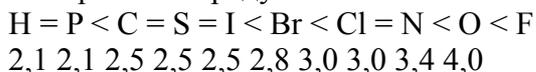
Координационная связь - это ковалентная связь, в которой обобществленную пару электронов предоставляет только один из участвующих в связи атомов. Один из атомов является донором, а другой акцептором электронной пары, поэтому эту связь называют также донорно-акцепторной. Акцепторами часто являются катионы металлов, или атомы переходных металлов (Zn, Cu, Fe), входящих в состав молекулы. Таким образом, в частности, оксид углерода взаимодействует с железом гемоглобина, с образованием карбоксигемоглобина.

Водородная связь. Ковалентная связь между атомом водорода и электроотрицательным атомом (кислород, азот, сера и т.д.) более или менее поляризована



Вследствие этого атом водорода приобретает незначительный положительный заряд. Если вблизи такого атома находится молекула или группа, содержащая анион или электроотрицательный атом, между ними образуется слабая связь, называемая водородной.

Водородная связь может образовываться как между молекулами, так и между атомами внутри молекул. Энергия связи не велика и в водном растворе составляет около 20 кДж/мол. Её прочность во многом зависит от строения взаимодействующих веществ, в частности, от степени электроотрицательности атомов, связанных с водородом. Электроотрицательность атомов возрастает в ряду:



Водородные связи имеют очень большое значение для поддержания пространственной структуры белков, нуклеиновых кислот и других высокомолекулярных соединений. Вещества, способные разрушать водородную связь, могут нарушать пространственную структуру макромолекул (явление интерколации: встраивание молекул акридина, этидиумбромиды между плоскостями, образуемыми витками спирали молекулы ДНК).

В состав молекул токсикантов также входят группы, способные участвовать в

образовании водородных связей. Если эти группы (X-H) являются структурными элементами "активного" радикала токсиканта, то они участвуют в образовании сложной связи вещества с молекулой-мишенью. Поскольку водородные связи являются по сути электростатическими, их сила ослабевает в присутствии веществ, обладающих свойствами диэлектриков ("неэлектролитов").

Связи Ван-дер-Ваальса. Форма электронного облака молекул квазистабильна, то есть не изменяется до тех пор, пока на неё не действуют внешние силы. Под влиянием электромагнитных полей электронные облака молекул деформируются. При этом безразлично вызвано ли появление деформирующих сил воздействием внешних полей или поле сформировано близлежащими ионами, диполями, аполярными молекулами. Степень деформированности электронного облака зависит от энергетических характеристик воздействующих полей и поляризуемости самой молекулы. Способность электронного облака к деформации (поляризуемость) зависит от размеров молекулы. У больших молекул она больше, чем у малых, поскольку сместить электроны, находящиеся на значительном удалении от ядра атома, легче.

Деформирующее воздействие полей превращает неполярные молекулы в диполи, так как центры максимальной плотности положительного и отрицательного зарядов молекулы несколько разъединяются в пространстве. Сформировавшийся диполь называют индуцированным или временным, поскольку он перестает существовать сразу после прекращения действия деформирующих сил. Две близлежащие неполярные молекулы могут взаимно индуцировать образование временных диполей и, таким образом взаимодействовать друг с другом. Силы взаимодействия, формирующиеся между временными диполями, называются силами Лондона - Ван-дер-Ваальса. Энергия образующейся связи мала, однако она существенно возрастает при увеличении числа участков контакта между взаимодействующими молекулами. Со стороны токсиканта это могут быть ароматические, гетероциклические, алкильные радикалы; со стороны рецептора - неполярные участки молекул аминокислот (лейцин, валин, аланин, пролин и др.). Вклад каждой -CH₂- группы алкильной цепи во взаимодействие оценивается в 2 - 4 кдж/мол. При тесном контакте больших неполярных молекул энергия связи может достичь очень больших величин. Поэтому при образовании комплекса токсикант-биомшень силы Ван-дер-Ваальса могут обеспечивать очень прочную фиксацию ксенобиотика. Действующая сила, ответственная за формирование связи, обратно пропорциональна седьмой степени расстояния между взаимодействующими молекулами. Поэтому она не может обеспечить притяжение молекул токсиканта, свободно циркулирующих в биосредах, к рецептору. В этом процессе первостепенную роль играют силы электростатического взаимодействия. Однако после того как контакт между токсикантом и рецептором осуществился силы Ван-дер-Ваальса обеспечивают его ориентацию и плотную фиксацию.

Гидрофобное взаимодействие. Гидрофобные связи формируются в водной среде, когда молекулы взаимодействующих веществ контактируют друг с другом неполярными (гидрофобными) участками. В отличие от взаимодействия Ван-дер-Ваальса и донорно-акцепторного взаимодействия, которые также формируются при взаимодействии неполярных групп, образование гидрофобных связей обусловлено свойствами воды, без участия которой взаимодействие происходить не может. В соответствии с теорией, молекулы воды связаны друг с другом водородными связями, образуя трехмерную структуру (кластер), напоминающую структуру льда. На границе поверхности, разделяющей неполярную молекулу и молекулы воды, образование такой структуры затрудняется. При контакте двух неполярных молекул, растворенных в воде, общая площадь поверхности, разделяющей воду и эти молекулы, уменьшается. Вследствие этого, мобилизуется часть молекул воды, организованных в кластер. В противоположность всем другим химическим связям и взаимодействиям гидрофобная связь, таким образом, обусловлена преобразованием растворителя (воды), а не растворенных взаимодействующих веществ. Движущей силой образования связи является рост энтропии целостной системы растворитель - растворенные

молекулы. Структурная организация гидрофобных, взаимодействующих молекул возрастает (уменьшение энтропии), но при этом существенно дезорганизуется (энтропия возрастает) структура растворителя (воды).

Гидрофобные связи имеют большое значение при взаимодействии неполярных молекул ксенобиотиков с клеточными и внутриклеточными мембранами, для образования их комплексов с белками, при этом возможно нарушение конформации макромолекул.

В процессе взаимодействия низкомолекулярного вещества с биомишенью практически всегда формируется несколько типов связей, поскольку молекула токсиканта, как правило, включает полярный (иногда даже ионизированный), и неполярный фрагменты.

Ионные связи, за счет которых осуществляется притяжение молекулы к биомишени, мало специфичны (аналогично ион-дипольному и диполь-дипольному взаимодействию). Взаимодействие между неполярными группами также неспецифично. Однако, если в структуре мишени (например, рецепторе для эндогенных биорегуляторов) полярные и неполярные группы пространственно организованы, между этими участками и особыми участками молекулы токсиканта образуются специфичные связи, обусловленные пространственной организацией молекулы токсиканта. Такое взаимодействие можно сравнить с ориентацией намагниченных стрелок в магнитном поле. После ориентации молекулы с помощью ионного (диполь-дипольного) взаимодействия между ней и рецептором формируется тесный контакт, и образуются связи за счет водородных сил и сил Ван-дер-Ваальса. Образующийся комплекс тем более прочен, чем более комплементарна молекула токсиканта рецептору.

Практическая работа №4. Определение содержания нитритов и нитратов в пищевых продуктах

Задание: 1. Ознакомьтесь с понятием «нитратные загрязнения», сделайте краткий конспект. 2. Измерьте уровень загрязнения пищевых продуктов нитратами. 3. Сравните полученные результаты с предложенными теоретически и сделайте соответствующие выводы.

Материалы и оборудование: нитромер, набор пищевых продуктов (овощи, фрукты), скальпель.

Теоретическая часть. Проблема содержания нитратов в продуктах в настоящее время актуальна. Производство удобрений составляет сейчас около 23 кг в год на человека, причем половина всех удобрений содержат соединения азота.

Азот — элемент, который стимулирует рост растений, влияет на качество плодов и содержание в них белка. Органические, и минеральные удобрения, содержащие соединения азота, в почве превращаются в нитраты (NO_3), вместе с водой поступающие в растения. В корневой системе, стеблях, листьях, плодах нитраты восстанавливаются под воздействием ферментов до иона аммония NH_4^+ , который становится основой аминокислот и далее — белков. То есть минеральный азот превращается в безвредный органический азот — компонент природных соединений. Когда же удобрений поступает слишком много, растения не справляются с их переработкой, и нитраты скапливаются в плодах, попадающих к нам на стол.

Нитраты и нитриты используют для обработки и консервирования многих пищевых продуктов, в том числе ветчины, бекона, солонины, а также некоторых сортов сыра и рыбы.

Повышенные содержания нитратов в организме подавляют дыхание клеток, что выражается в снижении работоспособности, головокружении, потере сознания. Ученые полагают, что в организме человека нитраты превращаются в нитрозоамины, которые являются канцерогенами. Человек относительно легко переносит дозу в 150 — 200 мг нитратов в день; 500 мг - предельно допустимая доза; 600 мг в день — доза токсичная для взрослого человека, а для грудного ребенка даже 10 мг нитратов могут вызвать сильное

отравление. В питьевой воде допускается до 45 мг/л нитратов.

Чтобы не допустить превышения этих доз, полезно знать некоторые правила:

- основными источниками нитратов являются растительные продукты. В незрелых овощах, а также в овощах раннего созревания нитратов больше, чем в достигших нормальной уборочной зрелости;

- внутри растения нитраты распределяются неравномерно. Например, в ранних тепличных огурцах количество нитратов от плодоножки уменьшается по длине огурца на каждый сантиметр в 1,5 — 2 раза. Больше вес го нитратов в кожице огурцов и кабачков;

- содержание нитратов связано с особенностями и специализацией отдельных органов растений: типом листьев, размером листовых черешков и жилок, диаметром центрального цилиндра в корнеплодах. У зеленых листовых овощей, например, нитраты накапливаются в основном в стеблях и черешках листьев, поскольку именно сюда идет основной транспорт соединений азота.

Самым простым способом снижения количества нитратов является очищение овощей от кожицы, не использование тех частей растения, в которых происходит максимальное накопление нитратов: например, кочерыжки в капусте, стебля петрушки.

Другой способ уменьшения количества нитратов - предварительное вымачивание овощей в водных растворах

Ход работы. Ознакомьтесь с устройством и принципами работы нитромера.

Определите количество нитратов в предложенных образцах с помощью нитромера. На основании измерений заполните таблицу 1.

По каждому измерению в соответствии с данными, приведенными в таблице 2, сделайте выводы о качестве продуктов с точки зрения содержащихся в них нитратов.

Укажите, какое количество продукта вы можете съесть, чтобы не превысить свою допустимую суточную норму нитратов, исходя из того, что допустимая суточная норма нитратов 5 мг на 1 кг веса человека. Обоснуйте свои выводы.

Таблица 1. Качество плодоовощной продукции

Наименование образца	Показание нитромера (% мг/кг)	Заключение о качестве продукта

Таблица 2. Минимальные и максимальные количества нитратов в овощах (мг/кг)

Культура	Количество нитратов (мг/кг)	
	мин.	макс.
Арбуз	44	572
Баклажаны	88	264
Брюква	396	528
Горошек	22	88
Горчица	1320	1760
Дыня	44	484
Кабачки	369	704
Кориандр	44	748
Кресс-салат	1320	4840
Лук зеленый	44	1320
Лук репчатый	66	880
Морковь	176	2200

Огурцы	88	528
Патиссоны	176	880

На рисунке 1 показано распределение нитратов в корнеплодах столовой свеклы, моркови, клубне картофеля и кочане капусты. Сравните результаты своих измерений и сделайте практические выводы.

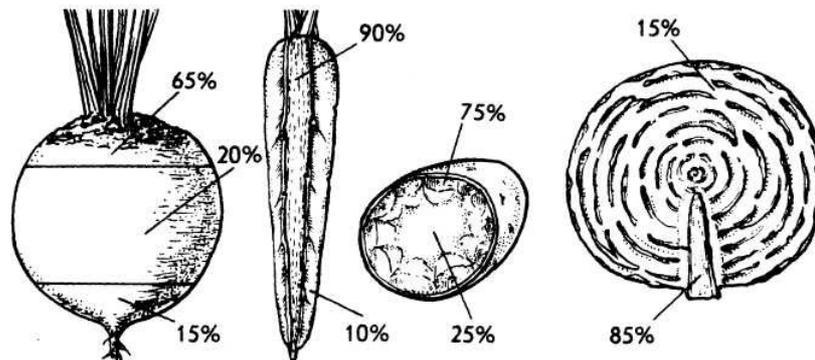


Рисунок 1. Распределение нитратов в овощах (свекле, моркови, картофеле, капусте)