

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
ГОМЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. Ф. СКОРИНЫ
Кафедра ботаники и физиологии растений

**Практическое руководство
к лабораторным работам по курсу
«Основы ксенобиологии» для студентов
IV курса биологического факультета,
IV и V курсов факультета заочного обучения
специальность Н 04.01.00. – «Биология»**

Гомель 2001

Составители: Горнасталев А.А., ассистент;
Рыбальченко А.Г., доцент, кандидат биологических наук.

Рецензенты: Шумилин В.А., кандидат технических наук;
Погодин Р.И., кандидат химических наук.

Рекомендовано к изданию научно-методическим советом Гомельского государственного университета им. Ф. Скорины 24 января 2001 года, протокол №5

Практическое руководство к лабораторным работам по курсу «Основы ксенобиологии» предназначено для студентов IV курса биологического факультета, IV и V курсов факультета заочного обучения.

В руководстве приведены работы по 5 разделам: “Качественное определение основных групп ксенобиотиков”, “Количественное определение ксенобиотиков”, “Влияние ксенобиотиков на физико-химические параметры протоплазмы”, “Мембранотропные свойства ксенобиотиков”, “Влияние ксенобиотиков на мезоструктуру листа”.

Тематика и содержание работ описанных в данном руководстве соответствует учебной программе курса утвержденной научно-методическим советом университета.

© Гомельский государственный университет
им. Ф. Скорины, 2001

СОДЕРЖАНИЕ

<u>I. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КСЕНОБИОТИКОВ</u>	5
РАЗДЕЛ 1. Идентификация (обнаружение) ксенобиотиков	7
Работа №1. Идентификация катионов тяжелых металлов по цветным химическим реакциям	8
Работа №2. Идентификация ксенобиотиков с использованием специфических и неспецифических реагентов	9
Работа №3. Качественное определение ксенобиотиков в растительном материале на примере определения алкилрезорцинолов в зерне ржи.....	11
РАЗДЕЛ 2. Количественное определение ксенобиотиков	13
Работа №4. Количественное определение содержания хлоридов и сульфатов в природных водах.....	13
Работа №5. Определение сульфидов и сероводорода методом фотоэлектроколориметрии.....	17
Работа №6. Фотоэлектрокалориметрическое определение гербицида «Эптам» в почве.....	18
<u>II. ДЕЙСТВИЕ КСЕНОБИОТИКОВ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ</u>	21
РАЗДЕЛ 3. Влияние ксенобиотиков на физико-химические свойства протоплазмы	21
Работа №7. Влияние ксенобиотиков на скорость циклоза протоплазмы.....	23
Работа №8. Определение влияния ксенобиотиков на вязкость протоплазмы.....	25
РАЗДЕЛ 4. Мембранотропные свойства ксенобиотиков	26
Работа №9. Влияние ксенобиотиков на проницаемость биологических мембран.....	27
РАЗДЕЛ 5. Действие ксенобиотиков на мезоструктуру листьев	28

Работа №10. Определение относительного объема мезофилла листа.....	29
Работа №11. Определение объема клеток мезофилла.....	30
ЛИТЕРАТУРА	32

I. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КСЕНОБИОТИКОВ

В практической деятельности специалистов часто возникает необходимость идентификации (обнаружения) того или иного вещества, а также количественной оценки (измерения) его содержания. Такая потребность может появляться у человека и в его повседневной жизни. В последние годы возрос интерес к идентификации и анализу токсичных веществ, поступающих в окружающую среду в результате хозяйственной деятельности человека.

В процессе анализа ксенобиотиков следует различать следующие основные этапы: экстракцию, разделение, идентификацию, количественное определение.

Для идентификации и количественного определения ксенобиотиков их необходимо выделить из биологических объектов, в составе которых они обычно содержатся в смеси с другими соединениями. Наиболее трудоемким этапом анализа ксенобиотиков является разделение.

Современные методы разделения. В основу современных методов разделения положены традиционные принципы седиментации, осаждения, экстракции, фильтрации, сорбирования, кристаллизации, перегонки, электролиза. Наиболее широкое распространение получили хроматографические методы разделения.

Хроматография - это процесс, при котором исследуемая смесь веществ перемещается в системе двух фаз, одна из которых неподвижная (твердая), а другая подвижная (жидкость, газ). В основе хроматографического разделения лежит неравномерное распределение веществ в смеси между подвижной и неподвижной фазами, обусловленное их различным сродством к этим фазам и разной скоростью диффузии в этих фазах.

В зависимости от причин и характера сорбционного взаимодействия выделяют следующие методы хроматографического разделения: адсорбционная хроматография, ионная хроматография, гель-хроматография, аффинная хроматография.

Адсорбционная хроматография основана на поверхностном взаимодействии веществ на границе двух фаз (твердая-жидкая, твердая-газообразная).

Ионообменная хроматография базируется на электростатическом взаимодействии диссоциирующих на ионы веществ с неподвижной фазой (ионообменником), частицы которого обмениваются своими ионами с подвижной фазой (раствором).

Гель-хроматография основана на различной способности молекул веществ, с разной молекулярной массой, диффундировать в гелеобразном растворе (геле).

Аффинная хроматография базируется на различиях сродства веществ подвижной фазы с неподвижной, что приводит к различиям в соотношении скоростей двух противоположных процессов: адсорбции и десорбции.

По типу используемых неподвижных фаз хроматографические методы делятся на бумажную, тонкослойную, колоночную хроматографии.

По типу используемых подвижных фаз хроматографические методы делятся на следующие виды: газовые, жидкостные и газожидкостные.

Электрофорез - метод, предназначенный для разделения химически сходных соединений, основанный на физическом принципе различной скорости перемещения молекул, несущих разный по величине и знаку заряд. Молекулы, имеющие одинаковые по величине и знаку заряды, но разную массу, или разную степень сродства к среде, или разное значение оптимума рН среды, будут двигаться в одном направлении электрического поля, но также с разной скоростью. Белки, например, как амфотерные соединения, будут двигаться в разных направлениях (к аноду и катоду) и с разной скоростью в зависимости от знака заряда, его величины и рН среды. Электрофорез может осуществляться в разных средах: в геле, на бумаге, в растворе.

Противоточное разделение позволяет разделить смеси соединений на отдельные компоненты, используя различия по относительной их растворимости в двух несмешивающихся фазах.

Техника хроматографического разделения в тонком слое.

На хроматографической пластинке с тонким слоем сорбента отмечают стартовую линию на расстоянии 1-1,5 см от нижнего края. После этого микропипеткой на середину стартовой линии наносят определенный объем экстракта пробы в одну точку так, чтобы диаметр пятна не превышал 10мм. Экстракт наносят осторожно, чтобы не нарушался слой сорбента. Справа от пятна пробы на расстоянии 1,5 - 2см таким же образом наносят стандартный раствор, содержащий 10мкг препарата.

Пластинку краем со стартовой линии опускают в подвижный растворитель, предварительно налитый на дно хроматографической камеры так, чтобы пластинка не погружалась более чем на 0,5см. Камеру плотно закрывают стеклянной крышкой. После того, как растворитель поднимется на высоту 10см, пластинку вынимают из камеры и оставляют на несколько минут на открытом воздухе под тягой

для испарения растворителя. Далее на пластинку распыляют проявляющий раствор.

Качественное определение проводят путем сравнения проявившихся после разделения пятен пробы и стандартных растворов с учетом величины R_f . Величина R_f - отношение расстояния от стартовой линии до центра пятна вещества (радиус) к расстоянию от стартовой линии до фронта (линия, до которой доходит растворитель).

РАЗДЕЛ 1

Идентификация (обнаружение) ксенобиотиков

Для идентификации ксенобиотиков можно применять традиционные методы анализа органических и неорганических веществ, в частности широко используемые цветные химические реакции.

Наиболее широкое применение цветные реакции нашли при использовании фотометрических методов и тонкослойной и бумажной хроматографии.

Анализ основан на цветных реакциях с реагентами (одним или несколькими) на активные химические группы или отдельные химические элементы в их составе. Различают специфические и неспецифические реагенты.

Специфические реагенты — это соединения, дающие определенную цветную реакцию при взаимодействии с соответствующими химическими группами.

Органические кислоты, обнаруживают по наличию карбоксильной группы, спирты, в том числе и многоатомные, — по спиртовой, кетоны — по кетонной, эфиры — по эфирной, амиды — по амидной, амины, в том числе и полиамины, — по аминной, фенолы — по наличию непредельного гидроксильного фенольного кольца в составе их молекул, фосфорорганические соединения — по наличию фосфатной группы, хлорсодержащие пестициды — по наличию атомов хлора.

Основные виды цветных химических реакций:

- Для обнаружения многоатомных спиртов и гликолей используют тетраацетат свинца. Образуются светлые пятна на коричневом фоне хроматограммы.
- На аминокислоты и другие алифатические и ароматические амины используют нингидрин, при этом они обнаруживаются на хроматограмме в виде сине-фиолетовых пятен.

- Фенолы проявляются с диазотированным п-нитроанилином с желтой или оранжевой окраской. На соединения фосфора устойчивое темно-синее окрашивание дает молибдат аммония.
- Гетероциклические соединения с п-аминобензойной кислотой в смеси с цианохлоридом калия дают окрашивание красного цвета, формальдегид в солянокислом растворе дает желто-коричневое окрашивание с трихлористым железом.
- Нитросоединения с альфанафтиламином дают оранжевую окраску, с реактивом Грисса — малиновую.
- Карбонильные соединения, содержащие свободную карбонильную группу, дают желтую окраску с 2, 4-динитрофенилгидразином.
- Стероиды с динитробензолом дают красно-фиолетовую окраску, с тетразолиевым синим образуют вещества синего или фиолетового цвета.
- Растворы серосодержащих соединений обесцвечиваются при добавлении йодно-азидного реагента.

Неспецифические реагенты используются для цветных реакций на ксенобиотики разных классов независимо от специфичности их химического состава.

- Бромкрезоловый зеленый или бромтимоловый синий в смеси с гидроксидом натрия дают желтое окрашивание со всеми кислыми органическими соединениями.
- Нитрат серебра в смеси с аммиаком образует с углеводородами УФ-флуоресцирующие соединения.
- Пары йода кристаллического растворяются в большинстве органических соединений, окрашивая их в коричневый цвет.
- Фосформолибденовая кислота вступает в цветную реакцию с большим числом классов органических соединений, образуя темно-голубое окрашивание, устойчивое в течение очень длительного времени.
- Перманганат калия, подкисленный серной кислотой, дает коричневое окрашивание с органическими соединениями.

Работа №1. Идентификация катионов тяжелых металлов по цветным химическим реакциям

Принцип метода. Метод основан на способности некоторых органических и неорганических реагентов образовывать с катионами металлов осадки или окрашенные комплексные соединения.

Цель работы: определить в какой из представленных пробирок находятся катионы Cu^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} .

Материалы и оборудование: штатив для пробирок, пронумерованные пробирки, лабораторный штатив, стеклянные капилляры, хроматографическая пластина *Sorbfil*, хроматографическая камера, чашка петри, пинцет, фильтровальная бумага, сушильный шкаф.

Реактивы: 0,01% водные растворы нитрата никеля, нитрата кобальта, хлорида железа, хлорида меди, 10% водный раствор гексацианоферрат (II) калия $K_4[Fe(CN)_6]$, ацетон, соляная кислота (3 и 6 М растворы).

Ход работы.

1. Провести активацию хроматографических пластинок. Для этого пластинку помещают на 10 минут в 6М раствор соляной кислоты, промывают дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу при $t = 100^\circ C$.
2. Разметить хроматографическую пластину. Для этого карандашом провести линию старта в 1 см от края пластинки, в 5 см от линии старта провести линию фронта.
3. Из полученных у преподавателя пробирок, капилляром на линию старта наносится пятно исследуемого раствора диаметром 0,5 – 1 см.
4. После того, как исследуемые растворы подсохнут, пластина помещается в хроматографическую камеру, на дно которой залито 0,5 см элюента (ацетон – 3М соляная кислота в соотношении 8,25:1).
5. Когда элюент достигнет линии фронта выньте пластину из камеры пинцетом и подсушите в токе воздуха.
6. Налейте в чашку Петри проявляющий реагент – гексацианоферрат (II) калия. Поместите в него пластинку на 20-30 секунд, а затем просушите в вытяжном шкафу.
7. Используя полученные хроматограммы определите в какой из пробирок какие катионы находились. При этом известно, что в соединении с $K_4[Fe(CN)_6]$ катионы дают следующую окраску: Cu^{2+} - оранжевую, Fe^{3+} - синюю, Co^{2+} сиреневую, Ni^{2+} - желтую.

Работа №2. Идентификация ксенобиотиков с использованием специфических и неспецифических реагентов

Цель работы: при помощи специфических и неспецифических реагентов идентифицировать неорганические и органические ксенобиотики.

Материалы и оборудование: пробирки, штатив для пробирок, пипетки, груша резиновая, растворы химических реактивов, спиртовка.

Реактивы: фенол-0,1 % водный раствор, хлорное железо-0,5 % водный раствор, эфиры азотной кислоты (нитраты) -1% водный раствор, дифениламин - 0,2 % раствор в концентрированной серной кислоте, нитрозосоединения (нитриты) - 0,5 % водный раствор, амины (нафтиламин) - 0,1 % раствор в 3 % уксусной кислоте, янтарная кислота 1 % водный раствор, нингидрин - 0,3 г в 100 мл n-бутанола + 3 мл ледяной уксусной кислоты, молибдат аммония - 1 % водный раствор, хлористое олово и фосфат калия - 1 % раствор в 10 % растворе соляной кислоты, реактив Грисса - 4 % раствор в 8 % растворе уксусной кислоты, лакмусовая бумажка.

Ход работы

1. Полученные у преподавателя растворы неизвестных веществ идентифицировать по цветным реакциям с неспецифическими реагентами. Для выполнения задания одну каплю ксенобиотика последовательно из каждой пробы поместить на предметное стекло и подсушить над пламенем спиртовки. После этого нанести на предметное стекло в тоже место пипеткой капельку концентрированной серной кислоты и подогреть над пламенем спиртовки.
2. Повторить задание, заменив концентрированную серную кислоту кристаллическим йодом. Для этого предметное стекло с подсушенным мазком раствора ксенобиотика поместить над химическим стаканом с кристаллическим йодом, а затем поместить все вместе в эксикатор и плотно закрыть крышкой со шлифом. Работу проводить только под тягой в вытяжном шкафу. Полученные результаты занести в таблицу (табл. 1).

Таблица 1 Результаты опытов с неспецифическими реагентами

№ пробирки	Неспецифический реагент		Вывод
	Серная кислота	Йод	
1			
2			
3			
4			

3. После того, как ксенобиотики были разделены на органические и неорганические, проводится идентификация веществ при помощи специфических реагентов (табл.2). Для проведения указанного

анализа необходимо взять пипеткой 1 мл исследуемого раствора и прилить в отдельную пробирку. Далее в каждую пробирку добавить несколько капель реагента. По цветным реакциям исследуемого раствора со специфическими реагентами установить наличие соответствующими химически активных групп и определить класс веществ, к которому относится исследуемый ксенобиотик. Аналогичный анализ провести с каждым из веществ, представленных в задании.

Таблица 2 Цветные реакции на отдельные классы веществ

№ п/п	Класс химического соединения	Специфический реагент	Цветная реакция
1	Органические кислоты	Лакмусовая	Красная
2	Амины	Нингидрин	Розовая
4	Нитриты	Реактив Грисса	Желтая
5	Нитраты	Дифениламин	Желтая, синяя
6	Фенолы	Хлорное железо	Фиолетовая
7	Фосфаты	Молибдат аммония + Sn	Голубая

4. Результаты опытов записать в таблицу аналогично таблице 1.

Работа № 3. Качественное определение ксенобиотиков в растительном материале на примере определения алкилрезорцинолов в зерне ржи

В наружных оболочках зерна ржи и тритикале сосредоточены вещества фенольной природы – 5-алкилрезорцинолы, обладающие токсическим действием на животный организм. При использовании корма, в котором доля зерна ржи составляет 20% и выше, животные снижают прирост массы и прекращают рост.

Принцип метода. Этот метод основан на чувствительной специфической реакции 5-алкилрезорцинола с diaзониевой солью (прочный синий Б), в результате которой образуется красное окрашивание. Чувствительность реакции на бумаге 0,06-0,01 мкг 5-алкилрезорцинола.

Цель работы: идентифицировать ксенобиотик в растительном материале (зерно); провести экспрессдиагностику семян различных сортов ржи на наличие 5-алкилрезорцинола.

Реактивы и материалы: 0,5% водный раствор diazonиевой соли, ацетон (ч.д.а.), беззольные фильтры, образцы семян, микропипетки.

Ход работы

1. Взять по 10 шт. совершенно зрелых семян каждого сорта ржи, поместить в пробирки, прилить по 3 мл ацетона и встряхивать при комнатной температуре в течение 2 часов на приборе для взбалтывания.
2. После встряхивания при помощи микрокапиллярной пипетки отобрать из каждой пробирки по 2 мкл экстракта и нанести на беззольный фильтр, предварительно разлинованный на отдельные поля (квадраты) по числу образцов семян.
3. Подсушить нанесенные пробы экстракта в токе воздуха.
4. Опрыскать фильтр раствором diazonиевой соли до слабого, но равномерного увлажнения. Полное стабильное окрашивание наступает через 10 минут.
5. По интенсивности окраски судят о возможности использования семян в качестве посевного материала. Образцом сравнения служат семена озимой пшеницы сорта Fema с бедным содержанием резорцинолов.
6. Результаты оформить в виде таблицы.

Таблица - Результаты исследований семян различных сортов ржи на содержание 5-алкилрезерцинолы

Вариант опыта	Интенсивность окраски	Вывод

Контрольные вопросы

1. Что такое идентификация?
2. Для чего разработаны цветные реакции на ксенобиотики ?
3. Какие виды реагентов на ксенобиотики вам известны ?
4. Какие виды специфических и неспецифических реагентов использовались в проведенных работах?
5. Какие методы использовались для идентификации веществ?
6. Опишите метод противоточного разделения веществ.
7. Что такое хроматография? Виды хроматографии.
8. Какие явления лежат в основе электрофореза?
9. Что означает и как определяются значения параметра Rf?

РАЗДЕЛ 2

Количественное определение ксенобиотиков

Известно, что содержание ксенобиотиков в живом организме может значительно превышать их концентрации в окружающей среде. Это объясняется накопительными свойствами и биотрансформацией ксенобиотиков в живых системах.

Биотрансформация чужеродных соединений может происходить двояко: в одном случае в результате метаболических реакций в организме происходит обезвреживание ксенобиотиков (детоксикация), в другом, наоборот, при их превращениях образуются более токсичные вещества (токсификация). В этой связи наряду с идентификацией возникает необходимость и количественного определения содержания ксенобиотиков в клетке, ткани и организме в целом.

Для количественного анализа ксенобиотиков в биологических объектах широко используются различные оптические методы.

- *Колориметрические и спектрофотометрические методы* основаны на оптических свойствах окрашенных с помощью специфических цветных реакций различных классов соединений в монохроматическом проходящем свете по степени поглощения или пропускания светового пучка.

- *Методы сканирующей денситометрии* базируются на оптических свойствах окрашенных веществ с помощью цветных реакций в отраженном монохроматическом свете. Количественное определение производится по разнице между интенсивностью падающего и отраженного света.

- *Методы лазерной спектроскопии* основаны на тех же свойствах окрашенных веществ, что и два предыдущие, только для анализа используется лазерный пучок света.

- *Радиографические методы* основаны на флуоресцентных и радиоактивных свойствах веществ, которые количественно регистрируются на фотопленках или с помощью специальных счетчиков.

Кроме выше перечисленных методов, часто используют объемные методы, в частности титрометрический.

Работа №4. Количественное определение содержания хлоридов и сульфатов в природных водах

Воды различных источников – рек, озер, колодцев, прудов, используемые для орошения – это растворы сложного состава с

содержанием растворимых веществ от нескольких миллиграмм до сотен миллиграмм на литр. Большое количество некоторых растворимых в воде солей может прямо или косвенно оказывать вредное воздействие на растительные и животные организмы, а также на человека (таблица 1).

Таблица 1 - Предельно-допустимые концентрации (ПДК) вредных веществ в воде водоемов, мг/л

Вещество	Хозяйственно-питьевые водоемы	Рыбохозяйственные водоемы
Мочевина	0,1	0,05
Нитраты	45	40
Сульфаты	500	100
Хлориды	350	300
Медь	1	0,004
Бор	0,5	0,1
Аммиак	2 (по азоту)	0,05
Карбофос	0,05	отсутствует
Хлорофос	0,05	отсутствует
Фосфамид	0,03	0,0014
Феназон	2	0,01

Цель работы: произвести анализ воды на содержание хлоридов и сульфатов.

Оборудование и реактивы: Конические колбы на 100 и 200 мл, пробирки, мерный цилиндр, бюретки, пипетки, спиртовка (или водяная баня), исследуемая вода, раствор 10% AgNO_3 , раствор 0,1 н AgNO_3 , 30% раствор H_2O_2 , 10% раствор K_2CrO_4 , индикаторная бумага (фенолфталеиновая или универсальная), 10% раствор HCl , 10% раствор BaCl_2 , секундомер.

Задание 1 Аргентометрическое определение содержания хлоридов

Принцип метода. Метод основан на титрометрическом осаждении хлоридов в нейтральной или слабощелочной среде нитратом серебра в присутствии хромата калия (K_2CrO_4) в качестве индикатора. После осаждения хлорид-ионов, избыток ионов серебра образует оранжево-красный осадок хромата серебра. Хлориды должны определяться при $\text{pH}=6-10$, в противном случае воду необходимо нейтрализовать по фенолфталеину.

Влияние сероводорода, а также цветность воды можно устранить кипячением воды с перекисью водорода. Проведению анализа могут мешать ортофосфаты в количестве более 25 мг/л и железо — более 10 мг/л.

Ход работы

1. Исследуемую пробу воды (70-100 мл) кипятят в течение 20-30 минут в присутствии 1-2 мл 30% перекиси водорода, а затем дают остыть.
2. В пробирку отбирают 5 мл пробы и добавляют 3 капли 10% раствора нитрата серебра. Приблизительное содержание хлоридов определяют по осадку или мути (табл. 2).

Таблица 2 - Оценка приблизительного содержания хлоридов

Характер осадка	Концентрация хлоридов, мг/л	Объем раствора для точного анализа, мл
Слабая муть	1-10	50
Сильная муть	10-50	20
Образуются хлопья	50-100	10
Белый объемный осадок	более 100	5

3. После проведения предварительного анализа производится определение точного содержания ионов хлора. Для этого берут пробу воды согласно третьей колонке таблицы 2 и добавляют 1 мл 10% раствора K_2CrO_4 и титруют 0,01 н раствором нитрата серебра. Момент окончания титрования определяют по изменению окраски раствора (оранжево-красное окрашивание), так как по окончании осаждения ионов хлора азотнокислое серебро взаимодействует с хроматом калия.

По количеству нитрата серебра пошедшего на титрование судят о содержании хлорид ионов.

Вычисление результатов проводят по формуле:

$$X = \frac{0,3545 \cdot V_1 \cdot 1000}{V_2},$$

где X - количество хлорид ионов [мг/л]; V_1 - объем 0,01 н $AgNO_3$ пошедшего на титрование; V_2 - объем пробы взятой для точного

анализа; 0,3545 - количество хлорид ионов [мг/мл] соответствующее 1 мл 0,01 н раствора AgNO₃; 1000 - коэффициент перевода миллилитров на литры.

Результаты оформить в виде таблицы (табл. 3) и сделать вывод.

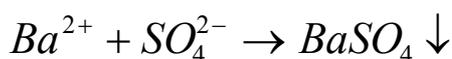
Таблица 3 - Результаты определения хлорид ионов

Объем 0,01 н AgNO ₃	Объем пробы, мл	Количество хлорид ионов, мг/л

Задание 2. Определение сульфат ионов (приближенное)

Концентрация сульфатов в воде водоемов — источников водоснабжения допускается до 500 мг/л. Они попадают в водоемы со сбросами различных сточных вод.

Принцип метода: Определение основано на осаждении сульфатов в кислой среде хлоридом бария в виде сульфата бария. Реакция идет по следующей схеме:



Приблизительное содержание ионов SO₄²⁻ в воде оценивается визуально по количеству выпадающего осадка (табл. 4).

Таблица 4 - Шкала оценки содержания SO₄²⁻

Появление осадка или белой мути	Содержание SO ₄ ²⁻ , мг/л
Через 5 сек.	120
—” — 7 сек.	96
—” — 10 сек.	84
—” — 15 сек.	72
—” — 20 сек.	60
—” — 30 сек.	48
—” — 45 сек.	36
—” — 60 сек.	30
—” — 85 сек.	24
—” — 120 сек.	18
—” — 300 сек	12

Ход работы

1. В пробирку пипеткой вливают 5 мл исследуемой воды, подкисляют 1-2 каплями 10% раствора HCl (для предотвращения образования $BaCO_3$) и приливают 1 мл 10% раствора хлорида бария (всей порцией); засекают время.
2. По таблице 4 оценивают содержание ионов SO_4^{2-} в воде, и делают выводы о её пригодности.

Работа № 5. Определение сульфидов и сероводорода методом фотоэлектроколориметрии

Сущность метода. Растворенные сульфиды и сероводород образуют с ионами свинца коллоидный сульфид свинца, коричневая окраска которого может быть использована для фотометрирования. Диапазон определяемых концентраций 0,1-2 мг/л сероводорода.

Мешающие влияния. Определению мешают окраска и мутность воды. Слабые окраски и муть можно компенсировать вычитанием оптической плотности пробы, обработанной аналогично тому, как она обрабатывается при определении, но с заменой раствора ацетата свинца одинаковым объемом щелочного раствора соли винной кислоты (2,5 г сегнетовой соли и 5 г NaOH растворяет в дистиллированной воде и дополняют объем водой до 100 мл).

Цель работы: методом фотоэлектроколориметрии определить содержание сульфидов в сточных водах

Аппаратура, реактивы и материалы.

1. Фотоэлектроколориметр.
2. Консервирующий раствор (едкий натр и глицерин), 4 г NaOH, 2,5 г тартрата натрия и калия (сегнетова соль) растворяют в 200 мл дистиллированной воды и смешивают с 800 мл глицерина.
3. Ацетат свинца, щелочной раствор: в дистиллированной воде растворяют 1 г $(CH_3COO)_2Pb \cdot 3H_2O$, 2,5 г тартрата натрия и калия (сегнетова соль) и 5 г NaOH и дополняют объем водой до 100 мл.
4. Основной стандартный раствор готовят растворением 0,1 г $Na_2S \cdot 3H_2O$ в 50 мл дистиллированной воды и добавлением 50 мл глицерина; содержание сульфидов определяют йодометрическим титрованием, затем раствор разбавляют так, чтобы концентрация H_2S была 0,01 мг/мл.

Ход работы

В бутылку, вместимость которой известна, помещают по 10 мл консервирующего раствора на каждые 100 мл пробы. Затем бутылку

заполняют до горлышка пробой, закрывают пробкой так, чтобы не осталось воздушных пузырей, и содержимое бутылки перемешивают переворачиванием. Анализ сульфидов проводят в день отбора проб.

К 100 мл консервированной пробы прибавляют 5 мл щелочного раствора соли свинца, смесь хорошо перемешивают и тотчас же измеряют оптическую плотность пробы, вычитывая поправку на холостой опыт с дистиллированной водой; по калибровочной кривой находят содержание сероводорода.

Построение калибровочной кривой. В ряд мерных колб на 100 мл вносят 0; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 и 20,0 мл рабочего стандартного раствора сульфата натрия, прибавляют по 10 мл консервирующего раствора и доводят до метки дистиллированной водой. Полученные растворы отвечают концентрациям 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 мг/л H_2S . После перемешивания растворы обрабатывают аналогично исследуемым пробам. Затем строят график зависимости оптической плотности от концентраций H_2S .

Содержание сульфид ионов и сероводорода X , мг/л, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{CV}{V - V_i},$$

где C – концентрация H_2S , найденная по калибровочной кривой, мг/л; V – вместимость бутылки для пробы, мл; V_i – объем прибавленного консервирующего реактива, мл.

Округление результатов: до 1 мг/л округляют до 0,05 мг, до 2 мг/л – до 0,1 мг.

Работа №6. Фотоэлектрокалориметрическое определение гербицида «Эптам» в почве

Принцип метода. Действующим началом эптама является S-этил-N-N-ди-n-пропилтиокарбанат. Метод основан на извлечении эптама из почвы путем перегонки с паром, разделении n-гексаном, гидролизе препарата до вторичного амина и колориметрическом определении последнего по образованию окрашенного в желтый цвет комплекса дитиокарбамината меди. Чувствительность метода 0,05 мг/кг почвы.

Цель работы: определить содержание исследуемого гербицида в почве методом фотоэлектроколориметрии.

Реактивы и оборудование: стандартный раствор н-гексана (100 мк/мл), ледяная уксусная кислота, концентрированная соляная кислота, безводный серноокислый натрий, окись алюминия для хроматографии II степени активности, концентрированная серная кислота, 1% раствор фенолфталеина, 50% раствор гидроксида натрия, раствор сероуглерода в бензоле (1 : 20 по объему), медно-аммиачный реактив (1 г серноокислой меди растворяют в 5 мл воды и объем доводят до 250 мл концентрированным раствором аммиака), дистиллированная вода, делительные воронки, колбы, мерные пипетки, фильтр Шотта №2, цилиндры и пробирки с притертыми пробками, водяная баня, термометр, водоструйный насос, колба Бунзена, прибор для перегонки с водяным паром, фотоэлектроколоримент.

Ход работы

1. 200 г почвы помещают в широкогорлую двухлитровую колбу, заливают 0,5 литрами дистиллированной воды, приливают 12 мл ледяной уксусной кислоты и перегоняют с паром.
2. Собирают 200 мл дистиллята (желательно чтобы время отгона не превышало 1 часа). Полученный дистиллят переносят в делительную воронку на 300 мл, прибавляют две капли концентрированной соляной кислоты и экстрагируют эптам из водной фазы двумя порциями н-гексана по 15 мл.
3. Для очистки гексановый экстракт (после удаления водной фазы) из делительной воронки количественно пропускают через фильтр Шотта №2, заполненный безводным серноокислым натрием (высота слоя 1 см) и окисью алюминия (высота слоя 2-3 см). С помощью водоструйного насоса отсасывают экстракт в колбу Бунзена или круглодонную широкогорлую пробирку с отводом.
4. Количественно переносят экстракт в широкую пробирку с притертой пробкой и приливают 1 мл концентрированной серной кислоты. Плотнo закрывают и энергично взбалтывают 2 мин.
5. Открывают пробирки и помещают их в водяную баню с температурой 85°C на 30 минут для гидролиза эптама. Содержимое пробирок периодически встряхивают.
6. После проведения гидролиза пробирки охлаждают в ледяной воде.
7. При помощи пипетки удаляют слой растворителя (небольшое количество растворителя определению не мешает), оставляя серноокислый слой в пробирке.
8. Кислоту в пробирках разбавляют водой до объема 20 мл, добавляют две капли раствора фенолфталеина и осторожно нейтрализуют 50%-ным раствором NaOH до появления устойчивой розовой окраски.

9. Жидкость из пробирки переливают в цилиндр вместимостью 25 мл с притертой пробкой (пробирку ополаскивают 2-3 мл воды). Температура жидкости в цилиндре должна быть в пределах 20-25°C.
10. Прибавляют в цилиндр 1 мл медно-аммиачного реактива и 7 мл раствора сероуглерода в бензоле. Закрывают пробкой и встряхивают 4 минуты для развития окраски верхнего бензольного слоя.
11. После 6-минутного отстаивания отбирают пипеткой окрашенный в желтый цвет верхний слой и фильтруют его через воронку заполненную 2 г безводного сернокислого натрия. Фильтрат собирают в узкую пробирку с притертой пробкой.
12. Оптическую плотность окрашенной жидкости измеряют на фотоэлектроколориметре при толщине слоя 10 мм и синем светофильтре. Раствором сравнения служит бензол.

Построение калибровочного графика.

Для построения калибровочного графика (10-200 мкг) в пробирки с притертыми пробками вносят 0,1-2 мл стандартного раствора препарата с интервалом в первых двух пробирках в 0,1 мл, в последующих в 0,2 мл. Объем жидкости во всех пробирках доводят гексаном до 2 мл. В контрольную пробирку вносят 2 мл гексана. Далее анализ ведут, как описано выше. На оси ординат откладывают оптическую плотность, а на оси абсцисс – количество препарата.

Расчет содержания эптама в почве находят по формуле:

$$X = A / P,$$

где X – содержание эптама в пробе, мг/кг; A – количество эптама, найденное по калибровочному графику, мкг; P – масса пробы, г.

Контрольные вопросы

1. Что такое детоксикация и токсификация?
2. Критерии оценки токсичности ксенобиотиков.
3. Какие методы применяют для количественного определения ксенобиотиков?
4. В чем сущность колориметрического и спектрофотометрического методов?
5. Этапы определения эптама в почве?

II. ДЕЙСТВИЕ КСЕНОБИОТИКОВ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ

РАЗДЕЛ 3

Влияние ксенобиотиков на физико-химические свойства протоплазмы

Протоплазма — основное содержимое любой клетки, своеобразный реактор метаболических реакций. С физико-химической точки зрения протоплазму можно рассматривать как сложную коллоидную систему, обладающую всеми свойствами и признаками макромолекул в растворе. Физико-химические свойства протоплазмы определяют процессы жизнедеятельности клетки.

Движение протоплазмы — один из чувствительных показателей жизнедеятельности клетки. Движение протоплазмы в растительных клетках часто называют циклозом.

Рассмотрим классификацию типов движения протоплазмы по Камия:

Колебательное движение — одно из самых неупорядоченных видов движения. Некоторые частицы движутся по периферии, другие по направлению к центру клетки, а часть находится в покое. Это движение неустойчивое, имеет случайный характер, однако оно отличается от броуновского. Броуновское движение вызывается тепловым колебанием молекул, движение протоплазмы — энергией, освобождаемой в процессе метаболизма.

Циркуляционное движение — характерно для клеток, имеющих протоплазматические тяжи, пересекающие центральную вакуоль. Оно легко обнаруживается в крупных клетках волосков *Cucurbita*, *Tradescantia*, *Gloccinia*, водоросли *Spirogira*, клетках паренхимы лука, ягодах. Органоиды и гранулы крахмала движутся по поверхности или внутри протоплазмы, прилегающей к стенке, а также в тяжах, пересекающих вакуоль. При данном типе движения гранулы разных размеров движутся с различной скоростью, направление непостоянно и часто меняется.

Ротационное движение — это тип наиболее упорядоченного движения протоплазмы, часто встречающийся в клетках водных растений (*Elodea*, *Vallisneria*, харовые водоросли), в клетках корневых волосков и пыльцевых трубок многих растений.

Характерной чертой данного типа движения является перемещение протоплазмы только по периферии клетки, подобно приводному ремню. У харовых водорослей слой протоплазмы,

прилегающей к клеточной стенке, где сосредоточены хлоропласты, неподвижен, движется глубже лежащий слой протоплазмы.

Фонтанирующее движение — представляет собой промежуточный между циркуляционным и ротационным тип движения протоплазмы. Этот тип движения характеризуется тем, что протоплазма в толстом центральном тяже движется к вершине или к основанию, а пристенный слой протоплазмы движется в обратном направлении. Фонтанирующее движение можно наблюдать в корневых волосках (*Trianea*, *Hydrocharis* и др.) и в пыльцевых трубках многих растений.

Челночное движение — ярко выраженный тип движения протоплазмы, характеризующийся высокой скоростью, большим объемом движущейся протоплазмы, сопровождается изменением очертаний одноклеточных организмов, что обуславливает их амeboидное движение.

Скорость циклоза является количественной характеристикой движения протоплазмы и в значительной степени связана с ее физико-химическими свойствами. Существует несколько методов измерения скорости движения протоплазмы: метод сравнения, фотографической регистрации, непосредственного измерения по скорости движения гранул и т.д.

Метод сравнения состоит в том, что сравнивается скорость движения протоплазмы со скоростью движения градуированной ленты, наблюдаемой через рисовальный аппарат.

Метод фотографической регистрации основан на отличиях оптических свойств гранул протоплазмы и гиалоплазмы, что позволяет фиксировать их перемещение на фотопластинках в виде черных полос.

Метод непосредственного измерения скорости движения гранул в протоплазме заключается в измерении расстояния, пройденного частицами протоплазмы в единицу времени при визуальном наблюдении под микроскопом.

Метод лазерной доплеровской спектроскопии измерения скорости циклоза основан на регистрации сдвига частоты лазерного излучения при рассеивании на движущихся частицах (эффект Доплера).

Вязкость, как и скорость движения протоплазмы, служит показателем физико-химического состояния протоплазмы клеток. В изменении вязкости протоплазмы находит отражение реакция организма на изменения внешних условий, в том числе и их химического состава. С физической точки зрения вязкость характеризует внутреннее трение жидкостной системы, возникающее при перемещении одного слоя относительно другого. Поэтому вязкость иногда называют внутренним трением. Количественно вязкость

выражают силой, которой достаточно для поддержания определенной скорости перемещения одного слоя относительно другого.

Существует ряд методов определения вязкости протоплазмы: плазмолитический, центрифужный, с помощью броуновского молекулярного движения.

Плазмолитический метод основан на том, что характер отделения протопласта от клеточной стенки в растворах плазмолитиков закономерно связан с вязкостью протоплазмы и качественно определяется в степени и форме плазмолиза.

Метод, основанный на измерении скорости броуновского движения частиц протоплазмы, дает количественные характеристики вязкости. Расчет вязкости протоплазмы проводится по следующей формуле:

$$\eta = 0,145 \cdot 10^{-16} \frac{T \cdot t}{r \cdot l^2 \cdot n},$$

где: n — число двусторонних проходов,
t — время подсчета числа проходов (с),
r — радиус частиц (см),
l — расстояние между штрихами окулярмикрометра (см),
T — абсолютная температура.

Центрифужный метод основан на законе Стокса. В этом случае сила гравитации заменяется центробежной силой, сообщаемой центрифугированием. В числитель формулы Стокса вводится множитель величины ускорения вращательного движения.

Работа №7. Влияние ксенобиотиков на скорость циклаза протоплазмы

Принцип метода. Метод основан на непосредственном измерении скорости движения гранул протоплазмы при визуальном наблюдении под микроскопом при помощи окуляр-микрометра.

Цель работы. Определить влияние различных ксенобиотиков на скорость циклаза.

Материалы и оборудование: растение элодеи, искусственная прудовая вода (ИПВ) - 0,1 мМ хлористого калия, 1,0 мМ хлористого натрия и 0,1 мМ хлористого кальция в 1 литре воды, 0,1мМ растворы фенола, трихлоруксусной кислоты, нитрита натрия, пестицидов фозалона и далапона, микроскоп, окуляр-микрометр, предметные и покровные стекла, пипетки, пинцет, скальпель, пробирки, секундомер.

Ход работы

1. С помощью объект-микрометра определяют цену деления окулярной линейки в микрометрах. Для этого на столик микроскопа кладут объект-микрометр, а в окуляр вкладывают окулярную линейку. Фокусируют выбранный объектив на делениях объект-микрометра и подсчитывают число делений объект-микрометра, соответствующее произвольно выбранному числу делений окулярной линейки. Цену делений окулярной линейки рассчитывают по формуле:

$$N = \frac{a \cdot 0,01}{b},$$

где N - число делений объект-микрометра,
0,01 - цена деления объект-микрометра,
b - число делений окулярной линейки,
a – число делений объект микрометра

2. Срезают верхушечный лист элодеи и помещают его на предметное стекло в каплю ИПВ на 20-30 минут, а затем проводят измерение скорости движения хлоропластов клеток находящихся в районе центральной жилки. Скорость циклоза определяют по времени прохождения хлоропластом 1-2 делений окулярной линейки.
3. Измерения повторяют не менее 5 раз. Из полученного ряда чисел определяют среднеарифметическое значение, по которому рассчитывают среднюю скорость движения (мкм/с), которая соответствует скорости движения протоплазмы.
4. Затем лист элодеи помещается в раствор ИПВ, содержащий 1,0 мМ одного из ксенобиотиков индивидуального задания, и проводится измерение скорости циклоза.
5. По окончании измерений исследуемый объект вновь помещается в контрольный раствор ИПВ, и спустя 30 минут снова измеряется скорость циклоза.
6. Процесс регистрации повторяется с другими представленными в индивидуальном задании вариантами. Результаты записать в таблицу.

Вариант задания	Расстояние пробега частицей, мкм	Время пробега частицей					Скорость циклоза, мкм/с
		1	2	3	4	5	

Работа №8. Определение влияния ксенобиотиков на вязкости протоплазмы

Принцип метода. Определение вязкости производят методом центрифугирования. Для сравнительных опытов определяют относительную вязкость. Мерой относительной вязкости могут быть:

- Число оборотов центрифуги, необходимые для одинакового смещения хлоропластов;
- Степень смещения хлоропластов при одинаковой продолжительности центрифугирования.

Цель работы: определить влияние различных ксенобиотиков на вязкость протоплазмы.

Материалы и оборудование: центрифуга, микроскопы, весы, кисточки, предметные и покровные стекла, центрифужные пробирки, стаканы, препаровальные иглы, элодея, сердцевина бузины, 1% раствор хромовой кислоты, 4% раствор формалина, 0,1 мМ растворы фенола и нитрита натрия, вода.

Ход работы

1. От веточки элодеи отделяют 18 листочков с мутовок, находящихся на расстоянии 4-5 см от верхушки побега, и помещают их на 15-20 минут в стаканы с водой и растворами ксенобиотиков (по 6 листочков в стакан).
2. С помощью кисточки помещают в стеклянные патрончики (можно использовать бузину) по 2 листочка элодеи вместе с несколькими каплями воды или раствора ксенобиотика, в зависимости от варианта опыта. Все листочки должны быть ориентированы верхушкой в одну сторону.
3. Патрончики переносят в центрифужные пробирки (всего должно быть 9 пробирок – по 3 на каждый вариант опыта), которые уравнивают на весах, приливая в них по каплям воду или соответствующие растворы.
4. Помещают пробирки в центрифугу и центрифугируют в течение 10 минут. Первые три пробирки, из каждого варианта опыта, центрифугируют со скоростью 1000 об/мин., вторые – 2000 об/мин., третьи – 3000 об/мин.
5. После центрифугирования листочки быстро, чтобы не изменилась картина смещения хлоропластов, вынимают из патрончиков с помощью препаровальной иглы и переносят в фиксирующую смесь, состоящую из 1%-ного раствора хромовой кислоты и 4%-ного раствора формалина, смешанных в отношении 5 : 2.

6. После фиксирования листья промывают и переносят на предметное стекло в каплю воды. Производят наблюдение под микроскопом, отмечают наличие смещения хлоропластов и его выраженность.
7. При необходимости скорость центрифугирования увеличивают до 4000-5000 об/мин.
8. Результаты работы оформляют в виде таблицы.

Вариант опыта	Наличие смещения и его выраженность					Выводы
	1000 об/мин	2000 об/мин	3000 об/мин	4000 об/мин	5000 об/мин	

Контрольные вопросы

1. Какие известны типы движения протоплазмы?
2. Что такое колебательное и циркуляционное движение?
3. Какой тип движения характерен для протоплазмы клеток элодеи?
4. Скорость циклоза, что она характеризует?
5. Какие существуют методы определения вязкости протоплазмы?

РАЗДЕЛ 4

Мембранотропные свойства ксенобиотиков

Первичной мишенью биологического действия ксенобиотиков на клеточном уровне является плазматическая мембрана. В основе взаимодействия ксенобиотиков с мембранами клеток и наступающих в результате этого функциональных сдвигов лежит модификация мембранных структур (или систем, непосредственно связанных с происходящими на мембранах процессах). Говоря о мембранотропном действии ксенобиотика (или любого химического реагента), имеют в виду прямую или косвенную (опосредованную) модификацию мембранных структур.

В первом приближении можно выделить следующие типы мембранотропности ксенобиотиков.

Во-первых, мембранная рецензия. В этом случае вещество не проникает внутрь клетки, а избирательно накапливается в мембранах или специфически связывается. Таким образом, можно говорить о прямом мембранотропном эффекте.

Во-вторых, вещество стимулирует или угнетает биосинтетические мембранные процессы (активность ферментов, скорость синтеза белков,

липидов и т.д.). Первичность и опосредованность эффекта оценивается конкретно в каждом случае.

В-третьих, изменение под влиянием ксенобиотиков транспортных свойств мембраны. Мембранотропность такого рода может быть прямой опосредованной.

В-четвертых, мембранотропность ксенобиотиков может определяться функциональным взаимодействием с веществами, механизм действия которых на мембранном уровне хорошо известен.

Мембранотропное действие ксенобиотика в значительной мере связано с его поверхностной активностью, т.е. наблюдаемые эффекты определяются способностью некоторых структур молекулы веществ внедряться в липидный слой мембраны. Соединения, молекулы которых частично гидрофильны и частично гидрофобны, называются амфифильными. Типичными представителями амфифильных соединений являются поверхностно-активные вещества (ПАВ).

Благодаря амфифильным свойствам молекулы ПАВ будут встраиваться в бислой биологической мембраны своими неполярными углеводородными цепями, оставляя снаружи в водном растворе полярную часть. Адсорбируясь на поверхности, они способны в значительной мере изменять физико-химические свойства мембран и, в первую очередь, ее проницаемость к различным веществам. Характер вызываемой модификации мембранной проницаемости зависит от вида и концентрации химического соединения.

Работа №9. Влияние ксенобиотиков на проницаемость биологических мембран

Цель работы: Из представленных в задании ксенобиотиков выявить те, которые изменяют проницаемость биологических мембран (плазматическим методом на примере окрашенных антоцианом клеток нижнего эпидермиса листьев традесканции или клеток верхнего эпидермиса лука репчатого).

Материалы и оборудование: 1М водные растворы ксенобиотиков разных классов, 1М раствор сахарозы, раствор метиленового красителя, микроскоп, пипетки, пробирки, листья традесканции (можно использовать лук репчатый).

Ход работы

1. В пронумерованные пробирки соответственно вариантам опыта налить по 1 мл 1 М раствора сахарозы.

2. Начиная со второй пробирки, добавить несколько капель ксенобиотиков соответственно варианту опыта. Растворы в пробирках перемешать взбалтыванием.
3. В каждую пробирку погрузить полностью в раствор по одному срезу эпидермиса лука или традесканции и оставить на 30 минут, после чего срезы рассмотреть под микроскопом и описать наблюдаемую картину плазмолиза.
4. Результаты записать в таблицу.

№ п/п	Содержимое пробирок	Наличие плазмолиза	Рисунок

5. Сделать выводы в соответствии с контрольными вопросами.

Контрольные вопросы

1. Что является первичной мишенью действия ксенобиотика?
2. Дайте определения мембраноактивных структур?
3. Что такое мембранотропные эффекты, чем они вызываются?
4. Объясните связь между явлением плазмолиза и мембранотропными свойствами исследуемых ксенобиотиков.
5. Сравните исследуемые ксенобиотики по степени их влияния на проницаемость мембран.

РАЗДЕЛ 5

Действие ксенобиотиков на мезоструктуру листьев

Биологическое действие ксенобиотиков может проявляться в функционально-структурных сдвигах на разных уровнях организации: субклеточном, клеточном, тканевом и т.д. Фотосинтетическая система растений одна из наиболее чувствительных к изменениям физико-химических факторов внешней Среды. При воздействии ксенобиотиков на растение могут происходить изменения в функционировании ЭТЦ, фотоактивных центров, в структуре хлоропластов и клеток мезофилла листа. В зависимости от химической природы и концентрации ксенобиотики могут вызывать различный биологический эффект.

Фотосинтезирующая часть листа у высших растений анатомически представлена двумя или одним слоем столбчатой и губчатой паренхим (мезофилла). Обе эти ткани легко просматриваются под микроскопом на

срезах листьев растений и являются, таким образом, хорошим объектом для изучения биологического действия ксенобиотиков на тканевом уровне организации растительного организма.

В качестве объекта для изучения действия ксенобиотиков на мезоструктуру листьев используются водные растения (валлиснерия, элодея) или проростки ячменя, выращенные в условиях различного химического содержания ксенобиотиков. В процессе выполнения работы необходимо последовательно определить в разных вариантах объем мезофилла, объем клеток столбчатой и губчатой паренхим и относительный объем мезофилла. Относительный объем мезофилла показывает степень развития суммарной поверхности клеток мезофилла в расчете на единицу площади листьев. Этот показатель не имеет размерности, он представляет собой индекс развития фотосинтетической ткани и характеризует потенциальную фотосинтетическую активности листьев растений.

Работа №10. Определение относительного объема мезофилла листа

Цель работы: Определить относительный объем мезофилла листа у растений, выросших на средах в присутствии ксенобиотиков разных классов.

Приборы и материалы: проростки ячменя или веточка элодеи выращенные на средах с добавлением растворов 0,1 мМ ксенобиотиков (китетин, фенол, диметилсульфоксид), тургомер, лезвие.

Ход работы

1. Срезать листочек элодеи или ячменя. Произвести измерения его толщины с помощью тургомера. С этой целью большим пальцем левой руки отжимают пусковую кнопку тургомера, расположенную на боковой части прибора, размещают лист на нижнюю часть датчика, медленно отпускают пусковую кнопку и снимают показания стрелки по верхней шкале прибора.
2. Для статистической достоверности делают 5 - 10 замеров в разных участках листа и определяют среднюю величину.
3. Рассчитывают средний объем мезофилла, умножая его толщину на коэффициент Нобеля, равный 0,4. Результаты записывают в таблицу.

№ п/п	Название ксенобиотика	Измерение					Объем мезофилла
		1	2	3	4	5	

Работа №11. Определение объема клеток мезофилла

Цель работы: определить объем клеток мезофилла растений, выросших на средах в присутствии различных ксенобиотиков.

Материалы и оборудование: проростки ячменя или веточка элодеи выращенные на средах с добавлением растворов 0,1 мМ ксенобиотиков (трихлоруксусная кислота, фенол, нитрит натрия), сердцевина бузины или пенопласт, препаровальные иглы, предметные и покровные стекла, лезвие, окуляр-микrometer, микроскоп.

Ход работы

Определение производится анатомическим методом. Для этого вырезают диски из исследуемых растений вне средней жилки, закладывают их между кусочками сердцевины бузины и бритвой одним движением делают несколько поперечных срезов. Наиболее тонкие из них помещают на предметное стекло в раствор сахарозы (0,2-0,4 М). Изотоническая концентрация сахарозы подбирается экспериментально, так как она может отклоняться от указанных пределов. Далее проводят вакуумную инфльтрацию приготовленных срезов в растворе сахарозы в эксикаторе в течение 2-3 минут для удаления пузырьков воздуха из межклетников, а затем срезы рассматривают под микроскопом при большом увеличении (окуляр 10^{\times} , объектив 60^{\times}) и производят измерение размеров по 5-10 клеток столбчатой и губчатой паренхим с помощью окуляр-микromетра.

Для определения объема клеток столбчатой паренхимы мезофилла, имеющих продолговатую форму, необходимо вымерить большой (D) и малый (d) диаметры. Объем клеток рассчитать по формуле:

$$V = \pi \cdot \left(\frac{d}{2}\right)^2 \cdot D \text{ (мкм}^3\text{)}$$

Для клеток губчатой паренхимы, которые имеют округлую форму, которые имеют округлую форму, их объём рассчитывают по формуле:

$$V = \frac{4}{3} \cdot \left(\frac{D}{2}\right)^3 \cdot \pi \text{ (мкм}^3\text{)}$$

Результаты записать в таблицу.

Название ксенобиотика	Большой диаметр				Малый диаметр				Средний объем клеток
	1	2	3	4	1	2	3	4	

Сделайте вывод о влиянии ксенобиотиков на развитие клеток губчатой и столбчатой паренхимы.

Контрольные вопросы

1. Сравните данные, полученные в контрольном и опытных (в присутствии ксенобиотиков) вариантах: а) по величине относительного объема листьев; в) по величине объема отдельных клеток паренхимы.
2. Установите закономерность между наблюдаемыми эффектами и химическими свойствами используемых в работе ксенобиотиков.
3. Сравните результаты по мембранотропным свойствам ксенобиотиков (работа № 9) и с данными по их влиянию на мезоструктуру.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баславская С.С., Бородулина Ф.З., Гавриленко В.Д., Михайлевская О.Б. и др. Малый практикум по физиологии растений. – М.: Изд-во МГУ, 1973. – 84 с.
2. Методика биохимического исследования растений /А.И. Ермаков, В.В. Арасимович, Н.П. Ярош и др.; Под ред. А.И. Ермакова. – 3-е изд., перераб. и доп. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 430 с.
3. Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах и внешней среде / Отв. ред. М.А. Клисенко. – М.: Колос, 1977. – 368 с.
4. Практикум по агрохимии /Под ред. В.Г. Минеева. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 304 с.
5. Хроматография на пластинах. Методическое руководство по тонкослойной хроматографии для расширенного изучения курса химии /Под ред. К.И. Сакодынского . – Ереван, 1990. – 48 с.
6. Юрин В.М., Ермоленко Г.Л., Малашевич А.В. Методические указания к лабораторным занятиям по дисциплине «Основы ксенобиологии» для студентов специальности Н.04.01. Мн.:Изд-во БГУ, 1994. - 28с.

Учебное издание

Горнасталев Александр Анатольевич
Рыбальченко Анатолий Григорьевич

Практическое руководство к лабораторным работам по курсу «Основы ксенобиологии» для студентов IV курса биологического факультета, IV и V курсов факультета заочного обучения специальность Н 04.00.01. – “Биология”

Лицензия АВ № 357 от 12.02.99г.

Подписано в печать ____ 2001г. Формат 60×84 1/16

Бумага писч. №1. Печать офс. усл. п. л. Уч.-изд.л. 3,9.

Тираж 50 экз. Зак. Отпечатано на ротапринтере ГГУ им. Ф. Скорины, г. Гомель, ул. Советская, 104.