

Министерство образования и науки Российской Федерации
Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова
Кафедра физиологии человека и животных

БИОТЕСТИРОВАНИЕ И ВОДНАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ

Методические указания

*Рекомендовано
Научно-методическим советом университета для студентов,
обучающихся по направлению Биология*

Ярославль 2012

УДК 54.061(072)
ББК Е082я73
Б63

*Рекомендовано
Редакционно-издательским советом университета
в качестве учебного издания. План 2012 года*

Рецензент
кафедра физиологии человека и животных
Ярославского государственного университета
им. П. Г. Демидова

Составители: Е. В. Рябухина, Е. М. Фомичева

Биотестирование и водная токсикология: методические указания / сост. Е. В. Рябухина, Е. М. Фомичева; Ярослав. гос. ун-т им. П. Г. Демидова. – Ярославль: ЯрГУ, 2012. – 56 с.

Предназначено для студентов, обучающихся по направлению 020400.62 Биология (дисциплина «Биотестирование и водная токсикология», цикл БЗ), очной формы обучения.

УДК 54.061(072)
ББК Е082я73

© Ярославский государственный университет
им. П. Г. Демидова, 2012

ТЕМА 1. СИСТЕМА ВОДОПОЛЬЗОВАНИЯ

Водоем используется человеком для разных нужд: промышленных, сельскохозяйственных, питьевых, рекреационных, спортивных, бытовых, рыбохозяйственных. При этом степень загрязнения рек и водохранилищ повсеместно растет, а одновременно с этим падает их способность к самоочищению.

Исследования водной токсикологии направлены на разработку охранных мероприятий, обеспечивающих нормальный ход основных процессов кругооборота веществ в водоемах и важнейших биологических процессов формирования хорошего качества воды.

1.1. Виды водопользования

Нормирование качества воды осуществляется в настоящее время *для хозяйственно-питьевого, культурно-бытового, рыбохозяйственного* и в некоторых случаях для других видов водопользования. Основной принцип регламентации качественного состояния поверхностных вод заключается в установлении предельных значений основных показателей состава и свойств воды, соблюдение которых должно исключить ограничения или нарушения нормальных условий водопользования.

Виды использования водного объекта определяются в соответствии с Водным кодексом РФ.

❖ *К хозяйственно-питьевому* водопользованию относится использование водных объектов или их участков в качестве источника хозяйственно-питьевого водоснабжения, а также для водоснабжения предприятий пищевой промышленности.

❖ *К рекреационному* водопользованию относится использование водных объектов для купания, спорта и отдыха населения, а также иное использование водных объектов, находящихся в черте населенных мест.

❖ *Рыбохозяйственные водотоки*, водоемы или их отдельные участки, используемые для воспроизводства, промысла и миграции рыб и беспозвоночных, подразделяются на **три категории**:

- к *высшей категории* относятся: места нерестилищ; места массового нагула и зимовальные ямы ценных и особо ценных видов рыб и других промысловых водных организмов; водоохранные зоны хозяйств любого типа для искусственного разведения рыбы и водоохранные зоны (включая прибрежные водоохранные

полосы) садковых и прудовых хозяйств, расположенные на расстоянии не менее 500 м от водозабора или границы хозяйства;

- к *первой категории* относятся водные объекты, используемые для сохранения и воспроизводства ценных видов рыб, обладающих высокой чувствительностью к содержанию кислорода;
- ко *второй категории* относятся водные объекты, используемые для других рыбохозяйственных целей.

1.2. Нормы качества поверхностных вод. Система ПДК

1.2.1. Нормативы качества поверхностных вод

Нормативы качества поверхностных вод включают:

- Общие требования к составу и свойствам поверхностных вод для различных видов водопользования;
- Перечень нормируемых микробиологических показателей;
- Перечень предельно допустимых концентраций (ПДК) вредных веществ в воде водных объектов, используемых для хозяйственно-питьевых и коммунально-бытовых нужд населения;
- Перечень ПДК вредных веществ в воде водных объектов, используемых в рыбохозяйственных целях.

Таким образом, каждая **система водопользования** имеет свой набор **регламентирующих требований к качеству воды** по широкому кругу различных показателей:

- *отсутствие токсических веществ,*
- *присутствие нужных элементов в необходимом количестве и сочетании,*
- *отсутствие патогенных микроорганизмов, паразитов,*
- *ограничения по запаху, вкусу, цвету и пр.*

К этим показателям, большинство из которых при водопользовании контролируется постоянно, добавлены **ПДК – норматив содержания химического вещества в окружающей среде** (воде, воздухе, почве, пищевых продуктах).

Ранее в СССР, а теперь в Российской Федерации разрабатываются две системы ПДК: санитарно-гигиенические (ПДК_{с.г.}) и рыбохозяйственные (ПДК_{р.х.}). ПДК является верхней границей концентрации токсического вещества, которая допускается в среде без нарушения ее качества. Для водной среды эти нормативы должны выдерживаться предприятиями, начиная с расчетного (контрольного) створа (100 м ниже по течению от места сброса сточных вод).

1.2.2. Требования к разработке ПДК

При разработке санитарно-гигиенических ПДК учитывается кратковременное и долговременное действие веществ на *санитарное состояние водоемов*: кислородный режим, содержание способных разлагаться веществ, способность воды к загниванию и самоочищению, численность микроорганизмов и т. п. В последнее десятилетие определяется также *стабильность* загрязняющих веществ и их *кумулятивные свойства*.

Практическое введение ПДК с санитарно-гигиенических позиций обозначает, что нельзя использовать для пищевых целей воду из водоема, где превышает ПДК. А если водоем уже используется в качестве питьевого, то его нельзя загрязнять выше ПДК.

Наиболее жесткие требования устанавливаются для **рыбохозяйственных ПДК**. Токсичность многих веществ органической природы и прежде всего различных пестицидов для рыб и беспозвоночных гидробионтов в десятки и сотни раз выше, чем для теплокровных животных. Причина этих различий вполне очевидна: теплокровные животные имеют кратковременный контакт с загрязненной водой, поступающей в них порционно, а для гидробионтов – это среда постоянного обитания.

При разработке рыбохозяйственных ПДК необходимо изучать *стабильность* загрязняющего вещества, его *влияние на санитарное состояние водоема* (прозрачность, цветность воды, рН, кислородный режим, БПК и др.), *фитопланктон, водные микроорганизмы, зоопланктон, зообентос, икру, личинок и взрослых рыб, кумуляцию вещества рыбой, вкусовые качества рыбы*.

ПДК выступает в качестве стандарта, который должен быть научно обоснован, так как при завышенных концентрациях произойдет нарушение биологических процессов, а при заниженных – неоправданный перерасход средств и рабочих ресурсов для очистки стоков.

Несмотря на солидное экологическое обоснование и большую трудоемкость, система ПДК не обеспечивает нужды контроля качества вод в полном объеме по следующим причинам:

✓ ПДК разработаны примерно для 2000 веществ, в то время как количество сбрасываемых в водоемы насчитывает миллионы,

многие компоненты загрязнения воды реагируют друг с другом и характер реакций зависит от различных и изменяющихся условий окружающей среды;

✓ методы количественного химического анализа имеются только примерно для 10% веществ, на которые разработаны ПДК;

✓ крайне низкие значения ПДК большинства веществ лежат за пределом чувствительности аналитических методов;

✓ токсические свойства сложных по составу сточных вод не представляют собой сумму токсичности отдельных их компонентов. Большинство веществ при совместном воздействии выявляют эффекты синергизма и антагонизма.

Ввиду сложности, многообразия и неразделимости загрязняющих веществ, проблема загрязнений водоемов относится к тем, которые трудно изучить методом изолированного анализа и которые не поддаются детальному описанию. В связи с этим на основании только химического анализа и сравнения полученных данных с величинами ПДК не представляется возможным вычлениить наиболее опасные компоненты с целью последующей коррекции использования химических веществ в технологическом процессе.

Многие вещества обладают мутагенным, канцерогенным и тератогенным действием, об этих сторонах их влияния также невозможно судить только на основании химических анализов природных и сточных вод.

Поэтому во многих странах в контроле антропогенного загрязнения водной среды, наряду с химико-аналитическими методами, имеют место приемы, основанные на оценке состояния отдельных особей водных организмов и их сообществ, подвергающихся воздействию загрязненной среды.

1.3. Биологические методы оценки качества водной среды

Биологические приемы исследования качества водной среды разделяют на методы биоиндикации и биотестирования.

1.3.1. Биондикация

Биондикация предусматривает выявление уже состоявшегося или происходящего загрязнения водоема по функциональным показателям его обитателей или экологической характеристики сообществ организмов. Биоиндикация предусматривает таксономический анализ, анализ численности и состояния организмов,

обитающих на исследуемом участке водоема. Оценка качества воды как среды обитания гидробионтов (биоиндикация) проводится по следующим показателям:

- ✓ по фито- и зоопланктону – общая численность клеток, общее число видов, общая биомасса, численность основных групп, биомасса основных групп, число видов в группе, массовые виды и виды-индикаторы сапробности;

- ✓ по зообентосу и перифитону (по тем же показателям);

- ✓ по микробиологическим показателям;

- ✓ по макрофитам.

Несмотря на то что биоиндикация является основным методологическим приемом, используемым в биомониторинге поверхностных вод в системе ОГСНК, этому приему свойственны существенные недостатки. Прежде всего, изменения видового состава сообществ водоемов происходят быстро только при заморных сбросах, когда результаты отравлений легко выявляются и без применения специальных систем. Изменения видового состава без явных заморов формируются в результате длительного отравления водоема и статистически достоверными становятся при далеко зашедшем загрязнении. Кроме того, видовой состав или функциональное состояние гидробионтов из загрязненного водоема не могут служить характеристикой токсических свойств водной среды на момент исследования. Не могут найти применения системы биологической индикации и в холодное время года.

С другой стороны, гидрохимические и химико-аналитические методы также могут оказаться неэффективными из-за недостаточно высокой их чувствительности. Живые организмы способны воспринимать более низкие концентрации веществ, чем любой аналитический датчик, в связи с чем биота может быть подвержена токсическим воздействиям, не регистрируемым техническими средствами.

В связи с этим сформировалась концепция **токсикологического биотестирования**, т. е. использования биологических объектов в качестве средства выявления суммарного содержания токсических компонентов в водной среде.

1.3.2.Биотестирование

Биотестирование в широком смысле слова представляет собой методический прием, основанный на оценке действия фактора среды, в том числе и токсического, на организм, его отдельную функцию или систему организмов. Биотестирование позволяет своевременно выявить комбинированное действие химических веществ, которое невозможно определить химическими анализами.

Биотестирование с использованием гидробионтов можно применять для решения большого круга задач:

1. Проведение обязательного для всех предприятий токсикологического исследования сточных вод в соответствии с «Правилами охраны поверхностных вод», введенными с 01.03.91 и для составления экологических паспортов предприятий.

2. Проведение в оперативном режиме контроля аварийных и других залповых сбросов высокотоксичных сточных вод.

3. Определение уровня безопасного разбавления сточных вод с целью установления и корректировки предельно допустимых сбросов (ПДС) веществ, поступающих в водные объекты со сточными водами.

4. Проведение токсикологической оценки сбросных и дренажных вод сельскохозяйственного производства, содержащих пестициды, при отведении их в водоприемники.

5. Проведение контроля токсичности сточных вод, подаваемых на биологические очистные сооружения с целью предупреждения поступления токсичных для биоценозов активного ила загрязняющих веществ.

6. Количественная оценка работы очистных сооружений.

7. Токсикологическая оценка качества питьевой воды водопроводов, артезианских скважин и других источников питьевой воды.

8. Оценка мутагенного, канцерогенного и эмбриотоксического действия природных и сточных вод.

9. Оценка состояния природных водоемов и водотоков, выявление акваторий с высоким уровнем загрязнения с целью составления карт сапробного и токсического загрязнения.

10. Исследование накопления токсических веществ в грунтах и илах водоемов. Оценка токсикологической обстановки при прове-

дении гидромеханизированных работ (углубление судоходных ходов, строительство траншей для трубопроводов, кабелей и т. п.).

11. Исследование способности природных водоемов и водотоков к самоочищению.

12. Оценка токсичности атмосферных осадков. Получение данных для составления карт токсичности снежных покровов, связанных с выбросами токсических веществ в атмосферу.

13. Экспериментальное определение наиболее токсичных компонентов и комбинаций в сложных по составу сточных водах. Выявление составляющих сточных вод, которые взаимно усиливают действие друг друга.

14. Проведение токсикологического контроля качества искусственных кормов для рыб, птиц и др. животных.

15. Определение способности композиционных материалов (бетон с наполнителями, пластмассы и т. п.) выделять токсические вещества в окружающую среду.

Каждая из этих задач, в свою очередь, включает частные подзадачи и этапы, нуждающиеся в разрешении. В зависимости от поставленной при проведении биотестирования задачи различными оказываются подходы к оценке результатов испытаний.

В качестве объектов для биотестирования (тест-объектов, тест-культур, тест-организмов) применяются различные организмы: бактерии, одноклеточные водоросли, высшие водные растения, пиявки, ветвистоусые ракообразные – дафнии, моллюски, рыбы и др. Однако ни один из организмов не может служить универсальным объектом, чувствительным ко всем загрязняющим веществам в равной степени. Поэтому при исследовании токсических свойств промышленных сточных вод контроль должен проводиться с включением 3–4 тест-объектов. Оценка лишь по одному тест-объекту допустима в том случае, если нужно определить границы зоны устойчивого загрязнения на водоеме, а также при регулярном контроле токсичности промышленных сточных вод.

Наиболее оперативными показателями токсического действия служат поведенческие реакции и выживаемость гидробионтов.

ТЕМА 2. ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ НА КАЧЕСТВО ВОДЫ И ТОВАРНОЕ КАЧЕСТВО РЫБЫ

Контрольные вопросы

1. Предмет и задачи водной токсикологии.
2. Методы водной токсикологии
3. Масштабы загрязнения гидросферы в результате деятельности человека.
4. Загрязнение воды в России.
5. Потребление воды в России.
6. Качество воды и критерии его оценки: физические и химические показатели качества воды.
7. Виды водопользования.
8. Нормы качества поверхностных вод.

2.1. Характер влияния загрязняющих веществ на водоемы и водные организмы (ЛПВ)

Характер влияния загрязняющих веществ на водоемы и водные организмы подразделяется на три основные группы, которые принято называть лимитирующим показателем вредности (ЛПВ): общесанитарный; токсикологический; хозяйственный (рыбохозяйственный).

1. Общесанитарный ЛПВ. При этом типе влияния веществ происходит нарушение исторически сложившихся в водоеме экологических условий. Все вещества, относимые по действию к этому ЛПВ, либо являются нормальными компонентами для природных водоемов, либо аналогичны им по действию. Различают следующие подгруппы в пределах данного ЛПВ:

- ✓ *Изменение трофии* водоемов, которое включает в себя:
 - а) повышение сапробности среды;
 - б) дистрофирование водоемов;
 - в) излишнее повышение содержания биогенов.
- ✓ *Снижение концентрации растворенного в воде кислорода* может быть:
 - а) следствием повышения сапробности среды или
 - б) без повышения сапробности.

✓ *Изменение солености воды* (вызывает нарушение осморегуляции водных организмов, водно-солевого обмена и т. п.) с нарушением или без нарушения содержания и соотношения солей.

✓ *Изменение температуры воды:*

а) вызывает шоковые явления у организмов;
б) изменяет сроки прохождения определенных стадий развития организмов и сезонных процессов в водоеме.

✓ *Механическое загрязнение твердыми веществами:*

а) влекомыми в толще воды (вызывают снижение прозрачности воды и толщины трофогенного слоя, забивание и механическое повреждение жабр и покровов тела гидробионтов).

б) оседающими на дно, вдоль берегов, вызывающими нарушения биоценозов бентоса, прибрежной водной растительности, заиление нерестилищ, замену более ценных в кормовом отношении биоценозов менее ценными.

✓ *Механическое загрязнение жидкими веществами:*

а) образующими пленку на поверхности воды, ухудшающую условия аэрации, возможность вылета водных насекомых, дыхания воздушно-дышащих водных насекомых и т. д.

б) образующими эмульсии в толще воды с оседанием на гидробионтах и снижением прозрачности воды;

в) оседающими на дно и водную растительность, что вызывает гибель растений и ухудшение структуры грунтов.

2. Токсикологический ЛПВ. Регламентируемые по данному ЛПВ вещества оказывают прямое токсическое действие на водные организмы. Экологические последствия определяются непосредственным влиянием вещества на наиболее чувствительные виды или группы видов водных организмов. Пограничные концентрации действия на организменном или популяционно-видовом уровнях организации живого близки или совпадают. Влияние на биоценоотическом уровне определяется относительной чувствительностью составляющих биоценоз видов к загрязняющему веществу.

Токсикологический ЛПВ по влиянию на организменный уровень может вызывать:

✓ *Нарушение функций дыхания:*

а) кожного и жаберного;
б) тканевого и клеточного.

✓ *Нарушение функций размножения:*

- а) инстинктов и рефлексов размножения;
- б) овогенеза и сперматогенеза;
- в) процессов оплодотворения;
- г) эмбрионального развития (включая тератогенное действие);
- д) выпадение или дефектность отдельных стадий развития.

✓ *Нарушение функций питания:*

- а) процессов пищеварения и степени усвоения пищи;
- б) рефлексов питания.

✓ *Нарушение функционирования нервной системы, проявляющееся:*

- а) в угнетении, вплоть до параличей;
- б) в раздражающем, возбуждающем (ирритантном) действии.

Оба типа действия могут встречаться по отдельности или совместно, как фазы токсического процесса.

✓ *Нарушение фотосинтеза водных растений и водорослей.*

✓ *«Обжигающее» действие* (нарушение покровов тела, целостности мембран на плавниках, образование подкожных кровоизлияний и язв и т. п.)

3. Хозяйственный ЛПВ (рыбохозяйственный). Вещества вызывают порчу товарных качеств промысловых водных организмов:

Включает:

✓ *Порчу вкусовых качеств* промысловых видов (*органолептический показатель (ЛПВ)*). Проявляется:

- а) в появлении неприятных посторонних привкусов;
- б) в появлении неприятных посторонних запахов;
- в) в понижении упитанности, жирности, консистенции мяса рыб и других промысловых организмов.

✓ *Накопление токсических веществ* в опасном для человека и домашних животных количестве:

- а) устранимое при некоторых формах кулинарной обработки;
- б) не устранимое никакими способами.

В качестве показателей опасных количеств следует руководствоваться разрабатываемыми Министерством здравоохранения **ПДОК** (предельно допустимые остаточные количества вредных веществ в продуктах питания).

✓ *Накопление возбудителей заболеваний.* Особенно опасно, если продукты используются в сыром виде (например, устрицы).

Третий ЛПВ (хозяйственный) не всегда может сопровождаться ухудшением состояния популяций водных организмов и условий их воспроизводства.

2.2. Критерии оценки качества воды

М. М. Телитченко сформулировал теоретическую концепцию формирования качества воды: «Основным качеством воды является ее биологическая полноценность – способность обеспечивать нормальное отправление физиологических и биохимических процессов, на базе которых строится наследственность организмов. Она формируется выделениями гидробионтов в процессе самоочищения. При этом гидробионты не только исправляют ионный состав воды и выделяют в нее витамины, гормоны, ферменты и другие биологические активные вещества, но их выделения защищают от переокисления растворенное органическое вещество – энергетическую основу автономности (гомеостаза) экосистемы. Экстремальные воздействия нарушают это равновесие и изменяют качество воды»¹.

Качество воды в водоеме оценивается по ряду физических, химических, биологических и бактериологических показателей:

❖ **физические показатели** – это температура, содержание взвешенных веществ, плотность воды, органолептические показатели (привкусы, запахи и т. д.);

❖ **химические показатели** – рН, жесткость, щелочность, окисляемость, растворенные газы, сухой и прокаленный остатки и т. д.;

❖ **биологический** анализ воды основан на приуроченности отдельных гидробионтов к водам с той или иной степенью загрязнения.

Каким параметрам должна отвечать чистая вода?

Качество воды в первую очередь определяют органические вещества, их природа. Кроме того, важным показателем качества воды является содержание в ней азотных форм, фосфора, железа, серы, углерода, углекислоты, кислорода и других элементов; санитарным показателем качества воды является наличие в ней болезнетворных микроорганизмов.

¹ Телитченко М. М. Введение в проблемы биохимической экологии. М.: Наука, 1990. 288 с.

***Окисляемость.** Общее количество содержащихся в воде органических соединений определяется ее окисляемостью, т. е. количеством кислорода, эквивалентным расходу окислителя. Различают окисляемость перманганатную, бихроматную, иодатную и др. Наиболее полное окисление органических веществ достигается бихроматом калия. Бихроматную окисляемость часто называют *химическим потреблением кислорода* (ХПК).

Для вод, окисляемость которых не превышает 100 мг кислорода на литр, используют *перманганатный метод окисляемости*. Отношение перманганатной окисляемости к бихроматной, выраженное в процентах, называется индексом Б. А. Скопинцева. Значение индекса Скопинцева не менее 40% свидетельствует о повышенном содержании гуминовых веществ. Таким образом, ХПК и перманганатная окисляемость позволяют судить о наличии в воде органических веществ, окисляемых химическим путем.

Количество веществ, окисляемых биологически, характеризует *биохимическое (биологическое) потребление кислорода* (БПК).

БПК называется количество кислорода, выраженное в миллиграммах, требуемое для полного окисления всех находящихся в 1 л воды органических веществ в аэробных условиях в результате проходящих в воде биологических процессов. Биохимическая потребность в кислороде не включает расхода кислорода на нитрификацию. Определяют или полное БПК, для чего процесс надо вести до начала нитрификации (обычно 15–20 суток), или 5-суточное потребление кислорода (БПК₅).

Нормативные требования по БПК сформулированы в Правилах охраны вод следующим образом: биохимическое потребление кислорода – БПК_{полн.} не должно превышать при температуре 20⁰С для хозяйственно-питьевых нужд населения и для нужд рыбного хозяйства 3 мг О₂ дм³ и для коммунально-бытовых нужд населения – 6 мг О₂ дм³.

***Сапробность.** Отношение БПК₅ к перманганатной окисляемости, выраженное в процентах, отражает сравнительную характеристику веществ сапробного загрязнения. Относительное содержание органических веществ в водоеме определяет их *сапробность* – это степень насыщения воды разлагающимися органическими веществами.

По Колквицу и Марсону, система определения степени сапробности включает четыре зоны: *олигосапробную*, или зону практически чистой воды, альфа- и бетамезосапробные, из которых первая по степени загрязненности приближается к *полисапробной* зоне – зоне наиболее загрязненных органическими веществами вод. Бетамезосапробная зона близка к олигосапробной.

***Трофность.** Содержание органического вещества в водоеме, или степень трофности водоема, определяет его возраст или период жизни водоема. Молодость водоема – фаза *олиготрофии*, средний возраст – *мезотрофия* и, наконец, старость – поли- или *евтрофный* водоем.

Евтрофирование вод – объективный процесс, в основе которого лежит способность органического вещества накапливать энергию – увеличивать энтальпию (теплосодержание) водной экосистемы и снижать этим продолжительность его жизни. Накоплению органического вещества способствуют: зарегулирование стоков, сброс подогретых вод, удобрение вод фосфором и азотом, даже в виде детергентов и пестицидов, уничтожение потребителей растений, заселение вод более продуктивными формами.

***Кислотность, щелочность, жесткость.**

Большое значение в оценке качества природных вод имеют их кислотность, щелочность и жесткость.

По водородному показателю (рН) воды подразделяются на следующие группы:

- нормальные: рН 6,5–8,5;
- кисловатые: рН 6,4–5,0, воды, имеющие слабокислую реакцию, опасны для рыб при повышенном содержании солей железа и при концентрации двуокиси углерода выше 20 мг/л;
- кислые: рН ниже 5,0 – опасны для рыб всегда;
- подщелоченные: рН 8,6–9,5, опасны для рыб при длительном воздействии;
- щелочные: рН выше 9,5, опасны для рыб всегда.

По показателю жесткости воды подразделяются на следующие группы:

- очень мягкая: не более 1,5 мг экв/л;
- мягкая: 1,51–3,0 мг экв/л;
- умеренно жесткая: 3,01–6,00 мг экв/л;

- жесткая: 6,01–9,00 мг экв/л;
- очень жесткая: более 9,00 мг экв/л.

***Органолептические показатели.** К органолептическим показателям относятся такие качества внешней среды (воды, воздуха, пищевых продуктов), которые выявляются и оцениваются с помощью органов чувств (вкус, запах, цвет).

Многие вещества, попадающие в водоемы, имеют неприятный запах и изменяют органолептические свойства воды. Чувствительность органов обоняния поразительно велика. Так, например, для порогового восприятия у человека достаточно всего 400 молекул меркаптана в 1 м³ воздуха. Поэтому исследование запахов, вкуса и привкуса воды приобретает большое значение. Запахи по характеру подразделяются на две группы:

- запахи естественного происхождения – от живущих и отмирающих в воде организмов, от влияния берегов, дна, окружающих почв, грунтов, срубов колодцев и т. д.;
- запахи искусственного происхождения – от промышленных сточных вод, от обработки воды реагентами на водопроводе и т. д.

Классификация запахов первой группы приведена в табл. 1.

Запахи второй группы называют по соответствующим веществам: фенольный, хлорфенольный, камфарный, бензиновый, хлорный и т. д.

Необходимо иметь в виду, что иногда запахи и привкусы воде придает почвенная микрофлора (чаще актиномицеты), особенно после пуска в эксплуатацию искусственных водоемов или каналов. Запахи и привкусы от фитопланктона являются настоящим бедствием в водоснабжении. Так, некоторые представители фитопланктона могут придавать воде следующие запахи и привкусы:

астерионелла – слабовыраженный землистый, при значительных концентрациях – запах герани, при больших количествах – рыбный запах;

табеллярия – ароматический, гераневый, рыбный;

Пандорина – рыбный;

анабена – запах плесени, настурции, при разложении – свиного хлеба;

малломонас – фиалки, ароматный, рыбный.

Таблица 1

***Классификация запахов воды
естественного происхождения***

<i>Символ</i>	<i>Характер запаха</i>	<i>Примерный род запаха</i>
А	Ароматический	Огуречный, цветочный
Б	Болотный	Запах торфа, илистый, тинистый
Г	Гнилостный	Фекальный, сточный
Д	Древесный	Запах мокрой щепы, древесной коры
З	Землистый	Запах влажной почвы, прелый, глинистый
П	Плесневой	Затхлый, застойный
Р	Рыбный	Запах рыбьего жира, рыбы
С	Сероводородный	Запах тухлых яиц
Т	Травянистый	Запах скошенной травы, сена
У	Углеводородный	Запах нефти
Н	Неопределенный	Запахи естественного происхождения, не подходящие под предыдущие определения

Отмечают, что фитопланктонные организмы сообщают воде неприятные запахи лишь попадая в неблагоприятные условия жизни – длительное голодание, подщелачивание воды, действие высоких температур, аэробные условия. Часто при кипячении запахи теряются, но вода приобретает неприятные привкусы. В установлении токсичности водной среды по органолептическим показателям следует отличать запахи, вызываемые фитопланктоном, от запахов токсических веществ.

***2.3. Особенности предварительной оценки
и установления расчетных ПДК веществ,
обладающих запахом, привкусом
и раздражающим действием***

В аспекте предварительной токсикологической оценки с расчетным прогнозированием ориентировочных (расчетных) ПДК (или временно допустимых концентраций – ВДК, ориентировочного безопасного уровня воздействия – ОБУВ) в первую очередь отмечается то, что даже для воздушной среды далеко не во всех случаях лимитирующим показателем является общетоксическое действие. Например, для ряда производных меркаптана лимитирующим показателем оказался порог запаха. Для некоторых веществ

характерно раздражающее действие, уровень которого также может существенно отличаться от параметров общетоксического действия.

При прогнозировании ПДК в воде водоемов неперенным требованием должно быть определение возможности придания веществом воде характерного запаха, вкуса (горький, кислый, неприятный и т. д.) или окраски. Учитывая экспрессный характер исследования, вкус и запах обследуемых веществ, а также появление окраски, вероятно, следует определять на уровне теоретически ожидаемой (расчетной) ПДК по общетоксикологическому показателю, что позволит в значительной мере обеспечить безопасность проведения наблюдений на добровольцах. Кроме того, при такой постановке эксперимента сразу определяется лимитирующий показатель вредности (органолептический или токсикологический).

В настоящее время расчетный метод прогнозирования ПДК в воде водоемов можно распространять на вещества, для которых предполагается лимитирующим **санитарно-токсикологический** показатель вредности. Если же приходится предполагать иные лимитирующие показатели вредности (**органолептический, общесанитарный**), то возникает необходимость постановки соответствующих экспериментов.

Заключение в таких случаях возможно только после сопоставления расчетной ПДК (ОБУВ, ВДК) по параметрам острой токсичности или физико-химическим константам с результатами изучения влияния вещества на санитарный режим водоема и с показателями органолептических свойств.

Таким образом, в настоящее время расчет ориентировочных ПДК (ОБУВ, ВДК) загрязняющих веществ в воде водоемов по параметрам острой токсичности нуждается в дополнении сведениями о влиянии этих веществ на санитарный режим водоемов, о порогах запаха и о придании воде привкуса или окраски.

Порог запаха химических веществ при установлении гигиенического норматива определяют в трех последовательно возрастающих категориях. Минимальная из них определяется концентрацией, ощущаемой только отдельными и наиболее чувствительными к этому запаху лицами. Большее практическое значение имеет средняя категория установления пороговой концентрации по ощущению специфического запаха большинством добровольцев. И, наконец,

третья категория порога запаха, когда он становится непереносимым или сочетается уже с порогом раздражающего действия.

Если теоретически ожидаемая расчетная ПДК обладает выраженным запахом или раздражающим действием, то следует установить соответствующий порог. За пороговую принимается концентрация, имеющая интенсивность ощущения в два балла и воспринимаемая хотя бы одним из добровольцев.

Лабораторная работа 1

Методика органолептического исследования воды

Орган обоняния у человека обладает большой чувствительностью, позволяющей определить по запахам ничтожно малые количества различных веществ, образующихся в результате химических процессов (например, фенол и его производные, нефть и продукты ее перегонки, смолы и дегти, канифоль, камфора, тимол, ментол, эфирные масла из хвои, смоляные кислоты). Большая группа соединений из числа пестицидов (особенно фосфорорганические соединения) также улавливается органолептически.

Следует особо отметить, что концентрация большинства сильно пахнущих веществ, определяемых органолептически, находится ниже границы, при которой они действуют токсически (вызывают повреждение организма). Это обстоятельство весьма важно для экспертизы.

Чувствительность к запахам (или острота обоняния) у человека колеблется в широких пределах и зависит от многих условий. Восприятие запаха значительно усиливается при повышении температуры и снижается при ее понижении. Уменьшение остроты обоняния может наблюдаться в случае утомления, при ряде заболеваний (ринит, грипп), в результате адаптации к тому или иному запаху при длительном его воздействии.

Интенсивность запаха выражается по пятибалльной системе, согласно следующей классификации (табл. 2).

Задание: установить пороговое разведение и пороговую концентрацию исследуемых растворов по органолептическому показателю (по характеру и интенсивности запаха).

Таблица 2

Оценка интенсивности запаха воды в баллах

Балл	Термин	Описательное определение
0	Никакого	Запаха не ощущается.
1	Очень слабый	Запах, не поддающийся определению потребителем, но обнаруживаемый в лаборатории.
2	Слабый	Запах, поддающийся обнаружению потребителем, если обратить на него внимание, но сам по себе не привлекающий внимания.
3	Заметный	Запах, который легко замечается и может вызвать неодобрительные отзывы о воде.
4	Отчетливый	Запах, который легко замечается и может заставить воздержаться от питья.
5	Очень сильный	Запах настолько сильный, что вода непригодна для питья.

Для работы необходимо: 1%-ный раствор фенола, 1%-ный раствор ФОС (карбофос, метилацетофос и др.), 10%-ный раствор аммиака, широкогорлые стеклянные колбы емкостью 100–200 мл – 10 шт., часовые стекла или стекла-крышки для колб, пипетки химические на 1,0 и 10,0 мл – по 3 шт., мерные цилиндры на 100–200 мл – 2 шт., резиновые груши для химических пипеток – 2 шт., карандаш по стеклу, дистиллированная вода.

Методика исследования

Для определения органолептических свойств **неизвестного в токсикологическом отношении вещества** сначала проводят тестирование **основного** (концентрированного, маточного, процентного) раствора исследуемого токсического вещества (токсиканта): например 10%-ного; 1%-ного или другой процентной концентрации. Для приготовления 1%-ного раствора 1,0 г вещества растворяют в 100,0 г растворителя. В качестве растворителя или разбавителя для приготовления концентрированных растворов используют **дистиллированную воду** (или специальные растворители).

Для определения порогового разведения или пороговой концентрации исследуемого вещества или сточной воды по органолептическому показателю, готовят **серию (ряд) разбавлений** (не менее трех) маточного раствора вещества дистиллированной водой в 2^n раз, где $n = 0, 1, 2, 3 \dots$ (т. е. в 0, 2, 4, 8, 16 и т. д. раз), либо

в 10^n , где $n = 0, 1, 2, 3 \dots$ (т. е. в 0, 10, 100, 1000 и т. д. раз), либо готовят **ряд концентраций** в геометрической прогрессии, с коэффициентом 0,1 (например, 1000,0 мг/л, 100,0 мг/л, 10,0 мг/л, 1,0 мг/л, 0,1 мг/л и т. д.).

Для определения запаха взять широкогорлую колбу емкостью 100–200 мл, налить $2/3$ объема маточного раствора вещества или испытуемой воды. Колбу закрыть чистым часовым стеклом, встряхнуть, производя вращательные движения, отнять часовое стекло и определить характер и интенсивность запаха (**ВНИМАНИЕ! Соблюдайте технику безопасности при работе с химическими веществами!**).

Установить пороговое разведение и пороговую концентрацию предложенных для исследования растворов веществ, производя разведение маточных растворов дистиллированной водой в 10, 100, 1000 и большее количество раз (т. е. в геометрической прогрессии с шагом 10^n , где $n = 0, 1, 2, 3 \dots$) до получения разбавления, не имеющего запаха по пятибалльной шкале (подпороговое разведение).

Результаты оформить в виде таблицы (табл. 3).

Таблица 3

**Результаты исследований
по установлению пороговых разведений и концентраций
исследуемых веществ по интенсивности запаха**

<i>Вещество</i>	<i>Разведение (кратность разбавления)</i>	<i>Концентрация вещества, мг/л</i>	<i>Баллы</i>

Оформить протокол опыта. Сделать выводы.

**2.4. Патолого-анатомическое
и органолептическое исследование рыбы**

Нередко приходится устанавливать причину массовой гибели рыб на том или ином водоеме, используя при этом данные патолого-анатомического, патоморфологического и патофизиологического исследований, совокупность которых позволяет в первом приближении представить симптомокомплекс отравления.

В свою очередь, по этим данным можно составить предварительное мнение относительно группы веществ, вызвавших гибель рыбы, справедливость которого необходимо затем проверить в экспериментальных условиях.

Идентификация картины отравления в экспериментальных условиях с картиной гибели рыб в естественных водоемах может послужить решающим доказательством в определении завода, сточные воды которого вызвали массовое отравление рыбы. Этот своего рода ихтиотоксикологический научно-следственный эксперимент приобретает особое значение, если в рыбохозяйственный водоем-приемник сбрасывают сточные воды несколько предприятий. Целесообразность проведения эксперимента вполне очевидна и базируется на хорошо известном положении о том, что в смеси ядов общую картину отравления определяет наиболее токсичный компонент (особенно в случае острого отравления рыбы).

Фенол и его производные

Фенол, пирокатехин, резорцин, гидрохинон, эфиры гидрохинона, пирогаллол, ксиленол, крезол, аминифенол, флороглюцин, нафтол, катехол – производные фенола (кислота карболовая) представляют сухую часть продуктов перегонки древесины и каменноугольного дегтя.

Растворы фенола обладают сильной бактерицидной активностью (3–5% водный раствор, растворимость 1:20). В фармацевтической промышленности фенол (0,5–0,1%-ные растворы) применяют для консервирования лекарственных веществ, сывороток и др. Также применяется для изготовления взрывоопасных веществ, пластмасс.

Фенол действует на кожные покровы и слизистые оболочки как раздражающее и прижигающее средство, легко через них всасывается и в больших дозах может вызвать токсические явления (расстройство ЦНС, нарушение координации движений, головокружение, расстройства дыхания, коллапс). *Легко адсорбируется пищевыми продуктами.* Из фенолов наиболее токсичны ксиленол, гидрохинон; менее – пирогаллол, флороглюцин. Крезол токсичнее фенола, причем токсичность разных изомеров различна и падает в ряду: ортокрезол, паракрезол, метакрезол. У ксиленола 6 изомеров, кроме метаксиленола все его изомеры выше по токсичности и фенола и крезола.

Из группы двухгидроксильных фенолов наиболее ядовит гидрохинон. Наименее токсичны трехгидроксильные фенолы: пирогаллол и флороглюцин. По убыванию токсичности все фенолы располагаются в следующем порядке: ксиленол > гидрохинон > крезол > фенол > пирокатехин > резорцин > пирогаллол > флороглюцин. Резорцин – мета-Диоксибензол – прижигающего и бактерицидного действия (2–5%-ные растворы).

Фенол является нервным ядом и вызывает паралич нейромускулярного аппарата. В результате отравления рыб фенолами происходит одностороннее сокращение мышц и тело может быть дугообразно изогнуто, окраска тела часто бывает светлая, но при этом голова и спинка темные. Кроме того, при повышенных концентрациях яда отмечается обильное ослизнение покровов, нарушение респираторного эпителия и кровоизлияния. Кровь при этом густая и медленно свертывается. У погибших рыб в брюшной полости наблюдается скопление кровянистого транссудата. Печень, которая в норме должна быть плотной, вишнево-красного цвета, при отравлении фенолами приобретает грязно-сероватый цвет, дряблую консистенцию, окраска может быть мраморной. Паренхима печени гиперемирована. Почки и селезенка также дряблые и бледной окраски. В печени, почках, сердце отмечаются дистрофические изменения. В сердечной мышце, селезенке и почках – скопление гематоидина – желтого пигмента. В желудочно-кишечном тракте также имеется слизь желтого цвета, стенка кишки прозрачная. Фенол при отравлении обнаруживается в коже, мышцах, жабрах, желудочно-кишечном тракте, печени, селезенке, почках.

Лабораторная работа 2

Патолого-анатомическое исследование рыбы

Структурные нарушения начинаются с молекулярных изменений конфигурации клеточных образований, состоящих из полисахаридов, белков, липопротеидов, нуклеопротеидов. Прямым следствием этого являются нарушения структуры цитоплазмы, мембран клеток и других субклеточных элементов.

Вещества, нарушающие проницаемость клеточных мембран и работу натрий-калиевого насоса, вызывают, как правило, набухание и обводнение клеточных структур и тканей в целом. Функциональ-

ное изменение проницаемости мембран при токсическом воздействии является одним из симптомов состояния клетки, называемого «*паранекрозом*». Паранекроз сопровождается уменьшением дисперсности коллоидов цитоплазмы и ядра, увеличением вязкости цитоплазмы, которому может предшествовать её уменьшение, повышением кислотности внутренней среды клетки. Эти изменения связывают с обратимой денатурацией клеточных белков. Полагают, что в клетках разных видов организмов происходит полимеризация одного и того же вида макромолекул глобулярного белка – актина.

Изменения, обнаруживаемые на микроскопическом уровне, находят отражение в наглядных нарушениях структур целых тканей и органов. Так, продукты хлорирования сточных вод и другие агенты (металлы) вызывают у рыб и моллюсков выделение слизи, особенно в жабрах, появление на жабрах некрозов, отслоение эпителия, приводящие к асфиксии (аноксии) и, в итоге – к гибели. Обычными нарушениями у моллюсков при токсическом воздействии оказываются также деформация раковин, изменение окраски тела и другие патологии. Другие морфологические симптомы отравления рыб – вздутие тела, ерошение чешуи, пучеглазие (при действии фосфора и его соединений). Распространенной аномалией у рыб при интоксикациях является искривление позвоночника, что может вызываться нейротоксической тетанической контрактурой скелетных мышц, а также изменением структуры костей, что делает их более хрупкими.

Изменения целой ткани оказываются интегральными по отношению к изменениям в клетках и сопровождаются интегральными изменениями функции органов и систем, роста, поведения, размножения и выживаемости организма в целом.

Таким образом, внешний осмотр и последующее патолого-анатомическое вскрытие имеют важное значение в диагностике отравления рыб различными веществами.

Задание: установить изменения в организме рыб, характерные для отравления фенолом.

Для работы необходимо: препаровальный набор, чашка Петри – 2 шт., поддон, рыба после острой затравки (96 часов) фенолом в концентрации 4 мг/л (или керосином – 1 мг/л, аммиаком – 2 мг/л, соединениями из группы пестицидов, особенно фосфорорганических (ФОС), например карбофосом – 50 мг/л), контрольная рыба.

Методика исследования

Внешний осмотр и последующее патолого-анатомическое вскрытие производится по определенной схеме. Результаты осмотра и вскрытия вносятся в протокол.

Схема патолого-анатомического обследования рыбы

➤ *Внешний осмотр рыбы.* Установить возраст и вид, упитанность и время гибели. Обратить внимание на наличие или отсутствие трупного окоченения, изогнутость тела, положение жаберных крышек и жабр: открыты или прижаты к туловищу.

➤ *Обследование кожных покровов.* Отметить блестящие они или тусклые, цвет, состояние пигментных клеток – хроматофоров, отсутствие или наличие слизи, ее количество, качество, цвет.

➤ *Обследование состояния чешуйных покровов.* Отметить наличие или отсутствие ерошения чешуи, гидремии тела, состояние брюшка рыбы, жаберных крышек, ротовой полости, анального отверстия. Обратить внимание на плавники и их состояние, целостность лучей.

➤ *Осмотр жабр.* Отметить их цвет, наличие слизи, ее количество, состояние жаберных лепестков, их слипание или срастание, расширение или истончение, наличие налета между лепестками, наличие осадка или инородных предметов, кровоизлияний и т. д. Особенно внимательно следует осмотреть кончики жаберных лепестков, хрящевые лучи которых могут оголяться вследствие разрушения мягких тканей. Иногда это можно установить только под микроскопом. Поэтому жабры следует всегда подвергать микроскопии.

➤ *Наружный осмотр глаз.* Установить размер, наличие слизи или гноя, наличие экзофтальмии. Затем глазное яблоко извлечь из орбиты и осмотреть, обращая внимание на наличие покраснений, кровоизлияний, помутнения хрусталика, определить состояние роговицы, наличие кератита, их посмертного помутнения.

➤ *Вскрытие рыбы.* Разрезать брюшную стенку и исследовать состояние скелетной мускулатуры, обращая внимание на ее цвет, консистенцию, наличие кровоизлияний, гиперемии, степени прикрепления к костям.

Осмотреть брюшную полость и отметить наличие в ней выпота (количество, цвет, запах, консистенцию). Обратить внима-

ние на топографическое расположение органов, состояние внутреннего жира (количество, цвет), на изменения брюшины и серозных покровов, на состояние крови (жидкая или свернувшаяся).

Органы извлечь из брюшной полости и отделить друг от друга. Определить их состояние по следующим признакам: размер, характер краев, цвет, консистенция, наличие кровоизлияний или очагов некроза; на разрезе органа определить степень его кровенаполнения, характер рисунка.

Желудок и кишечник после наружного осмотра вскрыть и учесть степень наполнения кормовыми массами и наличие студенистых масс.

Осмотреть слизистую оболочку, обращая внимание на ее цвет, консистенцию, толщину, наличие гиперемии и кровоизлияний.

Для обследования состояния головного мозга сделать три разреза черепной коробки, один из них – поперечный по заднему краю затылочной кости и два продольных – по направлению к носовым отверстиям. Основное внимание при обследовании головного мозга обратить на состояние жира, кровенаполнение сосудов, цвет, консистенцию мозга, отметить наличие застоя крови.

Произвести осмотр и вскрытие рыбы, затравленной фенолом или другими веществами, сопоставить с результатами вскрытия здоровой рыбы.

Составить протокол вскрытия. Сделать выводы.

Лабораторная работа 3

Органолептическое исследование рыбы

Задание: установить, в каких органах и тканях рыбы локализуются запахи, характерные для фенола.

Для работы необходимо: препаровальный набор, широкогорлые колбы емкостью 50–100 мл – 15 шт., часовые стекла или стекла-крышки для колб, пипетки химические на 10 мл – 2 шт., рыба после острой затравки (96 часов) фенолом в концентрации 4 мг/л (или керосином – 1 мг/л, аммиаком – 2 мг/л, соединениями из группы пестицидов (фосфорорганических (ФОС), например карбофосом – 50 мг/л), контрольная рыба, плитка электрическая лабораторная, тазик почкообразный – 1 шт., дистиллированная вода.

Методика исследования

Органолептическое исследование рыбы проводится пробой варки. В колбы поместить кусочки различных частей тушки рыбы и залить дистиллированной водой (примерно 10–15 мл). Колбы закрыть часовыми стеклами, содержимое нагреть до кипения. После закипания, снять колбу с плитки, приподнять часовое стекло и определить интенсивность запаха, его характер.

Следует учитывать, что запахи различных веществ могут избирательно локализоваться в определенных частях тушки. Установлено, что запахи больше концентрируются в тканях, богатых жиром (нервная, жировая), в брюшной полости и на боках рыбы, в то время как в хвостовой части запахов значительно меньше.

Опыты проводить на контрольной (здоровой) рыбе и рыбе, затравленной фенолом в концентрации 4 мг/л (острая затравка (96 часов)).

Для органолептического исследования взять следующие части рыбы: кожу, мозг, мышцы, жабры, жир.

Оформить протокол опыта. Сделать выводы.

ТЕМА 3. ДИАГНОСТИКА ОТРАВЛЕНИЯ РЫБ И ДРУГИХ ГИДРОБИОНТОВ

Контрольные вопросы

1. Организация исследования ПДК в лабораторных условиях. Определение летальных концентраций CL_{100} или CL_{50} . Определение медианного времени выживания LT_{100} или LT_{50} .

2. Оценка острого летального, хронического летального и сублетального действия ядов. Организация подострых и хронических опытов.

3. Пороговые концентрации веществ. Зависимость токсического действия от времени действия яда. Характер зависимости «концентрация-время».

4. Зависимость токсического эффекта от концентрации яда.

5. Биохимические, биофизические и физиологические методики в диагностике отравления гидробионтов.

6. Кумуляционный эффект.

7. Комбинированное действие ядов. Аддитивный эффект.

8. Адаптация рыб к ядам. Обратимость интоксикаций и факторы ее определяющие.

9. Симптомы отравления рыб и других гидробионтов.

10. Симптомокомплекс отравления рыб ядами локального действия (хлор, кислоты, щелочи, соли тяжелых металлов). Механизм и последствия действия ядов.

11. Симптомокомплекс отравления рыб ядами резорбтивного действия (фенолы, ксилолы, хиноны, нефть, ФОС, хлорорганические пестициды). Механизмы действия ядов и последствия отравления.

Основными факторами, формирующими *симптомокомплекс* токсического поражения тем или иным ядом, являются режим его поступления в клетки и ткани организма и состояние других, помимо концентрации вещества, параметров окружающей среды. В связи с этим точнее было бы выделять не группы токсикантов по типу их действия, а *виды доминирующих процессов и симптомов* при действии токсичного агента в экологически реальном режиме воздействия.

Детальная характеристика симптомов отравления рыб, изучение поведения рыб в растворах, содержащих те или иные компоненты сточных вод в сублетальных и токсических концентрациях, важны для создания клинической картины отравления. На основании ее можно определить группу или природу яда, что, в свою очередь позволяет установить причину гибели рыб в естественном водоеме. Поэтому, следует всесторонне изучать симптомы отравления.

Условно различают яды с локальным и резорбтивным действием.

К ядам локального действия относят:

- неорганические вещества: хлор, перекись водорода, марганцовокислый калий, озон, кислоты и щелочи, соли тяжелых металлов (марганец, никель, хром, мышьяк, кадмий, свинец, железо, ртуть, медь, серебро), борная кислота;
- органические вещества: формальдегид, органические кислоты, краски, дубильные вещества и детергенты.

При проникновении (резорбции) в организм яды действуют в зависимости от их природы либо на нервную систему – *нервно-паралитические* яды (большинство органических соединений: фенолы, ксилолы, хиноны, нитросоединения, ациклические и гетероциклические соединения, алкалоиды, нефть, нефтепродукты, смолы и смоляные кислоты, танин, дубильные вещества, хлорорганические (ХОС) и фосфорорганические (ФОС) соединения и др.), либо на систему крови, например *гемолитики* (аммиак, соли аммония, свинец, селен и др.). ФОС, фториды, цианиды, азид натрия, некоторые детергенты и другие вещества действуют на разные ферментные системы и называются *энзиматическими ядами*.

Деление ядов на яды локального и яды резорбтивного действия чисто условное. Так, локально (местно) действующий формальдегид одновременно оказывает и нервно-паралитическое действие, и таких примеров немало.

Лабораторная работа 4

Симптомокомплекс при отравлении рыб ядами локального действия

Яды локального действия разрушают респираторный эпителий жабр, вплоть до полного отделения его от нитей жаберных пластинок, иногда вызывают кровотечение из жабр. Поражается кожа. Характерно обильное слизевыделение на жабрах и кожном покрове, нередко поражается роговица глаз. Наблюдается удушье. Рыба может гибнуть с широко раскрытым ртом и жабрами. Обратимость отравления рыб ядами локального действия невелика.

Задание: опытным путем выявить и описать симптомы отравления рыб, характерные для ядов локального действия.

Для работы необходимо: стеклянные емкости на 3–5 л – 3 шт., 10%-ный раствор КОН, 3%-ный раствор KMnO_4 , мерный цилиндр на 200 мл, пипетки на 10 мл – 2 шт., интактная (здоровая) рыба, сачок для отлова рыб, отстоянная аэрированная в течение 3-х суток водопроводная питьевая вода.

Методика исследования

В три аквариума налить отстоянную воду из расчета не менее 2 л на 1 рыбу весом 50 г. В воду первого аквариума добавить марганцовокислый калий из расчета 30 мг/л, во второй – КОН из

расчета 200 мг/л, осторожно перемешать растворы. Третий аквариум – контрольный.

В аквариумы посадить рыб. Сразу после посадки отметить характерные изменения в поведении опытных рыб (двигательная активность, дыхательная функция), состояние внешних покровов (изменение окраски, появление слизи, кровоизлияния и т. д.). После гибели рыбы произвести тщательный внешний осмотр, описать изменения, характерные для каждого токсиканта. Сопоставить результаты опыта с контролем.

Оформить протокол опыта. Сделать выводы о механизмах действия и специфичности симптомов отравления исследуемыми ядами.

Лабораторная работа 5

Симптомокомплекс при отравлении рыб ядами резорбтивного действия

Основное внимание при токсических воздействиях на водные организмы уделяется нарушениям деятельности нервной, пищеварительной, дыхательной систем у животных, и фотосинтеза – у растений.

Наглядным свидетельством нарушения деятельности нервной системы является отклонение поведенческих реакций. Отклонения в поведении животных проявляются в изменениях *общей двигательной активности* (ускорение или замедление движения), *характера перемещения* (нарушения координации, особенности занимаемых поз), *пищевых* (в том числе – активность фильтрации), *оборонительных реакций* (в том числе строительство жилища), *нерестового поведения, отношения к естественным факторам окружающей среды*. В условиях лабораторного исследования отмечается нарушение условнорефлекторной деятельности. Характерной реакцией рыб на раздражение жабр является так называемый «кашель рыб», широко используемый как тест-показатель в биотестировании.

Несмотря на различия в течение отравления рыб ядами нервно-паралитического действия, как правило, можно наблюдать определенные стадии, которые следуют одна за другой (на примере фенольного отравления).

Стадии фенольного отравления рыб

1-я стадия – начало беспокойства. При посадке рыбы в чистую воду она ведет себя беспокойно, мечется из стороны в сторону, учащается дыхательный ритм и т. д., однако, уже через 2–3 минуты успокаивается. При посадке рыбы в токсический раствор эти явления могут затянуться.

2-я стадия – первые признаки расстройства чувствительности. Для нее характерно поднятие лучей плавников, судорожное, но большей частью поверхностное дыхание. Нередко наблюдается неполное закрытие рта и легкое дрожание челюстей.

3-я стадия – стадия повышения или понижения раздражимости. При повышении раздражимости характерно стремительное плавание. Даже слабые внешние воздействия вызывают бурную реакцию рыб. Аналогичная реакция рыб наблюдается и на световое раздражение. Наоборот, при понижении чувствительности рыбы почти не реагируют на раздражение, безразлично относятся к свету, к прикосновению, инертно двигаются вместе с водой при ее переливании.

4-я стадия – первое расстройство равновесия. Наблюдается опрокидывание рыб на бок или спину. Различают следующие виды *потери равновесия*:

- при наличии раздражения сильно напрягаются плавники, что вызывает потерю способности к движению;
- при понижении чувствительности наступает сильное изменение тонуса мышц и паралич плавников, что вызывает опрокидывание на бок – «боковое положение»;
- паралич деятельности плавательного пузыря при сохранении деятельности плавников;
- полное расстройство «сознания», нет реакции ни со стороны глаз, ни со стороны плавников.

5-я стадия – полная потеря равновесия, полная атаксия. На этой стадии рыба внезапно опрокидывается на бок или спину. Это состояние, в зависимости от природы яда, может быть вызвано различными причинами.

Тщательное наблюдение за потерей рыбой равновесия очень важно и может дать материал для заключения о действии яда. При этом следует обращать внимание на следующие моменты:

- дышит ли рыба;
- подвижна ли она (дрожание, стремительное плавание, вялые или затруднительные движения или паралич);
- «сознает» ли рыба свое положение (движение глаз, компенсаторные движения плавников);
- наблюдаются ли судороги челюстей, хвоста или плавников, какова их частота, увеличивается ли она или уменьшается.

6-я стадия – агония. Полная потеря равновесия переходит постепенно в конечную стадию. Многие яды вызывают смерть путем удушья, нервно-паралитические яды вызывают паралич дыхательного центра. Рыбы, погибшие от паралича, имеют тусклую окраску, туловище после смерти часто изогнуто.

Трупное окоченение представляет собой полное отвердение тела и всех плавников. Иногда оно может наступить, когда дыхание еще продолжается. У таких рыб жаберные крышки и плавники могут двигаться несколько часов после того, как окоченеет хвост. Хроматофоры во время трупного окоченения исчезают, потом появляются вновь.

Задание: установить симптомы отравления рыб, характерные для ядов резорбтивного действия.

Для работы необходимо: стеклянные емкости на 3–5 л – 3 шт., 1%-ный раствор ФОС, 1%-ный раствор фенола, пипетки на 1 мл – 2 шт., на 5 мл – 2 шт., мерный цилиндр на 100 мл – 1 шт., груша резиновая, сачок для рыбы, здоровая рыба.

Методика исследования

В три аквариума налить отстоянную воду из расчета не менее 2 л на 1 рыбу весом 50 г. В воду первого аквариума добавить ФОС (метилацетофос или карбофос – эти пестициды широко применяются в качестве контактных инсектицидов и акарицидов) из расчета 250 мг/л., во второй – фенол из расчета 50 мг/л, осторожно перемешать растворы. Третий аквариум – контрольный (чистая вода). После растворения препаратов посадить рыбу и отметить время посадки. Тщательно запротоколировать поведение рыб, время наступления и продолжительность всех стадий отравления.

Оформить протокол. Сделать выводы.

Лабораторная работа 6

Симптомы отравления дафний пестицидами

Пестициды широко применяются в различных отраслях народного хозяйства. Огромные масштабы применения пестицидов приводят к загрязнению ими биосферы и, в частности, водных экосистем. Сложность защиты водоемов от загрязнения пестицидами заключается в том, что они могут поступать в них самыми различными путями. Некоторые пестициды намеренно вносят в водоемы при борьбе с личиночными стадиями кровососущих двукрылых, с нитчатыми и сине – зелеными водорослями, для уничтожения нежелательного вида рыб и моллюсков, при борьбе с сорняками на полях орошения.

Пестициды попадают в водоем также в результате сброса отходов с предприятий, производящих эти химические соединения. Особенно большую опасность представляет нерегулируемое попадание пестицидов в водоемы в результате стока с обработанных территорий с талыми или дождевыми водами, а также воздушными течениями, атмосферными осадками и мигрирующими животными.

Лабораторные эксперименты, направленные на выявление острой и хронической токсичности пестицидов для гидробионтов, дают представление о возможной опасности пестицидов для естественных водных экосистем.

Как в острых, так и в хронических опытах основным показателем токсичности является **гибель организмов**, а также иногда и **поведение животных** (двигательная активность, активность дыхания, реакция на корм и другие внешние раздражители). Так, например, низшие ракообразные при воздействии фосфорорганических пестицидов судорожно подергивают антеннами, вращаются вокруг своей оси, изменяют траекторию движения. Кроме того, фосфорорганические соединения, относящиеся к ядам нервно – паралитического действия, вызывают у гидробионтов однотипные симптомы отравления: возбуждение, расстройство координации движения, угнетение общего состояния и, наконец, паралич.

Задание: выявить симптомокомплексы и их специфичность при остром отравлении дафний ФОС (метилацетофосом или

карбофосом) и фенолом. Объяснить характер поведенческих реакций дафний, учитывая механизм действия веществ.

Для работы необходимо: культура дафний (*Daphnia magna*), 3 мерных стакана на 200 мл, отстоянная вода, маточные растворы химических веществ – токсикантов: 1%-ные растворы фенола и ФОС (карбофос или др.), пипетки химические на 5 мл, мерный цилиндр на 50 мл, стеклянная трубка или мельничный газ для отлова дафний, чашка Петри или химические стаканы на 50 мл для промывки трубки или сеточки для отлова рачков.

Методика исследования

В данной работе требуется провести наблюдение за состоянием и поведением дафний при остром отравлении их растворами ФОС в концентрации 250 мг/л и фенола в концентрации 50 мг/л.

В три стакана (один – контрольный с аквариумной водой, два других – со свежеприготовленными рабочими растворами исследуемых веществ) поместить по 3–5 взрослых особей дафний. Отметить время начала эксперимента. Постоянно наблюдая за поведением дафний в опытных сосудах, отметить время появления симптомов острого отравления: увеличение двигательной активности, нарушение траектории и характера движения, ограничение двигательной активности и гибель животных.

Сравнить поведение дафний в опытных растворах и в контроле.

Оформить протокол. Сделать выводы.

ТЕМА 4. ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ВОДНОЙ ТОКСИКОЛОГИИ

Контрольные вопросы

1. Роль гематологических исследований в диагностике отравлении рыб.
2. Изменение физико-химических свойств крови под влиянием токсических веществ.
3. Изменение физиологических свойств эритроцитов под влиянием химических веществ.
4. Патологические формы эритроцитов, появляющиеся при отравлениях.
5. Нормальная лейкоцитарная формула крови рыб.
6. Изменение лейкоцитарной формулы при отравлении различными химическими веществами.
7. Изменение общего количества лейкоцитов при различных отравлениях.
8. Токсические вещества, вступающие в реакцию с гемоглобином. Характеристики соединений гемоглобина с ядами.
9. Отравления веществами, взаимодействующими с ферментами крови и тканей.
10. Отравления различными пестицидами. Механизм действия пестицидов на системы крови.
11. Изменения свертывающей системы крови при интоксикациях.

При анализе гибели рыб в естественных водоемах необходимо использовать возможно более широкий набор тестов, позволяющих выявить природу токсиканта по функциональному состоянию организма.

Как при прямом контакте с покровными тканями, так и, особенно, после резорбции во внутренние среды организма яд может действовать на любые ткани (протоплазматические яды, наркотики) или лишь на некоторые из них. В последнем случае речь идет об *избирательном или элективном действии яда*. Избирательное действие яда на орган или систему органов определяет характерные черты клинической картины при той или иной интоксикации.

К наиболее часто встречающимся проявлениям токсического поражения системы крови относятся нарушение структуры и функции форменных элементов крови, проявляющееся в снижении устойчивости эритроцитов к гемолизу, карбокси- и метгемоглобинообразовании, уменьшении фагоцитарной активности лейкоцитов, появлении в крови патологических форм эритроцитов и т. д. (гематотоксическое действие).

Изменения в деятельности кроветворных органов проявляются в прогрессирующей лейкопении, тромбоцитопении и анемии. Нарушение гемопоэза наблюдается при длительном отравлении бензолом и его гомологами. Первичное токсическое действие на костный мозг сопровождается повреждением митохондрий и рибосом эритробластов и выбросом в кровь неполноценных эритроцитов (свинец, бензол, сероуглерод).

Лабораторная работа 7

Осмотическая резистентность эритроцитов как качественный показатель интоксикации

Продолжительность жизни эритроцитов относительно постоянна и возраст эритроцитов крови животных в каждый конкретный момент отражает динамическое равновесие систем кроветворения и кроверазрушения. Одной из общих защитных реакций организма на действие неблагоприятных факторов является усиление эритропоэза. Молодые эритроциты более резистентны к повреждающим агентам, чем старые.

Изменения в системе крови могут происходить при интоксикации вследствие изменения ***осмотического баланса*** в организме.

До тех пор, пока равновесие между водой и растворенными веществами (главным образом Na^+) не нарушается, объем и осмотическая концентрация внеклеточной и внутриклеточной жидкости остаются постоянными. Распределение воды между вне- и внутриклеточным пространствами зависит от действия осмотических сил.

• ***Осмотический гемолиз*** происходит при попадании эритроцитов в растворы, осмотическое давление которых ниже, чем в плазме крови — *гипотонические растворы*. При этом вода начинает поступать через полупроницаемую мембрану внутрь эритроцита. Клетки сначала набухают и затем разрываются.

Мерой осмотической стойкости (резистентности) эритроцитов является концентрация NaCl, при которой начинается гемолиз. Эту концентрацию принято обозначать, как границу осмотической резистентности эритроцитов.

Различают минимальную и максимальную границы осмотической стойкости. *Минимальная граница* означает концентрацию, при которой появляются первые признаки гемолиза (плазма начинает окрашиваться в розовый цвет). *Максимальная граница* осмотической стойкости – это первая концентрация раствора, при которой происходит полный гемолиз (плазма крови при этом окрашивается в красный цвет и становится прозрачной – «лаковая кровь»).

У человека гемолиз в норме начинается в 0,4% растворе, а в 0,34% растворе разрушаются все эритроциты.

Изменение соотношения между объемами внеклеточной и внутриклеточной жидкости имеет большое значение. Такие изменения могут наблюдаться при целом ряде интоксикаций: например, при поражениях сердца, печени (фенольная интоксикация) или почек (токсическая нефропатия, приводящая к отекам тканей, повышению артериального давления). Подобные изменения объемов водных пространств называют *гипергидратацией* (обводнение, набухание клеток и тканей) или *дегидратацией* (обезвоживание).

Изменение проницаемости клеточных мембран оказывается универсальным структурно-функциональным нарушением почти при всяком токсическом воздействии и может происходить за счёт прямого и опосредованного влияния токсиканта.

Первичным нарушение проницаемости оказывается при действии неэлектролитов и местном действии ионов тяжелых металлов. Причиной этих нарушений может быть как *непосредственная деструкция липопротеидов, так и нарушение работы ферментного комплекса*. Например, металлы, компоненты нефти, детергенты и другие загрязняющие агенты вызывают структурное повреждение жабр и *нарушают транспорт ионов*, что отражается на ионном составе крови. Возможно, что такое нарушение связано со снижением активности Na-K-активируемой АТФ-азы, обеспечивающей работу ионных насосов клеточных мембран, в том числе и эритроцитарных.

Для водных организмов важнейшим следствием изменения проницаемости клеточных мембран является нарушение осморегуляции.

• **Химический гемолиз** возникает вследствие попадания в организм химических веществ – «кровяных ядов» – гемолитиков, вызывающих разрушение белково-липидной оболочки эритроцитов (эфир, аммиак, алкоголь, соли аммония, свинец, селен и др.).

Таким образом, при некоторых интоксикациях осмотическая стойкость эритроцитов уменьшается, и гемолиз наступает при бóльших концентрациях солей в плазме. Следовательно, если в эксперименте происходит смещение границ гемолиза в сторону изотонической (физиологической) концентрации, то это является свидетельством отравления организма определенной группой ядов.

Резистентность эритроцитов можно определить различными способами. Наиболее часто определяют стойкость их к различным *гемолитическим веществам*.

И. И. Гительзон и И. А. Терсков (1957) разработали метод кислотных эритрограмм, позволяющий с большой точностью учитывать распределение эритроцитов по их способности к гемолизу под воздействием соляной кислоты. Получаемую кривую распределения эритроцитов по стойкости они назвали эритрограммой. В первую очередь гемолизируются наименее резистентные эритроциты. В последнюю очередь – наиболее устойчивые. Получается ряд данных, на основе которых строится график распределения эритроцитов по их устойчивости к гемолизу во времени – эритрограмма. Таким образом, *метод кислотных эритрограмм* дает возможность *выявить нарушения в эритропоэзе рыб под действием яда на самых ранних этапах токсического процесса* и используется для определения токсических веществ с выраженным гемолитическим действием.

Задание: определить границы осмотической резистентности эритроцитов крови интактных и опытных животных. Сравнить полученные данные.

Для работы необходимо: препаративный набор, физиологический раствор для холоднокровных (0,65%-ный раствор хлорида натрия), 1%-ный раствор хлорида натрия, 5%-ный раствор цитрата натрия, дистиллированная вода, кровь лягушки или

рыбы, после острой (48 часов) затравки в растворе аммиака (0,2 мг/л), кровь интактных животных, штатив для пробирок – 2 шт., химические пробирки – 16 шт., маленькие пробирки – 2 шт., карандаш по стеклу, пипетки химические на 10 мл – 4 шт., пипетки глазные – 2 шт., капилляр от гемометра Сали, стеклянная палочка, груша резиновая, фильтровальная бумага.

Методика исследования

В маленькую пробирку поместить 0,1 мл 5%-ного раствора цитрата натрия, 0,5 мл физиологического раствора. Произвести забор крови у животного капилляром от гемометра Сали и поместить в эту же пробирку.

Пронумеровать 8 химических пробирок (для одного опыта) и приготовить растворы хлористого натрия разных концентраций, используя табл. 4.

Таблица 4

Схема приготовления растворов хлористого натрия разных концентраций

<i>№ пробирок</i>	<i>1%-ный раствор NaCL (мл)</i>	<i>Дистиллированная вода (мл)</i>	<i>Полученная концентрация раствора NaCL (в %)</i>
1	4,5	0,5	0,9
2	4,0	1,0	0,8
3	3,5	1,5	0,7
4	3,0	2,0	0,6
5	2,5	2,5	0,5
6	2,0	3,0	0,4
7	1,5	3,5	0,3
8	1,0	4,0	0,2

В каждую пробирку глазной пипеткой добавить по 3 капли цитратной крови (можно не перемешивать). Пробирки оставить в штативе на 1 час (или центрифугировать в течение 5 минут).

О наличии гемолиза и его степени можно судить по изменению окраски растворителя и плотности осадка эритроцитов. Окрашенный осадок эритроцитов и неокрашенный раствор указывают на *отсутствие гемолиза*. Наличие окрашенного непро-

зрачного раствора свидетельствует о *частичном гемолизе*. Отсутствие осадка эритроцитов и окрашенный прозрачный раствор означают, что произошел *полный гемолиз*.

Через один час проанализировать состояние растворов в пробирках. (*Не встряхивать!*)

Данные занести в табл. 5. В таблице сделать заключение о наличии (+), отсутствии (–) или частичном гемолизе (±). Отметить концентрации растворов, соответствующие минимальной (min) и максимальной (max) осмотической резистентности эритроцитов.

Таблица 5

**Результаты исследования
осмотической резистентности эритроцитов**

Концентрация раствора (%)	Окраска раствора		Осадок эритроцитов		Заключение		Границы стойкости (резистентности) эритроцитов	
	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт	контроль	опыт
0,9 0,8 и т. д.								

По результатам анализа контрольного и опытного образцов крови сделать выводы. Обосновать значение данного метода в токсикологии и клинической практике.

Лабораторная работа 8

**Патологические формы клеток крови рыб
после воздействия токсических веществ**

Многие токсиканты при хроническом воздействии на рыб вызывают патологические изменения красной и белой крови. Так, например, ароматические углеводороды (бензол, толуол, ксилол и т. д.) в субтоксических концентрациях вызывают увеличение уровня гемоглобина, числа эритроцитов (на 500–700 тыс. / мм³).

На различных стадиях отравления **форменные элементы красной и белой крови** подвергаются *деформации*, массовому разрушению, изменениям в оболочке (сморщивание, разрушение, изменение порозности), *цитоплазме* (набухание, изменение зернистости и степени окраски, вакуолизация и др.) и *ядре* (изменение структуры и окраски, кариорексис, обесцвечивание ядерного вещества, деление, выталкивание ядер и др.).

Кровь под влиянием некоторых токсических веществ наводится амитотически делящимися формами эритроцитов, патологическими ядерными и безъядерными тельцами эритроцитарного и лимфоидного происхождения. Среди эритроцитов может наблюдаться **анизоцитоз, пойкилоцитоз, шистоцитоз, полихромазия** и другие патологические формы. Такие изменения можно наблюдать в крови плотвы при выдерживании ее в течение недели в воде с концентрацией бензола 4,0–5,0 мг/л с ежедневной заменой раствора. Метилнитрофос в сублетальных концентрациях (5 мг/л) вызывает повышение в крови нейтрофилов (в 1,5 раза) и качественные изменения форменных элементов крови: анизоцитоз, пойкилоцитоз, полихромазию и патологические ядерные и безъядерные формы. В протоплазме лейкоцитов наблюдается сильная вакуолизация.

Субтоксические концентрации трихлорметафоса для карпа 40 мг/л, вызывают изменения процентного соотношения лейкоцитов в лейкоцитарной формуле: резко увеличивается содержание моноцитов, полиморфных клеток и нейтрофилов (в 4–7 раз). Ядра эритроцитов набухают, позднее наблюдается сильная вакуолизация протоплазмы лейкоцитов, особенно моноцитов и нейтрофилов.

Задание: изучить заранее приготовленные и окрашенные по способу Романовского – Гимза мазки крови контрольных и опытных рыб.

Для работы необходимо: мазки крови контрольной и затравленной рыбы, микроскоп с иммерсией, масло кедровое, чашка Петри, мерный стаканчик на 50 мл, краска Романовского, дистиллированная вода, пипетки глазные, тазик почкообразный, предметное стекло, атлас клеток крови, таблица патологических изменений клеток крови.

Методика исследования

Окраска мазков по Романовскому – Гимза.

Для получения хорошей окраски мазков крови методом Романовского – Гимза необходима совершенно чистая посуда и дистиллированная вода, реакция которой близка к нейтральной.

Для приготовления красящего раствора в мерный стаканчик емкостью 50 мл наливают 10 мл дистиллированной воды нейтральной реакции. После этого из пипетки в стаканчик быстро добавляют исходный раствор краски Романовского – Гимза аптечного приготовления из расчета на 10 мл воды 10 капель краски. Стаканчик встряхивают, добиваясь перемешивания жидкостей. Долго взбалтывать не рекомендуется, так как краска легко выпадает в осадок.

Для окраски на дно чашки Петри помещают половинки разломанного предметного стекла, которые раздвигают друг от друга. Сверху помещают стекло с мазком так, чтобы мазок был обращен вниз. Между мазком и дном чашки Петри возникает пространство. Пипеткой под стекло с мазком наливают приготовленный раствор краски до тех пор, пока он не заполнит все пространство между мазком и дном чашки Петри. Окрашивают в течение 30–45 минут, после чего мазок споласкивают струйкой дистиллированной воды и обсушивают на воздухе. Через несколько минут после высыхания на мазок наносят каплю кедрового масла и исследуют его под микроскопом.

Для окрашивания каждого мазка готовят свежий раствор краски, иначе при отстаивании быстро выпадает осадок и краска становится непригодной к употреблению.

Мазки следует рассматривать при малом увеличении, затем при большом увеличении и, наконец, с масляной иммерсией.

Изучить представленные препараты, зарисовать патологические формы клеток крови (использовать атлас клеток крови и таблицу патологических изменений клеток крови).

Оформить протокол опыта. Сделать выводы.

ТЕМА 5. ВЛИЯНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ НА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТУЮ СИСТЕМУ

Контрольные вопросы

1. Изменения в электрокардиограмме при нарушениях возбудимости сердца. Формы нарушений возбудимости.
2. Изменения в электрокардиограмме при нарушениях проводимости в разных отделах сердца.
3. Влияние избытка минеральных солей (K^+ , Ca^{++} , Na^+) на работу сердца.
4. Влияние фосфорорганических пестицидов на работу сердца и кровеносных сосудов.
5. Влияние фенолов на работу сердца и кровеносных сосудов.
6. Влияние алкалоидов и гликозидов на работу сердца.

5.1. Влияние промышленных ядов на сердечно-сосудистую систему

Поражения сердечно-сосудистой системы при интоксикациях промышленными ядами проявляется в вегетативно-сосудистой дисфункции, дистрофии миокарда, очаговых органических поражениях сердца и сосудов.

Некоторые этиленовые углеводороды вызывают *спазм периферических сосудов* (например, симптом «мертвого пальца»), для эфиров азотистой кислоты типичен быстрый и резкий *сосудорасширяющий эффект*, ведущий к быстрому падению кровяного давления. Дистрофии миокарда, обусловленные *нарушением биохимических и биоэнергетических процессов в мышце сердца*, нередко при отравлениях соединениями фосфора, мышьяка, динитробензола, эфирами фосфорной кислоты и др.

Растворимые соли бария оказывают на миокард действие, подобное препаратам наперстянки, что связывают с местными *нарушениями минерального обмена*.

Вторичные *изменения миокарда* могут быть следствием острого или хронического поражения нервной системы и органов дыхания. Так, бензол, органические соединения ртути, свинец снижают резистентность капилляров, вызывают жировую дистрофию внутренней оболочки сосудов. Мышьяк обладает выра-

женным *капилляротоксическим* действием; воздействуя через вегетативную нервную систему и непосредственно на стенку сосудов, он вызывает паралич капилляров и увеличение их проницаемости. Дегенеративными изменениями в сосудах миокарда объясняется избирательное действие на сердце соединений кобальта.

5.1.1. Фосфорорганические соединения (ФОС)

Фосфорорганические соединения (ФОС) широко применяются в сельском хозяйстве в качестве пестицидов: инсектицидов, акарицидов, фунгицидов, гербицидов, дефолиантов, десикантов, родентицидов. ФОС используются для обработки садов, виноградников, овощебахчевых и технических зерновых и зернобобовых культур, в животноводстве – для борьбы с эктопаразитами животных.

Кроме того, к ФОС относятся боевые отравляющие вещества из группы «нервных ядов» (Ви-газы), имеющиеся на вооружении армий многих стран мира.

Описание клинических проявлений отравлений, аналогичных воздействию ФОС, впервые приведено еще в XVII в. мореплавателем Куком и английским путешественником Левингтоном. По свидетельству последнего в Калабаре (Нигерия) с древних времен было известно ядовитое действие бобов вьющегося растения *Physostigma venenosum*. В его семенах содержится чрезвычайно ядовитый алкалоид физостигмин (эзерин). Эти бобы служили в Калабаре средством испытания людей, обвиненных в колдовстве, воровстве и других пороках. При вершении суда (отсюда название – «судилищные бобы») обвиненному публично предлагали съесть определенное их количество. Если обвиненный выживал, то его оправдывали, однако чаще он умирал от постепенно нарастающего паралича дыхательных мышц.

Отравление эзеринном было подробно описано в первом руководстве по токсикологии на русском языке (Пеликан Е., 1878). Однако механизм токсического действия эзерина был раскрыт только во втором десятилетии XX в., которое ознаменовалось открытием фермента **холинэстеразы**. Установлено, что физостигмин блокирует этот фермент и вызывает нарушение проведения нервных импульсов в центральной и периферической нервной системах. Такие яды получили название *антихолинэстеразных*

веществ, а само открытие было использовано для получения синтетических заменителей физостигмина. Были обнаружены и другие антихолинэстеразные яды группы ФОС, механизм действия которых аналогичен действию физостигмина.

Важным свойством ФОВ является их малая стойкость, обусловленная способностью быстро в течение нескольких суток гидролизоваться в щелочной среде (почве), а также при действии высокой температуры. Однако в кислых почвах или при наличии слабокислой среды в растениях и животных тканях некоторые ФОВ сохраняются более длительно – до нескольких месяцев.

Под влиянием физических и химических факторов внешней среды ФОВ претерпевают своеобразные изменения – изомеризацию, трансалкилирование, в процессе которых образуются более активные и токсичные соединения. Эти реакции могут наблюдаться при хранении ФОВ в их водных растворах. Например, при температуре 35°C в течение одного дня токсичность метилмеркаптофоса увеличивается в 30 раз. Летальная доза для человека при применении внутрь метафоса – 0,2–2,0 г, карбофоса, хлорофоса, трихлорметафоса – 5,0–10,0 г. При ингаляционном поступлении наиболее токсичны меркаптофос, метафос, смертельные концентрации которых меньше 20 мг/м³. Менее токсичны фосфамид, метилацетофос, хлорофос, карбофос. Смертельная концентрация этих препаратов – в пределах от 20 до 100 мг/м³, пороговая – от 3 до 30 мг/м³.

Большинство ФОВ обладают высокой летучестью, тяжелее воды, хорошо растворимы в органических растворителях (кислота, толуол, ацетон, хлороформ и т. д.) и плохо растворимы в воде. Однако некоторые препараты (хлорофос, метилацетофос, карбофос и др.) растворимы в воде. Хорошая жирорастворимость ФОВ обуславливает их *свободное проникновение через неповрежденную кожу, различные биологические мембраны, гематоэнцефалический барьер*.

Ведущим звеном в механизме действия ФОВ на биологические структуры и, в частности, на организм человека является *нарушение каталитической функции ферментов холинэстераз*. Вследствие этого возникает расстройство обмена ацетилхолина, выражающееся в характерных изменениях функции центральной

и вегетативной нервной системы, а также в нарушениях деятельности внутренних органов и скелетной мускулатуры.

Ацетилхолин является медиатором ЦНС, участвует в передаче импульсов с двигательных нервов на мышцы, во всех ганглиях (как парасимпатических, так и симпатических). Ацетилхолин накапливается в окончаниях нервных волокон и под влиянием нервных импульсов вызывает деполяризацию мембран. Изменение их проницаемости для ионов K^+ и Na^+ лежит в основе передачи нервного импульса. Эти процессы реализуются в течение доли миллисекунды, их прерывистость обусловлена быстрым гидролизом ацетилхолина ферментом холинэстеразой (ХЭ). При взаимодействии ХЭ и ацетилхолина образуется ацетилированный фермент – непрочное соединение, быстро подвергающееся гидролизу, в результате чего активные центры ХЭ освобождаются для новых реакций с ацетилхолином. При взаимодействии ХЭ с ФОВ образуется устойчивый к гидролизу фосфорилированный фермент, неспособный взаимодействовать с молекулами ацетилхолина и утративший основную каталитическую функцию.

5.2. Влияние ядов биогенного происхождения на сердечно-сосудистую систему

Ассортимент загрязняющих веществ биогенного происхождения широк и разнообразен. Токсическим действием обладают различные антибиотики, алкалоиды, гликозиды, и, в соответствующих концентрациях, обычные продукты жизнедеятельности гидробионтов. Многие из таких соединений по своей химической структуре сходны с самыми активными биоцидами антропогенного происхождения.

Со сточными водами или при специальном применении в водные объекты могут попадать такие ядовитые вещества ***растительного происхождения*** как *алкалоиды*: никотин, анабазин, кофеин, стрихнин, атропин, конин и др.

При «цветении» вод в результате интенсивного развития водорослей образуются большие массы органического вещества, в том числе токсичного. Особое значение в пресных водоемах и морях имеет цветение сине-зеленых водорослей (цианобактерий). Цианобактерии видов *Microcystis aeruginosa*, *M. toxica*, *M. flos-*

aquae, Aphanizomenon flos-aquae, Anabaena flos-aquae, A. Variabilis, Gloeotrichia echinulata, Rivularia fluitans, Nodularia spumigena выделяют вещества, которые являются причиной заболеваний и гибели рыб, беспозвоночных и околотовных животных, а также токсикозов и аллергических заболеваний человека. Токсины сине-зеленых водорослей представляют собой *алкалоиды*, по химическому и патологическому эффектам близкие к термостабильному яду гриба бледной поганки, и обладают *протоплазматическим*, а некоторые *гемолитическими кардиотоксическим* действием.

Токсичными для гидробионтов оказываются широко распространенные в природе (в соке и смоле хвойных деревьев) камфора, тимол, ментол и другие терпены (непредельные углеводороды), а также эфирные масла из сосновой смолы и канифоли.

Смола растений (особенно из хвои сосны) состоит из смеси смоляных кислот, древесного спирта, ароматических альдегидов, эфиросодержащих масел и других соединений. Токсичными для рыб являются продукты выщелачивания древесины и коры (лигнины, сапонины), продукты, выделяемые из хвойной смолы и ягод (эфирные масла туи).

Эти вещества загрязняют воду в результате лесосплава или при попадании в воду листового и хвойного опада. Все они действуют преимущественно как *нервные яды*.

5.2.1. Алкалоиды

Алкалоиды – (лат. alcali, – щелочь, араб. algali – растительная зола и греч. eides – вид) – азотсодержащие органические соединения природного, преимущественно растительного, происхождения, обладающие свойствами оснований и физиологической активностью. Многие алкалоиды токсичны, некоторые (например, кофеин, резерпин и др.) применяют в качестве лекарственных средств.

Атропин – алкалоид, содержится в различных растениях семейства пасленовых: красавке (белладонне), белене, дурмане.

Красавка – белладонна (*Atropa belladonna*) – многолетнее культивируемое травянистое растение, содержащее алкалоиды группы атропина (гиосциамин, скополамин, апоатропин и др.). Фармакологические свойства красавки совпадают в основном со свойствами атропина. Применяется при спазмах гладкой мускулатуры, при брадикардии в связи с перевозбуждением блуждающего нерва и т. п.

Антихолинергическое (холинолитическое, холиноблокирующее) средство, блокирующее преимущественно периферические холинореактивные системы, — антагонист холинорецепторов. Способность атропина связываться с холинорецепторами объясняется наличием в его структуре фрагмента, роднящего его с молекулой эндогенного лиганда — ацетилхолина. Блокируя М-холинорецепторы, он делает их нечувствительными к ацетилхолину, образуемому в области окончаний постганглионарных парасимпатических (холинергических) нервов. Эффекты действия атропина противоположны поэтому эффектам, наблюдающимся при возбуждении парасимпатических нервов.

Введение атропина в организм сопровождается учащением сердечных сокращений, понижением тонуса гладкомышечных органов (bronхи, органы брюшной полости и др.), уменьшением секреции слюнных, желудочных, потовых и бронхиальных желез. Под влиянием атропина происходит сильное расширение зрачков. Мидриатический эффект зависит от расслабления волокон круговой мышцы радужной оболочки, которая иннервируется парасимпатическими волокнами. В больших дозах атропин стимулирует кору головного мозга и может вызвать двигательное и психическое возбуждение, судороги, галлюцинации, иногда паралич дыхания (психотропное, нейротоксическое действие). Атропин как реактив аторхолинэстеразы является эффективным антидотом при отравлениях холиномиметическими и антихолинэстеразными веществами, в том числе ФОС.

Кофеин — алкалоид, содержащийся в листьях чая (около 2%), семенах кофе (1–2%), орехах кола. Получают также синтетическим путем. Средство, стимулирующее ЦНС (психостимулирующие средства). Сердечная деятельность под влиянием кофеина усиливается, сокращения миокарда становятся более интенсивными и учащаются. Применяют кофеин при заболеваниях, сопровождающихся угнетением функций ЦНС и сердечно-сосудистой системы, при отравлениях наркотиками и другими ядами, угнетающими ЦНС. В механизме действия кофеина большую роль играет его угнетающее влияние на фермент фосфодиэстеразу, который тормозит выработку циклического аденозинмонофосфата (Ц-АМФ). Циклический АМФ, являясь вторичным медиатором, стимулирует метаболические процессы (выход Ca^{++}

и повышение чувствительности к катехоламинам) в разных органах и тканях, в том числе в мышечной ткани и в ЦНС.

5.2.2. Гликозиды

Гликозиды – (глик-, глико-, глюк-, глюко- от греч. glykys сладкий) – в сложных словах означает «сладкий, сахар, глюкоза». Сложные органические соединения типа эфиров, расщепляющиеся при гидролизе на сахара (гликоны) и бессахаристую часть (агликоны или генины). К растениям, содержащим сердечные гликозиды, относятся разные виды наперстянки (дигиталис), горицвета, ландыш, разные виды желтушника, строфанта, морозник и т. д. В больших дозах сердечные гликозиды могут вызывать рвоту (влияние на рвотный центр и хемочувствительные рецепторные зоны), понос, нарушения деятельности ЦНС (головная боль, беспокойство, бессонница, депрессивные явления, нарушения зрения, резкая брадикардия, экстрасистолия, трепетание желудочков и остановка сердца). Токсичные дозы вызывают угнетение Na^+ - K^+ -насоса, потерю внутриклеточного калия, следствием чего является аритмия.

Наперстянка (*Digitalis purpurea*) – двулетнее травянистое растение, листья которого содержат сердечные гликозиды (дигитоксин и гитоксин), сапонины и другие вещества. **Гликозиды наперстянки** отличаются наибольшей стойкостью в организме по сравнению с другими сердечными гликозидами, медленно выводятся из организма и характеризуются высокой степенью кумуляции. Применяется при нарушениях ритма сердца. При передозировке могут приводить к резкой брадикардии, экстрасистолии. Токсические дозы могут вызывать трепетание желудочков и остановку сердца. При отравлении препаратами дигиталиса назначают атропин, кофеин, калий хлорид, унитиол.

Ландыш (*Convallaria*) – многолетнее травянистое растение семейства лилейных. Все части растения содержат гликозиды, близкие по химическому строению к гликозидам наперстянки. Основные гликозиды ландыша – конваллятоксин и конваллязид, отличаются малой стойкостью и не обладают кумулятивным эффектом. Препараты ландыша часто применяются в сочетании с препаратами валерианы и боярышника. При попадании в кровь препараты ландыша оказывают быстрое и сильное влияние на сердечную деятельность.

Лабораторная работа 9

Работа сердца при отравлениях алкалоидами и гликозидами

Задание: установить методом кардиографии влияние токсических доз алкалоидов (кофеина, атропина) и сердечных гликозидов (строфантина, настойки ландыша) на сердечную деятельность лягушки.

Для работы необходимо: лягушка, препаровальный набор, шприц на 2 мл, ампульные растворы кофеина 10% – 1,0 мл и строфантина 0,05% – 1,0 мл, настойка ландыша и красавки, раствор Рингера, весы для взвешивания лягушек, установка для фотоэлектрической регистрации кардиограммы (штатив с фотопреобразователем и серфинкой, блок питания, самописец (регистратор Н-338), пипетки химические на 1 мл – 1 шт., стаканчики на 50 мл – 2 шт., глазные пипетки – 3 шт.

Методика исследования

Для выполнения работы у лягушки разрушить спинной и головной мозг зондом, поместить на препаровальную доску брюшной поверхностью вверх и зафиксировать за лапки булавками. Обнажить сердце. Осторожно, чтобы не повредить сердце (особенно венозный синус), срезать перикард, перерезать или взять на лигатуру уздечку.

Верхушку сердца захватить небольшой серфинкой, которая ниткой соединяется с рычажком фотоэлектрического преобразователя (преобразователь укрепляется в штативе над сердцем). Отрегулировать усиление на самописце так, чтобы амплитуда отклонения пера самописца при полном нажатии рычажка фотопреобразователя была в пределах 1,5–2 см. Наладить графическую регистрацию сокращений сердца при оптимальной скорости движения ленты. Во избежание подсыхания поверхности сердца периодически орошать его раствором Рингера.

Записать исходную кардиограмму(контроль). Не прекращая регистрации, нанести на сердце несколько капель исследуемого раствора – раствора кофеина или настойки ландыша определенной концентрации (ампульные и аптечные растворы разводить раствором Рингера в соотношении 1:10; 1:5; 1:1, начинать

эксперимент с меньшей концентрации (т. е. большего разведения). Отметить момент нанесения испытуемого раствора на кардиограмме. После каждого воздействия отмывать сердце раствором Рингера и контролировать амплитуду отклонения пера самописца (не допускать «всплывания» сердца). Повторить эксперимент с другим исследуемым веществом.

Проанализировать кардиограммы, полученные при воздействии растворов алкалоидов и гликозидов разных концентраций по сравнению с контролем (раствором Рингера). Отметить наличие аритмий, рассчитать изменение частоты (количество сокращений в минуту (уд./мин.) и силы сердечных сокращений (амплитуда отклонения пера самописца в мм). Сравнить результаты. Обосновать изменения в работе сердца, используя знания о механизмах действия исследуемых веществ.

Оформить протокол. Сделать выводы.

Лабораторная работа 10

Влияние ФОС и фенола на работу сердца

Задание: изучить работу сердца при воздействии растворами метилацетофоса (концентрация 250 мг/л), карбофоса (250 мг/л), фенола (50 мг/л) методом Штрауба.

Для работы необходимо: препаровальный набор, глазные ножницы, шелк, канюля Штрауба, штатив с лапками для крепления канюли, пастеровская пипетка с резиновой грушей, установка для фотоэлектрической регистрации кардиограммы (универсальный штатив с фотопреобразователем и серфинкой, блок питания, регистратор Н-338), раствор Рингера, растворы фенола (50 мг/л) и карбофоса (250 мг/л).

Методика исследования

Работа выполняется на сердце, изолированном по методу Штрауба. У лягушки разрушить центральную нервную систему, зафиксировать на препаровальной дощечке брюшком вверх и обнажить сердце. Подвести лигатуры под аорту до ее разветвления (1), под правую дугу аорты (2), под венозный синус (3), под корни обоих легких (эти лигатуры перевязать сразу).

Лягушку повернуть головой к себе и, слегка натягивая лигатуру 2, сделать надрез дуги аорты примерно посередине

между лигатурой и разветвлением аорты. Надрез сделать под углом в 45° и не больше, чем на половину ширины сосуда. В разрез сосуда быстро ввести кончик канюли Штрауба, частично заполненный раствором Рингера. Кончик канюли легко продвинуть в полость желудочка так, чтобы желобок ее тонкого конца пришелся под лигатуру 1. Попадание канюли в желудочек всегда сопровождается появлением в растворе Рингера фонтанчика крови. Если при введении канюля встречает препятствие, то значит, ее кончик уперся в канал из полулунных клапанов, в этом случае канюлю вытащить и во время систолы сердца ввести вновь. Осторожно, не изменяя положения канюли, завязать лигатуру 1 вокруг шейки. Если канюля вставлена правильно, то при вертикальном положении препарата жидкость из канюли во время диастолы поступает в желудочек сердца, раздувая его, а во время систолы уровень жидкости в канюле поднимается.

Перевязать венозный синус (лигатура 3) и вырезать сердце из организма. Полые вены срезать на уровне синуса, перевязать обе дуги аорты, сосуды обоих легких и другие ткани. Укрепить в штативе канюлю с сердцем и промыть его полость. Для этого с помощью пастеровской пипетки сменить несколько раз раствор Рингера в канюле. Во всех случаях уровень жидкости должен быть в канюле постоянным.

С помощью рычажка Энгельмана и фотоэлектрического преобразователя наладить графическую регистрацию сокращений изолированного сердца на регистраторе Н-338 и записать исходную кардиограмму. Заменить раствор в канюле на раствор Рингера, содержащий ФОС, и вновь записать кардиограмму. Затем отмыть сердце раствором Рингера. Спустя 5 минут повторить опыт с другим веществом.

Оформить протокол опыта, вклеить отрезки кардиограммы в тетрадь, рассчитать частоту (количество сокращений в минуту) и силу сердечных сокращений (амплитуда отклонения пера самописца в мм) при воздействии каждого из исследуемых токсических веществ. Сравнить полученные результаты. Сделать выводы.

Список литературы

1. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учеб. пособие для вузов / под ред. О. П. Мелеховой, Е. И. Егоровой. – М.: Академия, 2007. – 288 с.
2. Биотестирование: метод. указания /сост.: Е. В. Рябухина, С. Л. Зарубин. – Ярославль: ЯрГУ, 2006. – 47 с.
3. Каплин, В. Г. Основы экотоксикологии: учеб. пособие для вузов / В. Г. Каплин. – М.: КолосС, 2007. – 232 с.
4. Лукьяненко, В. И. Общая ихтиотоксикология / В. И. Лукьяненко. – Москва, 1983. – 320 с.
5. Филенко, О. Ф. Основы водной токсикологии / О. Ф. Филенко, И. В. Михеева. – М.: Колос, 2007. – 144 с.

Оглавление

ТЕМА 1. СИСТЕМА ВОДОПОЛЬЗОВАНИЯ.....	3
1.1. Виды водопользования	3
1.2. Нормы качества поверхностных вод. Система ПДК	4
1.3. Биологические методы оценки качества водной среды	6
ТЕМА 2. ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ НА КАЧЕСТВО ВОДЫ И ТОВАРНОЕ КАЧЕСТВО РЫБЫ.....	10
2.1. Характер влияния загрязняющих веществ на водоемы и водные организмы (ЛПВ)	10
2.2. Критерии оценки качества воды.....	13
2.3. Особенности предварительной оценки и установления расчетных ПДК веществ, обладающих запахом, привкусом и раздражающим действием.....	17
Лабораторная работа 1	19
2.4. Патолого-анатомическое и органолептическое исследование рыбы.....	21
Лабораторная работа 2.....	23
Лабораторная работа 3.....	26
ТЕМА 3. ДИАГНОСТИКА ОТРАВЛЕНИЯ РЫБ И ДРУГИХ ГИДРОБИОНТОВ	27
Лабораторная работа 4.....	29
Лабораторная работа 5.....	30
Лабораторная работа 6.....	33
ТЕМА 4. ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ВОДНОЙ ТОКСИКОЛОГИИ.....	35
Лабораторная работа 7.....	36
Лабораторная работа 8.....	40
ТЕМА 5. ВЛИЯНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ НА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТУЮ СИСТЕМУ	43
5.1. Влияние промышленных ядов на сердечно-сосудистую систему.....	43
5.2. Влияние ядов биогенного происхождения на сердечно-сосудистую систему.....	46
Лабораторная работа 9.....	50
Лабораторная работа 10.....	51
Список литературы.....	53

Учебное издание

БИОТЕСТИРОВАНИЕ И ВОДНАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ

Методические указания

Составители:

**Рябухина Елена Валериевна,
Фомичева Елена Михайловна**

Редактор, корректор М. В. Никулина
Правка, верстка М. В. Никулина

Подписано в печать 11.10.2012. Формат 60×84¹/₁₆. Гарнитура
«TimesNewRoman». Бумага офсетная.
Усл. печ. л. 3,25. Уч.-изд. л. 2,4. Тираж 20 экз. Заказ

Оригинал-макет подготовлен
в редакционно-издательском отделе
Ярославского государственного университета
им. П. Г. Демидова.

Отпечатано на ризографе.

Ярославский государственный университет
им. П. Г. Демидова.
150000, Ярославль, ул. Советская, 14.