

ПОЛЕВОЙ МЕТОД КОМПЛЕКСНОЙ ОЦЕНКИ АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВ И ГРУНТОВ НА ТЕРРИТОРИЯХ АВТОНОМНЫХ ПОСЕЛЕНИЙ В АРКТИКЕ

канд. хим. наук *Е.Д.ДОБРОТИНА*,
канд. мед. наук *Ш.Б.ТЕШЕБАЕВ*

¹ ГНЦ РФ Арктический и антарктический научно-исследовательский институт, ЛНМИСО Центра полярной медицины, г. Санкт-Петербург, e-mail: aaricoor@aari.nw.ru

Разработана методика для проведения комплексной оценки антропогенного загрязнения арктических почв и грунтов в условиях, приближенных к полевым. Уровень антропогенной нагрузки оценивается по содержанию в почве органических веществ, определяемому по совокупности тестов с диазотированной сульфаниловой кислотой и раствором нингидрина.

Ключевые слова: антропогенная нагрузка, реакция азосочетания, нингидриновая реакция.

Развитие промышленности, а также расширяющееся использование биосферы и ее ресурсов приводят к возрастающему вмешательству человека в материальные процессы, протекающие на планете. Важнейшим фактором, влияющим на течение биогеохимических процессов и их развитие, становится антропогенная нагрузка, оценка уровня и выраженности которой позволяет прогнозировать динамику изменений в изучаемых природных объектах. Поэтому все большее значение приобретает мониторинг окружающей среды, отслеживающий качественный и количественный характер антропогенной нагрузки. В этом направлении ведутся углубленные исследования как зарубежными, так и отечественными учеными. Однако предлагаемые к реализации методики требуют, как правило, применения сложных в технологическом отношении специализированных операций, требующих специальной химико-аналитической подготовки у исследователя или использования дорогостоящего аналитического оборудования, к работе на котором могут допускаться только высококвалифицированные специалисты-химики. Обычно вывод о степени загрязнения делается или на основании определения какого-либо одного параметра (элемента), доминирующего в данном регионе (например, тяжелые металлы или радиационное загрязнение и т.д.) или по результатам комплексного обследования, требующего наличия хорошо оснащенной лаборатории (анализатор биогенных элементов, нефтеуглеводородов, хроматограф и т.д.). Оба этих подхода широко используются и вполне оправданы при решении конкретных задач, но в полевых условиях имеют свое преимущество пусть менее точные, но простые и быстрые тесты.

Целью нашей работы является создание унифицированных экспресс-методик для контроля антропогенного воздействия на объекты природной среды высокоширотных территорий, выполнение которых было бы доступно любому исследователю, не имеющему специальной квалификации и оборудования, в условиях, приближенных к полевым.

По-видимому, значимым признаком антропогенной нагрузки можно считать наличие в почве или воде органических веществ, как промышленного происхождения (нефтепродукты, фенолы, амины), так и продуктов метаболизма человека и животных. Представляется актуальной проблема разработки простых методов качественной оценки комплексного органического загрязнения. Существующие методы анализа органических загрязнений, как правило, непригодны для использования в полевых условиях.

Мы предполагаем, что важным признаком антропогенной нагрузки можно считать наличие следов биологической контаминации (наблюдающихся в местах постоянного и временного проживания человека). Оценивать наличие и степень выраженности данного фактора предполагается с использованием ряда показательных качественных реакций, указывающих на присутствие в исследуемых пробах продуктов жизнедеятельности человека. Предложенные в литературе [1] методы определения следов мочи и экскрементов в почве весьма длительны и трудоемки и не могут быть рекомендованы для экспертной экспресс-оценки в полевых условиях.

Согласно литературным данным [3, 5, 6], продукты жизнедеятельности представляют собой сложную смесь органических и неорганических веществ и содержат аминокислоты, фрагменты белков, ароматические амины, порфирины и родственные соединения, стероиды, фенолы, мочевину. Известны достаточно простые и наглядные методы обнаружения ароматических аминов, фенолов и азотистых гетероциклов, способных вступать в реакцию азосочетания в качестве азосоставляющих [2, 10–13]; также широко применяется на практике обнаружение аминокислот с помощью нингидрина [8–10, 12].

В связи с этим мы предлагаем использовать для индикации антропогенной нагрузки совокупность тестов проб воды (или водной вытяжки из пробы почвы) с диазотированной сульфаниловой кислотой и раствором нингидрина. Простая, показательная методика, легко выполняемая в полевых условиях натурных исследований, позволит эксперту за короткий срок получить необходимые объективные результаты о характере и интенсивности антропогенного воздействия на изучаемые объекты природных экосистем и даже сделать вывод об источниках данного загрязнения, что, в свою очередь, позволит сформулировать предложения по снижению уровня неблагоприятных воздействий на природные объекты. Разработанные показатели могут найти применение при плановых и экстренных обследованиях изучаемых полярных территорий и могут быть рекомендованы для освоения студентами географических, океанологических, экологических, природоохранных высших и средних учебных заведений.

Диазотированная сульфаниловая кислота вступает в реакцию азосочетания с ароматическими аминами, фенолами, протопорфиринами и некоторыми азотис-

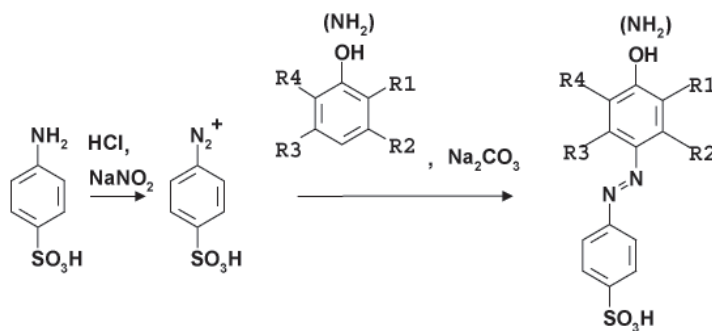


Рис. 1. Реакция азосочетания с диазотированной сульфаниловой кислотой

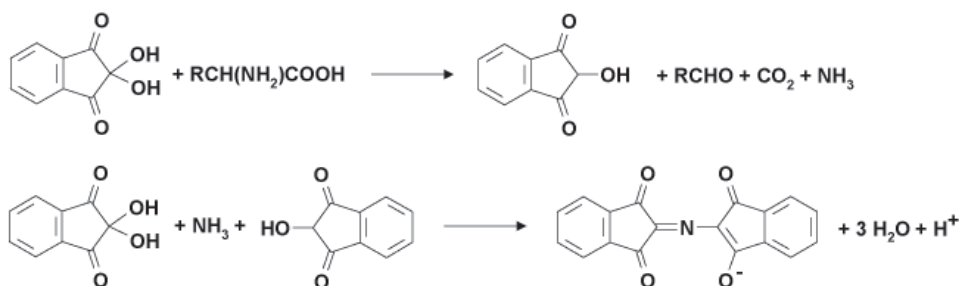


Рис. 2. Нингидриновая реакция

тыми гетероциклами, образуя окрашенные азокрасители. Субстрат не должен содержать сильных акцепторных заместителей и групп, стерически затрудняющих азосочетание [7]. Таким образом, тест чувствителен как к промышленному загрязнению поверхностных вод (фенолы, анилины), так и к продуктам метаболизма человека и животных.

Нингидрин дает окрашенные соединения с аммиаком, алифатическими и алициклическими первичными аминами. Вторичные, третичные и четвертичные амины, амиды и аминзамещенные ароматические соединения дают слабую реакцию или не дают вовсе. Раствор нингидрина применяется в качестве группового локализирующего агента на аминокислоты и пептиды [4]. Тест позволяет обнаруживать следы биологической контаминации в воде (почве).

Для каждой пробы воды (почвы) проводят одновременно оба теста; вывод об антропогенном загрязнении делают по совокупности результатов. По-видимому, в случае биологической контаминации почвы обе реакции должны демонстрировать загрязнение сравнимой интенсивности; при промышленном загрязнении, вероятно, первая должна превалировать.

Оптимальные условия для проведения тестов были подобраны нами с помощью модельных соединений (фенол, 1-нафтиламин – для реакции азосочетания; аргинин – для нингидриновой реакции).

Затем мы провели анализы в выбранных условиях водных растворов био-контаминантов, установили чувствительность предложенной методики и составили цветовую шкалу. Однако при последующем анализе водных вытяжек реальных загрязненных почв было обнаружено, что мутность и окраска вытяжки, зависящие от типа почвы, значительно искажают цвет реакционного раствора. Поэтому мы разработали цветовую шкалу для оценки уровня антропогенной нагрузки (табл. 1, 2), используя искусственно приготовленные песчаные и глинистые почвы с известными концентрациями загрязняющих веществ. Вариации цвета в пределах строки вызваны различиями мутности и окраски исходной вытяжки.

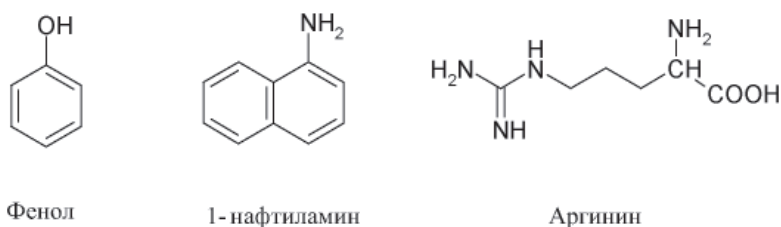


Рис. 3. Модельные соединения

Таблица 1

Реакция азосочетания

Обознач.	Описание	Концентрация фенола в воде, мг/л	Концентрация 1-нафтиламина в воде, мг/л	Концентрация биоконтaminантов в водной вытяжке (в воде), мг/л	Содержание сухих биоконтaminантов в пробе почвы, г/кг почвы	Вывод о загрязненности почвы
0	практически бесцветный	$X < 0,5$	$X < 0,4$	$X < 10$	$X < 0,12$	практически чистая
0+	соломенно-желтый, светло-желтый	$0,5 < X < 2,5$	$0,4 < X < 2$	$10 < X < 50$	$0,12 < X < 0,6$	незначительное органич. загрязнение
+	желтый, ярко-желтый, крон желтый	$2,5 < X < 10$	$2 < X < 10$	$50 < X < 300$	$0,6 < X < 3,6$	слабое органическое загрязнение
++	крон желтый К, оранжевый	$10 < X < 25$	$10 < X < 40$	$300 < X < 700$	$3,6 < X < 8,4$	среднее органич. загрязнение
+++	темно-оранжевый, светло-коричневый (йод, светлый йод)	$25 < X$	$40 < X$	$700 < X$	$8,4 < X$	сильное органич. загрязнение

Таблица 2

Нингидриновая реакция

Обознач.	Описание	Концентрация аргинина в воде, мг/л	Концентрация биоконтaminантов в водной вытяжке (в воде), мг/л	Содержание сухих биоконтaminантов в пробе почвы, г/кг почвы	Вывод о загрязненности почвы
0	практически бесцветный	$X < 10$	$X < 50$	$X < 0,6$	практически чистая или незначительное органич. загрязнение
0+	чуть желтоватый, желтоватый	$10 < X < 40$	$50 < X < 300$	$0,6 < X < 3,6$	слабое органическое загрязнение
+	серовато-желтоватый, желтый	$40 < X < 100$	$300 < X < 500$	$3,6 < X < 6$	умеренное органическое загрязнение
++	светло-фиолетовый, светло-синий	$100 < X < 150$	$500 < X < 700$	$6 < X < 8,4$ г/кг	среднее органическое загрязнение
+++	синий, фиолетовый	$150 < X$	$700 < X$	$8,4$ г/кг $< X$	сильное органическое загрязнение

Таблица 3

Результаты анализа проб почвы на станции Новолазаревская

Обозначение пробы	Место отбора пробы	Оценка антропогенной нагрузки			Микробиологическая оценка СМЧ, м.т./г	Содержание неорганических анионов в водной вытяжке из почвенного образца, мг/л (по данным ионохроматографа)				
		Нингидриновая реакция	Реакция азосочетания	Вывод		Cl	NO ₂	NO ₃	PO ₄	SO ₄
8	Склад открытого хранения техники и материалов (участок в центре склада)	0+	0+	незначит. орг. загрязнение (антропог.)	3,00E+05	26,276		0,139		45,89
9	Склад открытого хранения (участок, загрязненный ГСМ)	0+	+	слабое орг. загрязнение (промышл.)	только плесень	5,78		0,008		8,958
10	Участок дороги возле ДЭС (загрязненный ГСМ)	0+	+	слабое орг. загрязнение (промышл.)	4,00E+03	26,128		0,123		37,828
11	Участок у емкостей с ГСМ	0	++	среднее орг. загрязнение (промышл.)	2,00E+05	3,52		0,251		8,04
12	Участок у емкостей с ГСМ	0	+	слабое орг. загрязнение (промышл.)	1,90E+04	6,794		0,427		11,056
13	Участок у входа на ДЭС	0	+	слабое орг. загрязнение (промышл.)	7,00E+06	9,654		0,679		184,588
15	Участок у волокуши с пищевыми отходами (в 5 м от кают-компаний)	+	+	среднее орг. загрязнение (антропог.)	1,15E+07	38,732		5,362	18,176	11,551
16	Участок свалки у старой станции	0+	++	среднее орг. загрязнение (промышл.)	1,00E+06	10,116		0,62		44,374
17	Участок дороги на свалку у старой станции	0+	+	слабое орг. загрязнение (промышл.)	1,00E+05	2,297		0,213		7,007
18	Участок дороги на старой станции	0+	0+	незначительное орг. загрязнение (антропог.)	6,00E+05	7,182		0,071		14,017
22	У входа на теплый продовольственный склад	0	+	слабое орг. загрязнение (промышл.)	7,40E+06					
24	У входа в геодом	+	+	среднее орг. загрязнение (антропог.)	9,40E+06					
25	Участок слива из геодома	++	++	сильное орг. загрязнение (антропог.)	1,57E+07	142,673		0,509	188,59	99,625
26	У сточной ямы в 25–30 м от геодома	++	++	сильное орг. загрязнение (антропог.)	2,37E+07					
31	Дальний берег о. Станционный, у старой станции	0	0+	незначительное орг. загрязнение (промышл.)	2,60E+04					

Анализы реальных образцов почв доказали применимость методики в полевых условиях и ее информативность (табл. 3, 4). Полученные результаты экспресс-диагностики коррелируют с микробиологической оценкой (рис. 4), с исследованием анионного (рис. 5) состава пробы.

С целью проверки точности и воспроизводимости результатов были приготовлены водные растворы шести различных образцов биоконтаминантов; из каждого концентрированного раствора методом разбавления были получены по семь растворов с известным содержанием биоконтаминантов. После этого проводился анализ полученных растворов в соответствии с разработанной методикой параллельно двумя аналитиками. Несовпадающие результаты параллельных анализов

Таблица 4

Результаты анализа проб почвы на станции Молодежная

Обозначение пробы	Место отбора пробы	Оценка антропогенной нагрузки			Микробиологическая оценка СМЧ, м.т./г	Содержание неорганических анионов в водной вытяжке из почвенного образца, мг/л (по данным ионохроматографа)				
		Нингидриновая реакция	Реакция азосочетания	Вывод		Cl	NO ₂	NO ₃	PO ₄	SO ₄
31	Вершина сопки рядом со знаком в 30 м от антенны ИСЗ	0	0	практически чистая	8,10E+04	2,511	0,025	0,552	0,603	2,593
32	Вершина сопки около антенны ИСЗ	0	0	практически чистая	7,40E+04	9,533		14,676	0,711	3,236
33	На склоне сопки в половине расстояния между антенной и эстакадой	0+	+	слабое орг. загрязнение (промышл.)	2,97E+05	1,184	0,034	0,091	0,399	1,64
34	Павильон ВЗА (пусковой)	0+	0+	незначительное орг. загрязнение (антропог.)	4,10E+04	1,518	0,037	0,115	0,69	1,622
36	Участок сопки над складом «Бананис»	0+	+	слабое орг. загрязнение (промышл.)	7,60E+06	4,235		2,43	0,913	2,704
41	Берег о. Лагерного, место стоянки автотранспорта для заправки воды	0+	0+	незначительное орг. загрязнение (антропог.)	3,10E+05	4,788		0,153		2,056
42	Участок дороги в 15–20 м от места водозабора	+	0+	слабое орг. загрязнение (биолог.)	1,75E+05	27,522	0,223	2,99	0,405	9,708
43	Участок берега о. Лагерного, ближайший к станции в 30 м от водозабора	0	+	слабое орг. загрязнение (промышл.)	1,24E+06	3,63		1,919	0,562	2,397
44	Участок берега о. Лагерного, противоположный месту забора воды	0	0+	незначительное орг. загрязнение (промышл.)	1,50E+04	1,142		0,083		1,55
45	Водораздел между о. Лагерным и системой о. Разливное – о. Глубокое	0+	+	слабое орг. загрязнение (промышл.)	6,30E+03	4,604		0,293		3,364

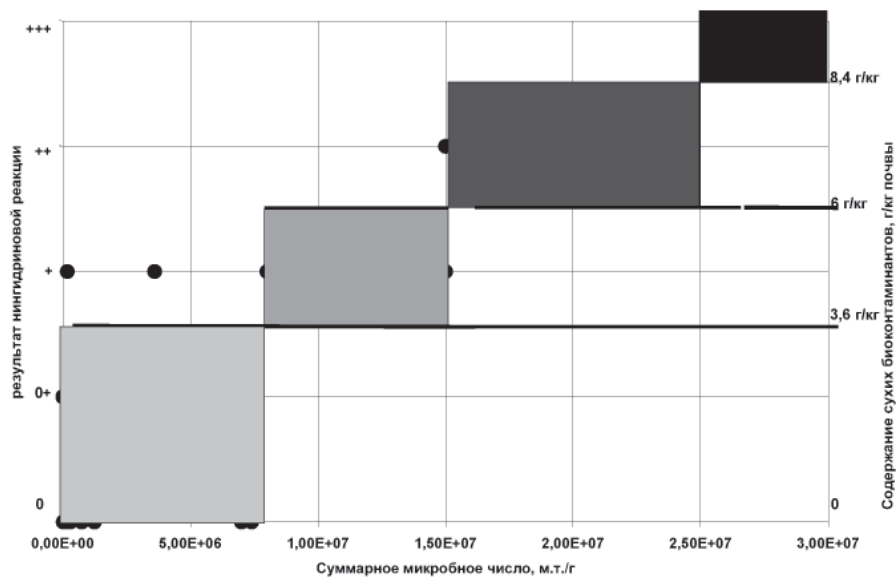


Рис. 4. Сравнение результатов цветных реакций с данными микробиологической оценки

разными операторами составляли 8,33 % для реакции азосочетания и 10,4 % для нингидриновой реакции. Все несовпадающие результаты принадлежат соседним интервалам окраски.

Несколько больше несовпадение для растворов с различными биоконтаминантами, но одинаковой их концентрацией: 22,9 % и 20,8 % соответственно; это объясняется сложным и неодинаковым комплексным составом органического загрязнения биологического происхождения. Следует отметить, что большинство расходящихся результатов относится к граничным точкам интервалов окраски.

Процедура анализа заключается в приготовлении водных вытяжек из проб грунта либо взятии проб воды, добавлении готовых реактивов, пятнадцатиминутной выдержке (при комнатной температуре для реакции азосочетания и в кипящей водяной бане для нингидринового теста) и последующей оценке окраски

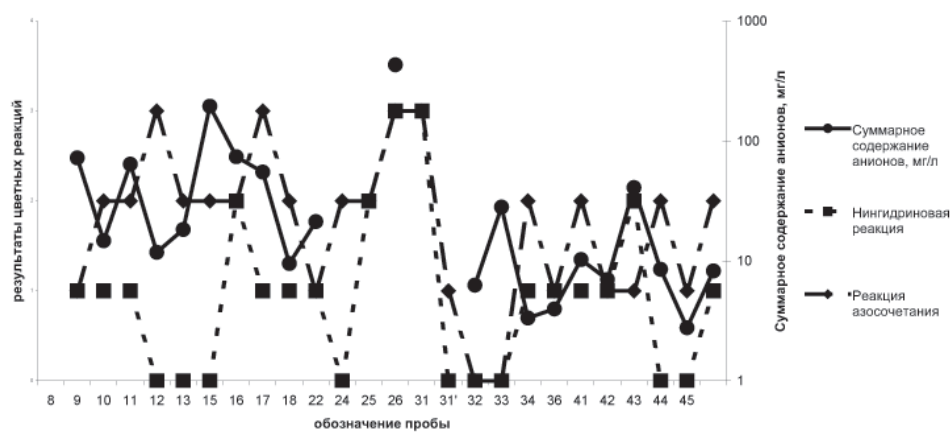


Рис. 5. Сравнение результатов цветных реакций с данными анализа анионного состава

с помощью цветовой шкалы. Лимитирующая по времени стадия – приготовление водных вытяжек из проб почвы. После этого время анализа 10 проб составляет 1 ч (включая затраты времени на нагревание, охлаждение и выдержку). Полный набор посуды, оборудования и готовых растворов реагентов для анализа 100 проб помещается в чемодан массой 8 кг.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Приготовление растворов

Соляная кислота (0,1 н): из фиксаля. Содержимое ампулы количественно переносят в литровую мерную колбу и разбавляют дистиллированной водой до метки.

Нитрит натрия (2 %-й раствор): взвешивают 1 г NaNO_2 , переносят в мерную колбу на 50 мл, растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды. Полученный раствор разбавляют дистиллированной водой до метки и хранят в посуде из темного стекла в защищенном от света месте.

Раствор соды (1 н): взвешивают 53 г Na_2CO_3 (или 143 г $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}$), переносят в литровую мерную колбу, растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора до метки. Полученный раствор хранят в стеклянной бутылке с плотно завинчивающейся пробкой.

Раствор сульфаниловой кислоты: берут точную навеску сульфаниловой кислоты (~2,0918 г), переносят в литровую мерную колбу и растворяют в 0,1 н HCl . Объем раствора доводят до метки. Полученный раствор хранят в бутылке из темного стекла с плотно завинчивающейся пробкой.

Нингидрин (0,25 %-й раствор в ацетоне): навеску нингидрина (0,25 г) растворяют в 100 мл ацетона. Полученный раствор хранят в бутылке из темного стекла с плотно завинчивающейся или притертой пробкой.

Все эти растворы при соблюдении условий хранения достаточно стабильны, они могут быть приготовлены заранее в условиях лаборатории и взяты в экспедицию. Указанных в прописи количеств хватает на анализ 200 проб воды (почвы).

Диазореагент (готовят непосредственно перед проведением анализа): к охлажденному раствору сульфаниловой кислоты в 0,1 н HCl по каплям при перемешивании добавляют расчетное количество 2 %-ного нитрита натрия. Полученный раствор стабилен в течение нескольких часов при температуре 2–6 °С; при нагревании до комнатной температуры нестабилен.

Для анализа 9–10 проб: для исходной навески сульфаниловой кислоты $2,092 \pm 0,01$ г – 2,2 мл 2 %-ного раствора NaNO_2 прибавляют к 50 мл раствора кислоты.

Для других навесок и количеств проб необходимые объемы смешиваемых растворов рассчитываются по формулам:

$$V_{\text{кислоты}} = 5 \times n_{\text{проб}}$$

$$V_{\text{NaNO}_2} = 0,103 \times m_{\text{кислоты}} \times n_{\text{проб}}$$

где $V_{\text{кислоты}}$ – объем раствора сульфаниловой кислоты в 0,1 н HCl , мл; V_{NaNO_2} – объем 2 %-ного раствора нитрита натрия, мл; $m_{\text{кислоты}}$ – исходная навеска сульфаниловой кислоты, г; $n_{\text{проб}}$ – количество анализируемых проб воды (почвы).

Анализ проб воды (почвы)

Приготовление водной вытяжки

Навеску (~25 г) свежезятой или замороженной почвы отбирают с помощью градуированного пластикового стаканчика, помещают в пластиковую банку емкостью 500 мл и приливают 75 мл дистиллированной воды. Банку закрывают пробкой и энергично встряхивают в течение 3 минут. Полученную суспензию фильтруют с помощью воронки Бюхнера в колбу Бунзена (с помощью ручного вакуум-насоса

NALGENE). Осадок на фильтре промывают 25 мл дистиллированной воды. Фильтрат, объединенный с промывной водой, переносят в чистую пластиковую банку. Получают ~100 мл водной вытяжки.

Переносят по 5–6 мл приготовленной водной вытяжки в две пробирки для проведения нингидринового теста и для сравнения; с остатком проводят реакцию азосочетания.

Реакция азосочетания (тест с диазотированной сульфаниловой кислотой)

К приготовленной водной вытяжке добавляют пипеткой (или по каплям шприцом) 5 мл диазореагента, перемешивают встряхиванием и осторожно, по каплям, при перемешивании добавляют 5 мл 1 н раствора соды. Через 15 мин 5–6 мл полученного раствора переносят в пробирку и оценивают окраску с помощью шкалы (табл. 1), учитывая окраску исходной водной вытяжки.

Нингидриновая реакция

В пробирку с водной вытяжкой добавляют 0,5 мл раствора нингидрина в ацетоне, перемешивают встряхиванием и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин. Затем оценивают окраску полученного раствора (табл. 2), учитывая окраску исходной водной вытяжки.

Набор для проведения анализа 100 проб в полевых условиях

- Банка объемом 50 мл для приготовления диазореагента – 1.
- Банки с пробками для приготовления водной вытяжки объемом 500 мл – 10.
- Колба Бунзена – 1.
- Воронка Бюхнера – 1.
- Фильтры бумажные – 150.
- Ручной вакуум-насос NALGENE – 1.
- Водяная баня – 1.
- Держатель для пробирок – 2.
- Канистра с дистиллированной водой – 1.
- Ложка для почвы – 1.
- Мерный цилиндр на 100 мл для дистиллированной воды – 1.
- Мерный цилиндр на 50 мл для кислоты – 1.
- Пипетка на 5 мл (для нитрита) – 3.
- Пипетка пластиковая на 1 мл (для раствора нингидрина) – 10.
- Пластиковые стаканчики для отбора почв – 10.
- Пробирки для нингидринового теста и оценки окраски – 40.
- Стаканы пластиковые – 2.
- Шприц на 5 мл (для диазореагента) – 10.
- Шприц на 5 мл (для раствора соды) – 10.
- Штатив для пробирок – 2.
- Чемодан для хранения набора – 1.

Реактивы

- Раствор нингидрина в ацетоне – пластиковая бутылка 0,05 л.
- Раствор нитрита – пластиковая бутылка 0,05 л.
- Раствор соды – пластиковая бутылка 0,5 л.
- Раствор сульфаниловой кислоты в HCl – пластиковая бутылка 0,5 л.
- Хромовая смесь – пластиковая бутылка 0,25 л.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабов Д.М., Надворный Н.Н. Руководство к практическим занятиям по гигиене с техникой санитарно-гигиенических исследований. М.: Медицина, 1976. С. 52–53.

2. Ванюшин И. Домашний анализ воды // Аквариум. 1994. № 2. URL: <http://www.fishing.kiev.ua:80/aquasfera/voda/vod0002.html> (дата обращения 12.02.2009)
3. Данилова Л.А. Анализ крови и мочи. СПб.: ООО «Издательство Деан», 1999. 128 с.
4. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. Пер. с англ. М.: Мир, 1991. 544 с.
5. Кольман Я., Рем К.-Г. Наглядная биохимия. Пер. с нем. М.: Мир, 2000. С. 196, 317–318.
6. Кухта В.К., Морозкина Т.С., Таганович А.Д., Олецкий Э.И. Основы биохимии: Учебник. М.: Медицина, 1999. 416 с.
7. Марч Дж. Органическая химия. Реакции, механизмы и структура: Углубленный курс для университетов и химических вузов: В 4 т. Т. 2. Пер. с англ. М.: Мир, 1987. С. 337–338, 479–481.
8. Практикум по биохимии / Под ред. С.Е.Северина и др. 2-е изд., перераб и доп. М.: Изд. МГУ, 1989. 508 с.
9. Раков Э.Г. Химия и криминалистика. URL: <http://him.lseptember.ru/articlef.php?ID=200002101> (дата обращения 12.02.2009)
10. Рево А.Я. Практикум по органической химии (Качественные микрохимические реакции): Учебн. пособие для медицинских вузов. 3-е изд. М.: Высшая школа, 1971. 208 с.
11. Ронин В.С., Старобинец Г.М., Утевский Н.Л. Руководство к практическим занятиям по методике клинических лабораторных исследований. М.: Медицина, 1968. 264 с.
12. Хроматография в тонких слоях / Под ред. Э.Шталя. М., 1965. С. 476–492.
13. Maschke J. Die chemische wasseruntersuchung-Bestimmung von Harn und Fakalien im Schwimmbadwasser // Naturwiss. Unterr., Phys./Chem./Biol. 1975. В. 23 (2), S. 75–76 (Ger.).

E.D.DOBROTINA, SH.B.THESHEBAEV

FIELD METHOD OF THE COMPLEX ESTIMATION OF ANTHROPOGENOUS POLLUTION OF THE SOILS IN AREAS OF AUTONOMOUS SETTLEMENTS IN THE ARCTIC

The technique is developed for carrying out a complex estimation of anthropogenic pollution of Arctic soils in the conditions approached to field. The level of anthropogenic loading is estimated by the organic substances contain in soil, determined on set of tests with the diazotized sulphanilic acid and with the ninhydrin solution.

Key words: anthropogenic loading, azocoupling, ninhydrin reaction.