

Винахід відноситься до галузі науки "водна токсикологія", а саме до способів якісного і кількісного виміру токсичності водного середовища, спричинену забрудненням аміаком, і може бути застосований в моніторингу стічних і природних вод та вод, експлуатованих у замкненому режимі водопостачання.

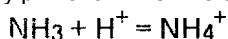
Відомими засобами експериментальної оцінки забруднення вод аміаком є:

а) за вмістом аміаку у водному середовищі, який визначається хімічними методами, а саме, реакцією Несслера [Гурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных и сточных вод. - М.: Химия, 1984. - 447 с.] з наступною оцінкою біологічної небезпечності води у порівнянні з встановленими критеріями і нормами допустимого рівня аміаку для окремих видів гідробіонтів [Алабастер Дж., Лойд Р.

Критерии качества воды для пресноводных рыб. - М.: Легк. и пищ. пром-сть, 1984. - 344 с.]; б) за допомогою біологічних тест-об'єктів - водних безхребетних, риб та інших організмів-біотестерів [Методическое руководство по биотестированию воды - РД 110-02—90, М., 1991], за якими токсичність визначається за статистично вірогідними показниками смертності або за порушенням життєво важливих функцій тест-об'єктів у забрудненій воді по відношенню до відповідних показників тих самих тест-об'єктів у безумовно чистій воді (контролі), у одиницях концентрації та у відсотках (прототип).

Загальних ознак винахід, що заявляється, з хімічним методом не має, а з методом біотестування спільним є використання риб у якості тест-об'єктів.

Відомий хімічний спосіб не дозволяє дати однозначну якісну і кількісну оцінку токсичності водного середовища, спричинену аміаком, оскільки токсичність останнього залежить від співвідношення та можливості зсуву рівноваги в бік неіонізованої або іонізованої форми згідно реакції



під впливом абіотичних факторів (рН, температура, іонна сила розчину, наявність іонів - комплексотворювачів і ін.). Оскільки неіонізована форма значно токсичніша за іон амонію, то при значному вмісті NH_4^+ і низькій концентрації NH_3 токсичність води може бути низькою, і навпаки, що важко прогнозувати по визначенню загального вмісту аміаку за умов коливання фізико-хімічних показників води. Крім того, як хімічний, так і метод біотестування не розраховані на оцінку токсичності водного середовища при його багатократному забрудненні, коли поряд з аміаком присутні інші хімічні забруднювачі, здатні утворювати з ним комплексні сполуки або проявляти синергічну чи антагоністичну дію. Згадані методи не ідентифікують специфічний прояв аміакової дії, а встановлені за допомогою хіміко-аналітичного методу та шляхом біотестування критерії токсичності аміаку розроблено на чистій речовині, а не на багатокомпонентних забруднювачах, якими є промислові, міські, дренажні стічні води та води біологічних виробництв із замкненою системою водопостачання, що містять екзометаболіти біотехнологічного експлуатованих гідробіонтів.

Отже, об'єктивного способу оцінки реальної токсичності води по аміаку для гідробіонтів не існує.

Завдання. В основу винаходу поставлено задачу встановити однозначний показник оцінки токсичного забруднення водного середовища аміаком: шляхом визначення специфічної на аміачну дію фізіолого-біохімічної відповіді організму-тестера на рівні синтезу молекулярних форм ферменту глутамінсинтетази (КФ 6.3.1.2) забезпечити якісне і кількісне тестування води на аміачову забрудненість та біологічну небезпечність за будь-яких фізико-хімічних показників води.

Причинно-наслідковий зв'язок між істотними ознаками технічного рішення, що заявляється, і результатом, що досягається, полягає в тому, що замість оцінки токсичності води по аміаку через концентрацію, непридатну для цього внаслідок існування різних за хімічним складом та різномірних за біологічною дією форм токсиканту, особливо при багатокомпонентному забрудненні води, пропонується біохімічний тест, який відображає специфічну відновити організму риб тільки на дію підвищених біологічно небезпечних концентрацій аміаку, який полягає у синтезі за токсичної дії аміаку додаткової множинної молекулярної форми аміакзв'язуючого ферменту риб - глутамінсинтетази (ГС). Присутність другої ізоформи ГС у м'язах та печінці риб-тестерів проявляється вже при концентрації аміаку у середовищі 0,05 мг/л. Зазначений рівень нижчий від встановленого методом біотестування в даний час порогового рівня аміаку для гідробіонтів (0,07-0,10 мг/л), що свідчить про вищу чутливість пропонованого методу порівняно з відомими.

Суть винаходу полягає в тому, що аміачну токсичність водного середовища встановлюють на підставі електрофоретичного дослідження ізоферментного складу ГС м'язів або печінки риб. У модельних дослідженнях нами використано цього річка коропа (*Syrpinus carpio* L.). За нормальних умов витримування риб при концентрації аміаку у середовищі до 0,05 мг/л у їх організмі синтезується тільки одна молекулярна форма ГС з молекулярною масою 480 ± 20 кДа, незначною електрофоретичною рухливістю, оптимумом рН 6,0 і 8,2, температурним оптимумом 20°C та значеннями K_m до глута-мату, амонію, АТФ та іонів магнію - 14,3; 0,048; 1,0 та 0,8 мМ відповідно (фіг. 1а).

За субклітинною локалізацією вона є мітохондрійним ферментом (таблиця).

Аклімація риб на протязі 3 діб у середовищі з вмістом аміаку 0,05 мг/л і вище з аналогічними або відмінними порівняно з контролем іншими параметрами середовища викликає появу у складі Ізоферментного спектру ГС нової молекулярної форми (ГС2 -фіг. 16), яка характеризується більшою електрофоретичною рухливістю, молекулярною масою 320 ± 15 кДа, оптимумом температури 30°C, значеннями K_m для глутамату, аміаку, АТФ та іонів магнію 6,0; 0,035; 0,5 10,07 мМ відповідно. Синтез означеної форми ГС є тільки аміакзалежним і не викликається зміною інших факторів середовища (вміст кисню, вуглекислого газу, рН, іонів металів і ін.). Це дає можливість на підставі електрофоретичного аналізу ГС м'язів та печінки риб прогнозувати зростання токсичності середовища по аміаку, оскільки відомо, що істинним субстратом для ГС є тільки неіонізована форма [Евстегнеева З.Г. Глутаминсинтетаза: структура, свойства и регуляция//Молекулярные механизмы азотфиксации. Итоги науки и техники. Серия "Биологическая химия". - М.: ВИНТИ, 1989]. Отже, токсичність середовища по аміаку оцінюється за появою у електрофореграмі ГС другої Ізоформи ферменту (ГС2), що відповідає концентрації аміаку не нижче 0,05 мг/л. Її синтез зберігається і при підвищенні вмісту аміаку безпосередньо до летальних доз.

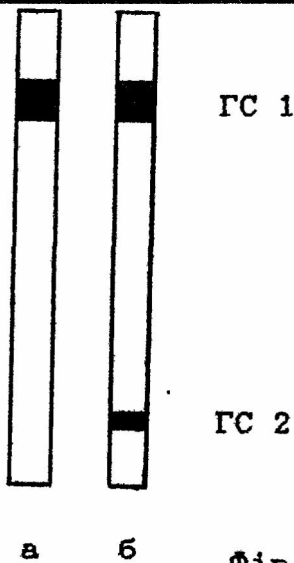
Приклад фізіолого-біохімічного біотестування аміачового забруднення за Ізоферментним складом ГС.

Аналіз здійснюється загальноприйнятим методом електрофоретичного аналізу білків по Девісу [Davis B.I. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum//Ann. Acad. Sci. - 1964. - 121, Ns 2. - P. 404-407].

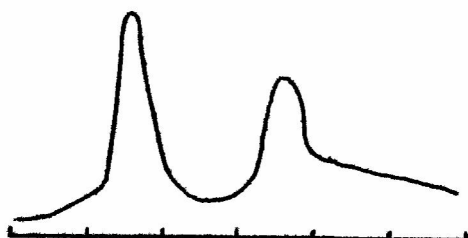
У відловлених з природної водойми або витриманих у досліджуваній воді на протязі найменше 3 діб риб відбирають зразок м'язів в області переднього спинного плавця або печінку масою 0,5-1,0 г, гомогенізують його при 4 °C у 0,22 М розчині сахарози, що містить 0,01 М трис-НСІ (рН 7,2) і 0,001 М розчині ЕДТА у співвідношенні 1:4 (тканина:буфер), центрифугують при 3-4 тис g на протязі 20 хв. і одержаний супернатант (близько 200 мкг білку) піддають диск-електрофорезу у 5% поліакриламідному гелі при силі струму 2,5 мА на трубку на протязі 150 хв. Після цього гелеві блоки дістають із трубок, поміщують у середовище для проведення глутамінсинтетазної реакції, яке містило 100 мМ АТФ і 10 мМ хлориду магнію, і інкубують 15 хв при 37°C. Після інкубації їх двічі промивають дистильованою водою і витримують в суміші розчинів 1% сульфату заліза (II) в 0,3 н. сірчаній кислоті 16,6% молібдату амонію в 7,5 н. сірчаній кислоті у співвідношенні 10:1 по об'єму на протязі 15-20 хв до появи синього забарвлення у місцях локалізації ГС. Забарвлені блоки промивають дистильованою водою і зберігають у ній або в 7% розчині оцтової кислоти. По кількості забарвлених дисків судять про наявність ГС2 (фіг. 1) та, виходячи з цього, забрудненість середовища аміаком та його фізіологічну небезпечність. Результати електрофоретичних досліджень можна фіксувати фотографічно або графічно методом денситометрії (фіг. 2). Отримані таким чином дані дозволяють якісно і кількісно тестувати воду на аміакову забрудненість та біологічну небезпечність.

Активність ізоформ ГС м'язів коропа при дії аміаку

Форми ГС	Активність ГС, нмоль Рі/мг білку/хвил.			
	Контроль		Аміаковий токсикоз (0,05 мг/л)	
	Мітохондрії	Цитоплазма	Мітохондрії	Цитоплазма
ГС1	96,35±7,61	Не виявлена	82,76±6,94	Не виявлена
ГС2	Не виявлена	Не виявлена	Не виявлена	48,94±3,25



Фіг. 1



Фіг. 2