



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **109166** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
G01N 33/18 (2006.01)
G01N 21/00

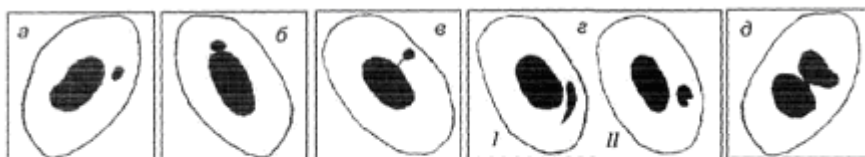
ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 02596	(72) Винахідник(и): Клименко Микола Олександрович (UA), Пилипенко Юрій Володимирович (UA), Бедункова Ольга Олександрівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 16.03.2016	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.08.2016	(73) Власник(и): Клименко Микола Олександрович, вул. Соборна, 11, м. Рівне, 33028 (UA), Пилипенко Юрій Володимирович, вул. Чорноморська, 22, кв. 85, м. Херсон, 73028 (UA), Бедункова Ольга Олександрівна, вул. С. Бендери, 44, кв. 28, м. Рівне, 33014 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.08.2016, Бюл.№ 15	

(54) СПОСІБ ЕКСПРЕС-ОЦІНКИ СТАНУ ГІДРОЕКОСИСТЕМ ЗА MN-ТЕСТОМ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ РИБ**(57) Реферат:**

Спосіб експрес-оцінки стану гідроекосистем за MN-тестом периферійної крові риб передбачає проведення біотестування природної гідроекосистеми без використання лабораторних тест-об'єктів. Виловлюються найбільш масові види риб досліджуваної водойми. Приготовляються та зафарбовуються мазки крові, відібраної з хвостової артерії. На них за допомогою світлового мікроскопа із загальним збільшенням x1000 разів реєструються еритроцити із ядерними порушеннями різних типів.

**Fig. 1****UA 109166 U**

Корисна модель належить до галузі прикладної гідроекології і може бути використана для біомоніторингу водойм, зокрема як експрес-метод оцінки.

Найбільш близьким є спосіб експрес-оцінки еколого-токсикологічних характеристик генотоксичності питної води з використанням ядерцевого біомаркери риб [1], який передбачає проведення біотестування досліджуваних зразків води із використанням лабораторних тест-об'єктів.

Недоліком цього способу є неможливість його впроваджене для оцінки екологічного стану природних водойм, оскільки лабораторні риби різко реагують на вплив екотоксикантів, що може призвести до недостатньої достовірності результатів діагностики природних вод. Наслідком цього є низька результативність дій, спрямованих на оцінку і відновлення порушеної природної рівноваги гідроекосистем.

В основу пропонованої корисної моделі поставлена задача розробити експрес-спосіб оцінки природних вод, який передбачає простоту відбору матеріалу в польових умовах при незначних часових та матеріальних витратах і надає можливість опрацювати достатньо великий масив даних.

Поставлена задача вирішується тим, що виловлюються найбільш масові види риб досліджуваної водойми; приготуються та зафарбовуються мазки крові, відібраної з хвостової артерії; на них, за допомогою світлового мікроскопа із загальним збільшенням $\times 1000$ разів, реєструються еритроцити із ядерними порушеннями різних типів; підраховується частота ядерних порушень, що зустрічаються; за інтегральною шкалою діагностики визначається стан "здоров'я" гідроекосистеми за наступними рівнями - сприятливий, насторожуючий, загрозливий, критичний.

Для пояснення виконання способу додаються фігури 1–3.

Фіг. 1 - Типізація мікроядра, де:

а) мікроядра "стандартного" виду; б) "прикріплені"; в) "з'єднані з ядром ниткою хроматину"; г-І) несформований ядерний матеріал у вигляді паличок; г-ІІ) несформований ядерний матеріал у вигляді клубків; д) округлі утворення ядерного матеріалу достатньо великих розмірів.

Фіг. 2 - Частоти ядерних порушень (%) різних видів риб, які виловлені в р. Замчисько (створ № 1 - в межах м. Костопіль, 0,1 км вище скиду з очисних споруд ТзОВ "СвиспанЛімітед":

1 - верховодка; 2 - краснопірка; 3 - лящ; 4 - плітка; 5 - окунь річковий; 6 - лин; 7 - сом європейський.

Фіг. 3 - Частоти ядерних порушень (%) різних видів риб, які виловлені в р. Замчисько (створ № 2 - м. Костопіль, нижче скиду "Костопільводоканал":

1 - верховодка; 2 - краснопірка; 3 - лящ; 4 - плітка; 5 - окунь річковий; 6 - сом європейський

35 Пропонований спосіб включає наступні етапи проведення MN-тесту.

1. Взяття крові риб проводять з хвостової артерії шляхом відрізання хвоста риби ножицями або ножом. Перед дослідженням місце, звідки планують брати кров, очищують від слизу і надлишків вологості.

2. Невеличку краплю взятої від риби крові наносять на предметне скло на відстані 1-1,5 см від його кінця. Великим і вказівним пальцями правої руки беруть за ребро шліфоване скло, встановлюють його до поверхні предметного скла під кутом $30-45^\circ$ і акуратно підводять тильним боком до краплі крові, в результаті чого остання розтікається. Потім ковзним рухом шліфованого скла вперед кров рівномірно розподіляють у вигляді мазка по предметному скла. Правильно приготовлений мазок має бути рівномірним, поступово сходити нанівець, не мати розривів.

3. Готовий мазок підсушують на повітрі, помахуючи препаратом до зникнення вологого блиску.

4. Сухий мазок фіксують у стаканчиках із 96° етиловим спиртом 5-10 хв. Після закінчення фіксації препарат виймають зі спирту пінцетом, розміщують вертикально на фільтрувальний папір та очікують випаровування спирту. Можливий варіант фіксації, при якому спирт наносять за допомогою піпетки на поверхню підсушеного і розташованого горизонтально мазка.

5. Фарбують мазки в два етапи:

- розчином метиленового синього з дистильованою водою (1:5). Фіксований мазок розміщують у чашках Петрі з фарбою на 10-15 хвилин. Після закінчення фіксації препарат виймають із фарби пінцетом, промивають у дистильованій воді та чекають його повного висихання на повітрі;

- азур-еозином за Романовським (з додаванням буферу) з розрахунку 10-12 крапель фарби на 10 мл дистильованої води. Фіксований мазок розміщують у чашках Петрі з фарбою на 15-20 хвилин. Після закінчення фіксації препарат виймають із фарби пінцетом, промивають у дистильованій воді та чекають його повного висихання на повітрі.

Можливий варіант фіксації, при якому фарби наносять за допомогою піпетки на поверхню підсушеного і розташованого горизонтально мазка.

6. Виготовлений мазок розглядають спочатку при великому збільшенні (10×100), звертають увагу на відносну величину, форму та кількість еритроцитів у препараті.

5 7. Мікроядра типізують відповідно зі схемою (див. фіг. 1).

8. Підрахунок мікроядер та ядерного матеріалу проводять у їх загальній кількості на 1000 клітин еритроцитів. Результати виражають в проміле (‰).

9. У випадках отримання результатів, які перевищують рівні спонтанних мутацій для риб (0,5-4‰) роблять висновок про вразливість організму риби від дії мутагенних факторів та негативну екологотоксикологічну ситуацію у досліджуваній водоймі.

10 Приклад реалізації способу

Досліджувалась мала річка Замчисько, що належить до басейну р. Горинь і є її правою притокою першого порядку. Результати MN-тесту із встановленням частот ядерних порушень представлені у вигляді фіг. 2 та фіг. 3.

15 Аналіз представлених результатів обліку частоти ядерних порушень в еритроцитах крові риб, які були виловлені в р. Замчисько, дозволяє помітити різницю між різними видами іхтіофауни.

Так, в обох створах найвищі значення були характерні для плітки. При цьому, між створами значення частоти порушень також відрізнялись. У створі № 1 частота ядерних порушень в еритроцитах плітки становила 7,64 ‰, у створі № 2 її величина була на рівні 9,82‰. Дещо меншою була частота порушень у річкового окуня, відповідно для створів становила 5,1 та 6,2‰. Для верховодки значення були ще меншими і становили, відповідно 4,4 та 5,75‰. Для ляща даний показник був зафіксований на рівні 4,12 та 6,34‰, відповідно для створу №1 та № 2. Найнижчими були значення для краснопірки, відповідно 3,4 та 3,77‰. Для особин європейського сому, які були виловлені в обох створах, не було помічено суттєвої різниці частоти ядерних порушень, крім того, в обох випадках її величина знаходилась на рівні верхньої межі фізіологічної норми і становила 4,5 та 4,1‰ відповідно.

Отже, частота ядерних порушень для іхтіофауни річки Замчисько перевищує фізіологічну норму для таких видів як лин, плітка та річковий окунь. У верховодки даний показник незначно перевищував норму лише у створі з найбільшим рівнем антропогенезу.

Беручи до уваги факт порушення цитогенетичного гомеостазу даних видів риб, можна передбачати наявність мутагенних факторів у водоймі, а також погіршення відтворювальних якостей туводної іхтіофауни, що згодом може спричинити зменшення запасів біологічних ресурсів річки.

35 Метод дає можливість оцінити цитогенетичний гомеостаз як окремого організму риб, так і їх угруповання, що є індикатором стресу та відображає наявність дії мутагенних факторів у гідроекосистемі в режимі реального часу.

Дані оцінки зведені в таблицю, де за інтегральною шкалою здійснюється діагностика стану "здоров'я" гідроекосистеми за відповідними рівнями.

40

Таблиця

Інтегральна шкала діагностики "здоров'я" річкових гідроекосистем за цитогенетичними порушеннями периферійної крові риб

Частота ядерних порушень еритроцитів периферійної крові різних видів риб, ‰						Якісна характеристика цитогенетичного гомеостазу організму	Група цитогенетичних ушкоджень	Інтегральний стан "здоров'я" гідроекосистеми
верховодка	плітка	краснопірка	окунь	карась	лящ			
≤1	≤1,5	≤1	≤1,5	≤0,5	≤1,5	Непорушений	I	Сприятливий
1,1-2,0	1,6-3,5	1,1-2,5	1,6-3,0	0,6-1,5	1,5-2,0	Умовно непорушений	II	(відсутність прояву комбінованих ефектів забруднень)
2,1-3,5	3,6-5,0	2,5-3,5	3,1-4,5	1,6-2,0	2,1-3,5	Початкові порушення	III	Насторожуючий (помітний прояв комбінованих ефектів забруднень)

Продовження таблиці

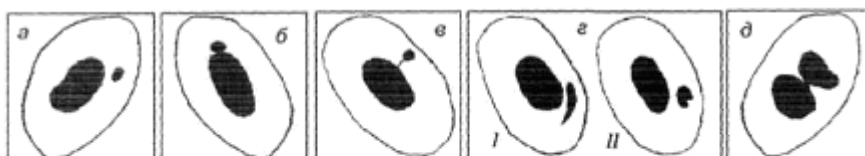
3,6-4,5	5,0-6,5	3,6-4,5	4,6-6,0	2,0-2,5	3,6-5,0	Середні порушення	IV	Загрозливий (значний прояв комбінованих ефектів забруднень)
≥4,6	≥6,6	≥4,5	≥6,0	≥2,6	≥5,1	Помітні порушення	V	Критичний (максимальний прояв комбінованих ефектів забруднень)

Аналіз представлених результатів досліджень дозволяє узагальнити, що зазначені види риб є надзвичайно зручними при проведенні біоіндикації та оцінки еколого-токсикологічної ситуації гідроекосистем за допомогою MN-тесту, на підставі яких повинні розроблятися дієві і ефективні природоохоронні заходи щодо їх оздоровлення.

Джерело інформації: 1. RU 2 387 992 С1, 27.04.2010, Росія

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 10 1. Спосіб експрес-оцінки стану гідроекосистем за MN-тестом периферійної крові риб, який передбачає проведення біотестування природної гідроекосистеми без використання лабораторних тест-об'єктів, який **відрізняється** тим, що виловлюються найбільш масові види риб досліджуваної водойми, приготуються та зафарбовуються мазки крові, відібраної з хвостової артерії, на них за допомогою світлового мікроскопа із загальним збільшенням x1000
- 15 2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що додатково підраховується частота зустрічі ядерних порушень.
3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що за інтегральною шкалою діагностики виявляється стан "здоров'я" гідроекосистеми за цитогенетичними порушеннями периферійної крові риб:
- 20 сприятливий;
насторожуючий;
загрозливий;
критичний.



Фіг. 1

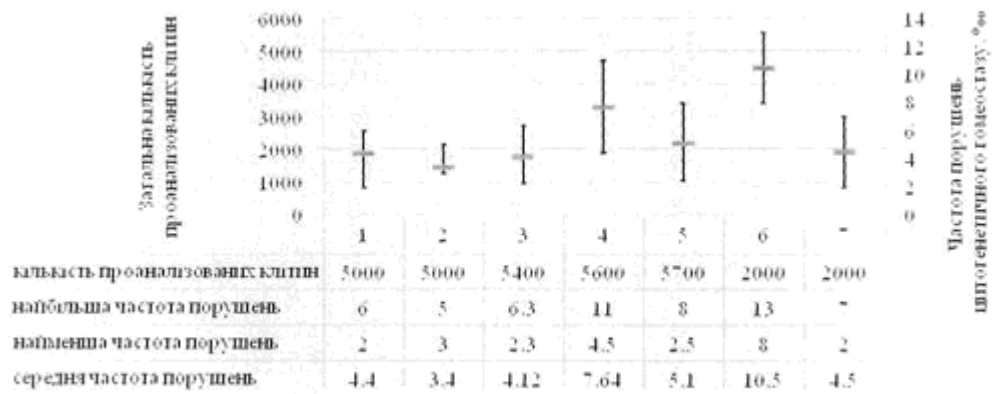


Fig. 2

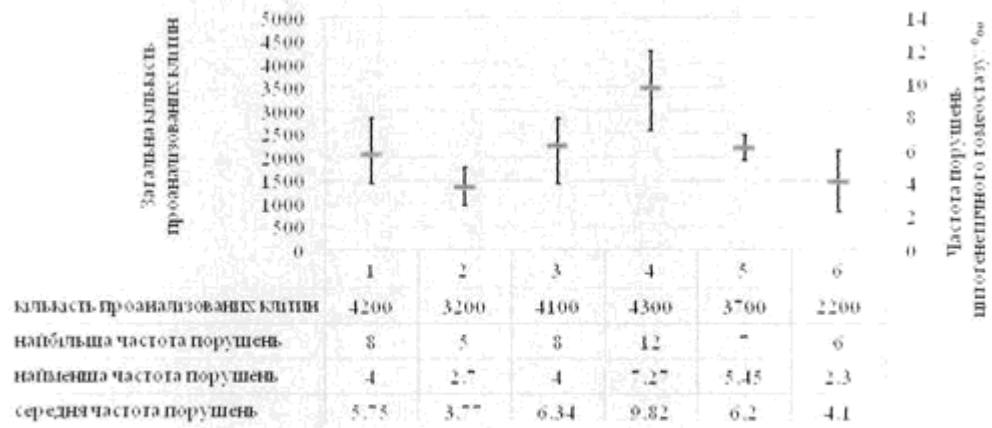


Fig. 3