



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **86249** (13) **U**  
(51) МПК (2013.01)  
**G01N 33/00**

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2013 06529</b>	(72) Винахідник(и): <b>Столяр Оксана Борисівна (UA), Фальфушинська Галина Іванівна (UA), Гнатишина Леся Любомирівна (UA), Турта Ольга Олександрівна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>27.05.2013</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.12.2013</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.12.2013, Бюл.№ 24</b>	(73) Власник(и): <b>ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВОЛОДИМИРА ГНАТЮКА, вул. М. Кривоноса, 2, м. Тернопіль, 46027 (UA)</b>

## (54) СПОСІБ БІОІНДИКАЦІЇ ТОКСИЧНОСТІ ВОДНОГО СЕРЕДОВИЩА

### (57) Реферат:

Спосіб біоіндикації токсичності водного середовища включає біологічну оцінку токсичності водного середовища. Обчислюють співвідношення вмісту металотіонеїнів у печінці риби за рівнем тіолових груп у білку та вмістом металів та класифікують рівень токсичності середовища як малий (адекватна відповідь), середній (стан тривоги, залучення металотіонеїнів до антиоксидантного захисту) або високий (стан виснаження, втрата здатності зв'язувати метали у нетоксичні комплекси та реагувати на забруднення збільшенням вмісту білка) залежно від величини цього співвідношення і абсолютного рівня його складових у двох групах порівняння.

**UA 86249 U**



Корисна модель належить до області збереження довкілля, а саме до біомоніторингу забруднення водойм і може бути використана для оцінки забруднення водних екосистем внаслідок їх експлуатації, аналізу фізико-хімічного забруднення річок та внесення екологічних оцінок у бізнес-плани інвестиційних проєктів.

5 Відомий спосіб визначення ступеня забруднення морської води за допомогою біоіндикації "Способ биоиндикации загрязнения морской воды тяжелыми металлами" (2003123682/13, 28.07.2003, заявники Корякова М.Д., Супоніна А.П., Звягінцев А.Ю., Росія), який полягає у визначенні та порівнянні вмісту металів у мінералізованому сухому залишку піонерних організмів акваторії (двостулкових молюски, ракоподібні, гідроїдні, черви (20 видів загалом)),

10 відібраних у потенційно забрудненій та чистій місцевості. Недоліками цього способу є відсутність кількісних критеріїв, адаптація методу лише до забруднення морської води та недостатнє обґрунтування щодо варіабельності середнього значення вмісту металів залежно від видового набору піонерних організмів.

15 Відомий також спосіб оперативної біоіндикації (2009112433/04, 03.04.2009, Росія), що передбачає проведення безперервної реєстрації поведінкових і/або фізіологічних реакцій водних організмів у природних умовах за допомогою вимірювальних приладів в режимі реального часу. Автор (Гудімов О.В.) пропонує використати для дослідження адукцію, амплітуду розкривання стулок мушлі, сумарний час закривання стулок мушлі двостулкових молюсків тощо.

20 Недоліком цього способу є обмеження досліджень реакції організму на забруднення лише на організменному рівні, який не може забезпечити адекватної інформації для ранньої діагностики якості середовища.

Відомий також спосіб (WO/2002/022859 "Визначення здоров'я екосистем шляхом оцінки

25 множинних біомаркерів у живому організмі крім людини"), який полягає в узагальненні результатів визначення широкого спектру показників та у застосуванні множинних схем їх використання у лабораторних та природних умовах.

Недоліками способу є висока собівартість та необхідність використання різних організмів, відсутність конкретних і універсальних рекомендацій та чітких критеріїв оцінки токсичності водного середовища.

Відомий також спосіб біологічної очистки забрудненого середовища іонами кадмію за допомогою металотіонеїнів (див. патент США US 5824512 A, 08/754,431), що включає конструювання приладу для біосорбції шляхом нанесення на матрицю-носії рекомбінантних бактерій *E. coli* з попередньо індукованими металотіонеїнами, які проявляють селективну

30 здатність зв'язувати кадмій у три- та тетра nukлеарні тіолоатні кластери. Недоліками способу є дороговартісність підготовчого етапу (експресія генів, полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу тощо).

В основу корисної моделі поставлено задачу створення способу експрес-діагностики біологічної відповіді на ступінь токсичності на підставі оцінки функціональної здатності стрес-респонсивного і метал-депонувального протеїну у печінці риби.

40 Поставлена задача вирішується тим, що на основі визначення концентрації металотіонеїнів печінки карася за кількістю депонованого металу (метал-депонувальна форма, MT-Me) та тіолових груп (загальний вміст, MT-SH) у тканині обраховується їх співвідношення MT-SH/MT-Me. Відповідь організму класифікується як норма, стан тривоги або стан виснаження, і, відповідно, токсичність середовища - як мала, середня або висока.

Металотіонеїни (MT) - це низькомолекулярні термостабільні протеїни цитозолу. У молюсків 45 їх головною функцією є депонування металів. Вони з високою ефективністю акумулюють практично весь кадмій у метаболічно-активних тканинах, беруть участь у гомеостазі цинку та міді. У риб вони є передусім стрес-респонсивними протеїнами, оскільки індукуються численними стресорними чинниками та прооксидантами та є потенційними антиоксидантами, оскільки, як встановлено в умовах *in vitro*, пригнічують перекисно-радикальні процеси. MT молюсків широко використовують у системах раннього виявлення небезпеки забруднювачів для біоти, про що 50 свідчить їх включення до рекомендованого набору біомаркерів для оцінки якості морських акваторій у європейських (MED POL, Biomar, "Mussel Watch" programme, BEEP тощо) програмах біомоніторингу. При цьому перевагу надають визначенню їх вмісту за кількістю тіолових груп у білку спектрофотометричним або полярографічним методами. У риб за такого спрощеного 55 підходу поза увагою залишається встановлене нами явище невідповідності загального вмісту MT та вмісту метал-депонувальної форми MT (Falfushynska et al., 2011, 2012).

60 Поєднане визначення вмісту MT у тканинах риби за двома характеристиками, загальним рівнем тіолових груп у білку та металодепонувальною здатністю, та обчислення їх співвідношення як MT-SH/MT-Me становить важливий діагностичний інструмент для оцінки неспецифічного пошкоджуючого впливу довкілля. Значення показника співвідношення MT-

SH/MT-Me >> 1 відповідає стану компенсаторної реакції (середня токсичність середовища). Порівнюючи співвідношення характеристик MT у екземплярів риби з двох місцевостей, одна з яких є референційною, за абсолютним значенням MT-SH та MT-Me, встановлюється ознака глибоких депресивних змін (висока токсичність середовища) як низькі значення обох характеристик або високі значення цих характеристик (мала токсичність середовища).

Для використання способу виловлюють 5 екземплярів риби родини Cyprinidae карася *Carrasius auratus*, який є широко розповсюдженим видом риб, з подібними морфологічними показниками (розмір, вік, маса) з досліджуваної водойми та визначають вміст MT-SH та MT-Me у тканині печінки. Для визначення MT-Me одержують розчин термостабільних сполук з 10 %-ного гомогенату тканини в 10 мМ трис-НСІ буфері, рН 8,0 з додаванням 10 мМ 2-меркаптоетанолу ("Sigma") для запобігання окиснення SH-груп та інгібітора протеаз фенілметилсульфонілфториду (0,1 мМ, "Sigma"). Гомогенат виготовляють з об'єднаних рівних наважок тканини з п'яти тварин дослідної групи (загальною масою 350 мг) та центрифугують протягом 45 хв. при 16 000×g. Отриманий надосад інкубують 5 хв при 85 °С і знову центрифугують за тих самих умов. Надосад, що містить розчинні термостабільні сполуки, піддають гель-розподільчій хроматографії, яку здійснюють 0,01 М трис-НСІ буфером, рН 8,0 на колонці, заповненій сефадексом G-75 ("Sigma") або сефадексом G-50 ("Sigma"), з охолоджувальним кожухом розміром 50×1,5 см із швидкістю 0,33 мл/хв. Для запобігання втрати металів, зв'язаних з білками, в елюент не додають ЕДТА. Вимірюють світлопоглинання проб при довжині хвилі 280 і 254 нм ( $D_{280}$  і  $D_{254}$ ). Калібровку колонки здійснюють за допомогою білків з відомою молекулярною масою - сироваткового альбуміну (67,0 кДа), хімотрипсину (25,8 кДа), міоглобіну (17,0 кДа), цитохрому с (12,3 кДа), убіквітину (8,4 кДа) та окиснений β-ланцюг інсуліну (3,4 кДа), (всі маркери фірми "Sigma", США). MT ідентифікують як низькомолекулярні термостабільні білки із високим показником співвідношення світлопоглинання  $D_{254}/D_{280}$ . Після об'єднання проб піку MT-вмісної фракції (10 мл) проводять визначення в ній вмісту міді, цинку та кадмію.

Вміст металів у фракціях MT вимірюють після озолення зразків за 105 °С у перегнаній нітратній кислоті в співвідношенні 1:5 (маса:об'єм). Вміст цинку, міді та кадмію визначають на атомно-абсорбційному спектрофотометрі за загальноприйнятими методиками і виражають в мкмоль на г вологої маси тканини.

Вміст MT-Me в розрахунку на 1 г тканини обчислюють за модифікованим рівнянням Гамільтона, враховуючи стехіометричний характер зв'язування цих металів:  $m(\text{MT-Me}) = 0,5((v(\text{Zn}) \cdot M(\text{MT}) + v(\text{Cd}) \cdot M(\text{MT}))/7 + v(\text{Cu}) \cdot M(\text{MT}))/12$  (мкг), де  $v$  - кількість металу в MT, мкмоль/г тканини;  $M(\text{MT})$  молярна маса MT (7000 г/моль), 7 і 12 - кількість іонів цинку, кадмію і міді (I) відповідно, що зв'язуються молекулою MT за повного насичення. Для карася вміст MT-Me в нормі становить  $51 \pm 8$  мкг/г тканини.

Вміст MT-SH у 30 % гомогенаті тканини в 20 мМ трис-сахарозному буфері визначають за методом А. Viarengo та співавт. (1997) за взаємодією із 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойною кислотою (ДТНБ) після хлороформ-етанольної екстракції MT. Для цього приготований гомогенат центрифугують протягом 45 хв при 12000 g, 4 °С. Екстракцію супернатанту проводять сумішшю 0,5 мл охолодженого етанолу (до -20 °С) та 0,04 мл хлороформу з наступним центрифугуванням при 6000 g протягом 10 хв. До супернатанту додають 3 мл охолодженого етанолу, змішують протягом 15 с і переносять пробу на 1 год. в морозильну камеру. Після цього до суміші додають 1 мл 0,2 М фосфатного буферу рН 8,0 і пробу центрифугують протягом 12 хв при 6000 g. Супернатант декантують, а осад промивають 2 мл 20 мМ трис буферного розчину в етанолі, що містить 1 % хлороформу та 0,5 мМ сахарози та знову центрифугують протягом 20 хв при 3000 g, 4 °С. Після цього супернатант знову декантують, а осад ресуспендують в 0,3 мл 5 мМ трис-ЕДТА буферу, після чого додають 4,2 мл 0,43 мМ розчину ДТНБ в 0,2 М фосфатному буфері рН 8,0 і центрифугують 10 хв при 3000 g, 4 °С. Вимірюють світлопоглинання проби при 412 нм.

Вміст MT-SH в пробі визначають за калібрувальною кривою, побудованою на глутатіоні та обчислюють, вважаючи, що в 1 молі MT міститься така ж кількість SH-груп, як і в 20 молях глутатіону і виражають в мкг/г вологої тканини.

Для карася вміст MT-SH в нормі становить  $165 \pm 30$  мкг/г тканини. Кваліфікують біологічну відповідь і, відповідно, загальну токсичність водного середовища як:

- "мала токсичність" - значення MT-SH та MT-Me перевищують на 20-50 % значення показників у референційній місцевості (адекватна відповідь на стрес);

- "середня токсичність" - MT-SH/MT-Me становить більше 4,5 (стан тривоги, посилена експресія MT із зростанням антиоксидантного потенціалу);

- "висока токсичність" - значення MT-SH та MT-Me менші на 20-50 % значення показників у референційній місцевості (пригнічення стрес-індукованої відповіді в результаті виснаження стрес-залежних систем, втрата здатності зв'язувати метали у нетоксичні комплекси та реагувати на дію пошкоджуючих чинників збільшенням вмісту білка).

5 - з двох груп з подібним значенням MT-SH/MT-Me група з вищими значеннями вмісту MT-SH та MT-Me має переваги у адаптації до умов існування.

Реалізація корисної моделі проілюстрована на прикладах оцінки токсичності водного середовища за допомогою визначення MT-SH/MT-Me у печінці риби *Carassius auratus* (Cyprinidae).

10 Приклад 1.

Порівнювали співвідношення показників MT-SH/MT-Me у печінці риби *Carassius auratus* (Cyprinidae) з природних популяцій у ставах з верхньої течії р. Серет (3-група, референційна місцевість) та на р. Нічлава у зоні інтенсивного аграрного виробництва (Б-група, аграрно-навантажена місцевість) у травні, липні та вересні. Одержані результати представлені в таблиці 1.

15

Таблиця 1

Оцінка токсичності водного середовища на підставі визначення співвідношення MT-SH/MT-Me у печінці карася (Cyprinidae) з природних водойм

Параметр	Група	Весна	Літо	Осінь
Вміст MT-Me, мкг/г тканини	3	69,9±6,4	64,4±5,9	51,3±4,8 <sup>a</sup>
	Б	71,3±6,9	74,0±0,8 <sup>a, b</sup>	48,2±4,1 <sup>a</sup>
Вміст MT-SH, мкг/г тканини	3	23,4±2,1	384,2±52,6 <sup>a</sup>	138,7±17,0 <sup>a</sup>
	Б	43,1±13,1 <sup>b</sup>	485,4±18,3 <sup>a, b</sup>	204,2±11,5 <sup>a, b</sup>
MT-SH/MT-Me	3	0,33	5,97	2,70
	Б	0,60	6,57	4,24
Токсичність середовища	3	Висока	Середня	Мала
	Б	Висока	Середня	Мала

Примітка. <sup>a</sup> - відмінності в групі порівняно з весною вірогідні, <sup>b</sup> - відмінності між групами вірогідні,  $p < 0,05$ .

У весняний період резервні можливості MT карася для зв'язування металів у тіоловні кластери виявились недостатніми, що могло спричинити залежну від природи металу токсичність для організму. Низьке співвідношення показника MT-SH/MT-Me відображає високий рівень сезонного забруднення аграрно-навантажених місцевостей весною сполуками міді, яка входить до складу широко використовуваних пестицидів (мідний купорос, Косайд-2000, Купросат, Куприкол тощо).

20

Приклад 2.

25 Порівнювали співвідношення показників MT-SH/MT-Me у печінці риби *Carassius auratus* (Cyprinidae) з двох природних популяцій у ставах з верхньої течії р. Серет (3-група, референційна місцевість) та на р. Нічлава у зоні інтенсивного аграрного виробництва (Б-група, аграрно-навантажена місцевість) за впливу на рибу модельних забруднювачів в екологічно реальних концентраціях в лабораторних акваріумах протягом 14 діб. Такими забруднювачами були іони міді в концентраціях 0,005 мг/л (Cu(1)) та 0,05 мг/л (Cu(2)), іони марганцю в концентраціях 0,17 мг/л (Mn(1)) та 1,7 мг/л (Mn(2)), пестициди Аполло (діючий компонент - клофентезин (500 тіл)) в концентраціях 0,002 мг/л (A(1)) та 0,01 мг/л (A(2)) і ТАТТУ (діючі компоненти - манкоцеб 302 г/л та пропамокарб гідрохлорид 248 г/л) в концентраціях 0,0091 мг/л (T(1)) та 0,091 мг/л (T(2)). Дослідження було проведене в літній період, коли риби з двох популяцій відрізнялись за показниками MT найбільш істотно. Одержані результати представлені в таблиці 2.

30

35

Залежно від історії походження організму реалізуються різні моделі відповіді MT прісноводних тварин до дії додаткового пошкоджуючого чинника. Перша модель відображає вищу толерантність організму до дії забруднювачів внаслідок адаптації до субхронічних концентрацій токсикантів того ж класу (збільшення вмісту MT та показника MT-SH/MT-Me), а інша - перевищення адаптивних можливостей організму (високий базальний рівень MT з подальшим його зменшенням за дії додаткового пошкоджуючого чинника).

40

Таблиця 2

Оцінка токсичності водного середовища на підставі визначення співвідношення MT-SH/MT-Me у печінці карася *Carassius auratus* з природних водойм та за дії додаткового пошкоджуючого чинника на організм

Параметр	Група	3-група	Б-група
Вміст MT-Me, мкг/г тканини	Контроль	50,7±4,9	43,3±4,1
	Cu(1)	81,4±7,7 <sup>a</sup>	28,8±2,4 <sup>a</sup>
	Cu(2)	48,0±4,5	25,0±2,2 <sup>a</sup>
	Mn(I)	77,7±7,1 <sup>a</sup>	20,1±1,9 <sup>a</sup>
	Mn(2)	65,2±6,2 <sup>a</sup>	23,9±2,3 <sup>a</sup>
	A(1)	43,5±4,1	46,4±4,5
	A(2)	21,7±1,9 <sup>a</sup>	30,3±3,1 <sup>a</sup>
	T(1)	32,2±3,1 <sup>a</sup>	46,6±5,1
	T(2)	29,1±2,8 <sup>a</sup>	47,4±4,9
Вміст MT-SH, мкг/г тканини	Контроль	53,3±4,7	198,3±8,7 <sup>b</sup>
	Cu(1)	314,7±38,0 <sup>a</sup>	300,8±22,1 <sup>a</sup>
	Cu(2)	268,8±35,0 <sup>a</sup>	88,3±7,3 <sup>a</sup>
	Mn(1)	208,5±40,9 <sup>a</sup>	91,4±10,9 <sup>a</sup>
	Mn(2)	115,4±16,4 <sup>a</sup>	71,8±11,9 <sup>a</sup>
	A(1)	260,8±34,1 <sup>a</sup>	546,6±44,4 <sup>a</sup>
	A(2)	93,1±15,5 <sup>a</sup>	576,6±39,4 <sup>a</sup>
	T(1)	82,2±6,9 <sup>a</sup>	264,2±13,2 <sup>a</sup>
	T(2)	78,7±11,2 <sup>a</sup>	198,5±32,3 <sup>a</sup>
MT-SH/MT-Me	Контроль	1,05	4,58
	Cu(1)	3,87	10,44
	Cu(2)	5,60	3,53
	Mn(1)	2,68	4,55
	Mn(2)	1,70	3,00
	A(1)	6,00	11,78
	A(2)	4,29	19,03
	T(1)	2,55	5,67
	T(2)	2,70	4,19
Токсичність середовища	Контроль	Мала	Середня
	Cu(1)	Мала	Середня
	Cu(2)	Середня	Висока
	Mn(1)	Мала	Висока
	Mn(2)	Мала	Висока
	A(1)	Середня	Середня
	A(2)	Мала	Середня
	T(1)	Мала	Середня
	T(2)	Мала	Середня

Примітка. <sup>a</sup> - відмінності в групі порівняно з контролем вірогідні, <sup>b</sup> - відмінності між групами вірогідні,  $p < 0,05$ .

Наприклад, тварини аграрно-навантаженої місцевості (Б-група), які тривалий час існували за підвищеного вмісту органічних забруднювачів у середовищі, зберігають здатність реагувати на дію пестицидів збільшенням показника MT-SH/MT-Me (збільшення вмісту MT-SH та підтриманням металодепонувальної здатності, MT-Me), а за дії металів, особливо високих концентрацій (Cu(2), Mn(2)), з'являються ознаки токсичності. У тварин референційної 3-групи відповідь організму на дію іонів міді та марганцю знаходиться в межах адекватної адаптивної реакції, вміст MT-SH зростає у два-шість разів на тлі відносно стабільного вмісту MT-Me.

Карасю притаманний високий діапазон варіабельності показника MT-SH/MT-Me (0,33-19,03), що забезпечує певні переваги у його застосуванні як біомаркера. Запропонований показник MT-SH/MT-Me може бути використаний у системах раннього виявлення біозагроз.

Таким чином, спосіб дозволяє кількісно оцінити токсичність середовища для водних організмів, може бути реалізований як при дослідженні природних водних систем, так і у лабораторному токсикологічному експерименті.

5

## ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

10

Спосіб біоіндикації токсичності водного середовища, який включає біологічну оцінку токсичності водного середовища, який **відрізняється** тим, що обчислюють співвідношення вмісту металотіонеїнів у печінці риби за рівнем тіолових груп у білку та вмістом металів та класифікують рівень токсичності середовища як малий (адекватна відповідь), середній (стан тривоги, залучення металотіонеїнів до антиоксидантного захисту) або високий (стан виснаження, втрата здатності зв'язувати метали у нетоксичні комплекси та реагувати на забруднення збільшенням вмісту білка) залежно від величини цього співвідношення і абсолютного рівня його складових у двох групах порівняння.

15

---

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

---

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601

---