



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **155715** (13) **U**
(51) МПК
G01N 1/28 (2006.01)
G01N 33/12 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2023 01776</p> <p>(22) Дата подання заявки: 17.04.2023</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 04.04.2024</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 03.04.2024, Бюл.№ 14</p>	<p>(72) Винахідник(и): Куц Микола Миколайович (UA), Жигалова Олена Євгенівна (UA), Бирка Олена Вікторівна (UA), Куц Людмила Леонідівна (UA), Ляхович Любов Михайлівна (UA), Маценко Олена Вікторівна (UA), Савенко Микола Миколайович (UA)</p> <p>(73) Володілець (володільці): ДЕРЖАВНИЙ БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Алчевських, 44, м. Харків, 61002 (UA)</p>
---	--

(54) СПОСІБ БІОІНДИКАЦІЇ ЗАБРУДНЕННЯ ТЕРИТОРІЇ ТОКСИКАНТАМИ

(57) Реферат:

Спосіб біоіндикації забруднення території токсикантами включає збір равликів, що на ній мешкають. Від равликів відбирають верхню частину тулуба, що містить гепатопанкреас, з якої виготовляють гістологічні препарати, на яких визначають його мікроскопічну будову, за порушення якої роблять висновок про наявність забруднення території небезпечними токсикантами.

UA 155715 U

Корисна модель належить до екології, біоіндикації, екотоксикології, однією з проблем якої є вивчення впливу антропогенної діяльності на об'єкти навколишнього середовища та може бути використана для біологічної оцінки забруднення місцевості токсичними речовинами.

5 Як відомо, ґрунт, забруднений важкими металами, може становити серйозний ризик для здоров'я людей, а також інших живих істот екосистеми через різні шляхи впливу [14]. Способи визначення промислового забруднення ґрунту токсичними речовинами, в тому числі важкими металами, відомі [2, 3, 4], зокрема вони застосовуються для визначення вмісту нафтопродуктів, важких металів, фітотоксичних комбінованих ефектів. Для цього відбираються проби ґрунту і за допомоги спеціального обладнання і реактивів визначається вміст певних токсикантів. Але, такі дослідження є технічно складними, тривалими в часі, потребують складного і вартісного обладнання і реактивів. Відомі способи визначення вмісту важких металів у природних об'єктах завдяки використанню бактеріальних біосенсорів - штамів бактерій, що створюються методами генної інженерії і генерують світло при контакті з важкими металами. Але такі методи є надзвичайно трудомісткими, потребують наявності генетично модифікованих бактерій, які, як правило, не є життєздатними в складних екологічних системах, до яких належать ґрунти [5]. Відомі способи визначення комбінованого промислового забруднення на рослини [1], що включає вирощування тест-рослин за дії окремих ксенобіотиків, діагностику типу впливу на основі оцінки очікуваних та експериментальних значень розрахованого показника. Але для його реалізації необхідні складні математичні розрахунки, створення штучних умов вирощування рослин за дії різних доз ксенобіотиків, а також не апробованість у польових умовах.

Відомі способи оцінки стану екології за використання різних видів наземних равликів і слимаків - *Helix aspersa*, *Helix pomatia*, *Helix lucorum*, *Monacha carthusiana*, *Cantareus aspersus*, *Arion rufus*, *Helix vladika*, *Helix secernenda* тощо [7-16]. Виноградний равлик - *Helix pomatia*, садовий равлик - *Helix aspersa* є поширеними видами, що живуть в природі і, крім того, їх розводять на спеціалізованих фермах для отримання дієтичного м'яса та інших продуктів равликівництва. Анатомічно тіло равлика складається з голови, ноги і тулуба, верхня частина якого закручена у вигляді спіралі і вкрита черепашкою. М'ясом равлика є його нога.

Перевагою використання диких равликів, як біосенсорів екологічного стану місцевості є те, що вони є рослиноїдними організмами, є однією з природних ланок обігу більшості забруднювачів в екосистемі. Майже всі покоління окремої популяції равликів існують на певній території через дуже обмежену швидкість пересування і не здатні до міграції, при цьому мають тривалий термін життя. У зв'язку з цим равликів, яких називають дозорними видами, що надають надійну інформацію про забруднення місцевості важкими металами (екотоксикантами) рекомендують використовувати у комплексі заходів потужного моніторингу екологічного стану певної території [7, 11]. Після збору таких тварин від них найбільш часто відбирають найбільшу травну залозу - гепатопанкреас (залозу середньої кишки), а також стопу. Гепатопанкреас поєднує в собі функції печінки, підшлункової залози та видільну. Вважається, що саме гепатопанкреас в найбільшій мірі накопичує токсичні речовини, є надійним біомаркером наявності в організмі і, відповідно, в рослинах даної території важких металів [16]. У той же час, м'які тканини равлика не можуть бути індикатором забруднення ґрунту фтором через низьке його накопичення [12]. За допомогою відповідного обладнання і реактивів відібраний від равликів матеріал досліджують на наявність важких металів, поліциклічних ароматичних вуглеводнів. Самі важкі метали визначають за допомоги рідинної хроматографії, атомно-абсорбційної спектроскопії тощо [9, 10]. Крім того, маркерами накопичення в організмі равликів токсичних речовин є зміна активності різних ферментів перекисного окислення ліпідів: супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази, ферментів біотрансформації тощо [13, 15]. Способи визначення важких металів, ферментів в панкреасі равликів є точними, дозволяють визначити кількість певного хімічного елемента, але вони потребують спеціального вартісного обладнання і реактивів, їх складного технічного обслуговування, є тривалими в часі.

Найбільш близьким аналогом корисної моделі є спосіб визначення ступеня токсичності м'яса равликів [6]. При цьому способі від равликів відбираються проби м'яса. З яких готується екстракт, який вносять до тест-культури інфузорій *Colpoda steinii* і інкубують в термостаті, після чого проби проглядають під мікроскопом. За рухливості інфузорій через 3, 10 хв. і 3 год. визначається ступінь токсичності м'яса равликів. Але при цьому методі досліджується наявність токсинів не в гепатопанкреасі, який є найбільшим концентратором токсичних речовин в організмі равлика і найбільш чутливим органом [8], а в його м'ясі, не візуалізується мікроскопічний стан гепатопанкреаса, за яким можна визначити наявність чи відсутність ураження, а відповідно, токсичних речовин в організмі равлика. Крім того, в даному способі

біоіндикації ступеня забрудненості місцевості токсичними речовинами з'являється додаткова ланка ланцюга визначення, що зменшує його чутливість і ускладнює сам спосіб.

Тому задачею корисної моделі є удосконалення способу визначення ступеня забруднення території токсикантами. Спосіб біоіндикації забруднення території токсикантами полягає в тому, що за допомогою мікроскопу на гістологічних препаратах із зрізів верхньої частини тулуба, що містить гепатопанкреас равликів, зібраних з досліджуваної території, визначають його гістологічну будову.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі біоіндикації забруднення території токсикантами, що включає збір равликів, що на ній мешкають, згідно з корисною моделлю, від них відбирають верхню частину тулуба, що містить гепатопанкреас, з якої виготовляють гістологічні препарати, на яких визначають його мікроскопічну будову, за порушення якої роблять висновок про наявність забруднення території небезпечними токсикантами.

Приклад практичного виконання.

Спосіб біоіндикації забруднення території токсикантами здійснюють наступним чином. Збір равликів проводили в одній місцевості з двох ділянок. Перша ділянка (контрольна) була територією старого саду, який раніше належав колишньому колгоспу і більше 20 років ніякими хімічними засобами (захисту рослин, гербіцидами, мінеральними добривами тощо) не оброблялась. Друга ділянка (дослідна), що була розташована в кількох кілометрах від першої, представляла собою луки і безпосередньо прилягала до полігону побутових відходів. Всього для дослідження було відібрано по 10 равликів з контрольної і дослідної груп. Для відбору матеріалу проводили попередню підготовку равликів. Для цього їх занурювали в ємність, заповнену охолодженим окропом з додаванням 4 % розчину хлоралгідрату. Така підготовка дозволяла провести анестезію з наступною евтаназією равликів із збереженням розслабленого стану м'язів. Голова і нога при цьому лишалися не втягнутими в мушлю. Індикатором для початку препарування слугувало відділення від мушлі і вивертання назовні краю мантиї. Зразки для дослідження протягом тижня витримували в нейтральному водному розчині формаліну, причому, першу добу у 5 %, з наступною перефіксацією у 10 % розчині. Після видалення всього тулуба равлика із мушлі ножицями відсікали його верхню частину, що розміщена в дистальних завитках. З кусочків такої частини, які містять комплекс внутрішніх органів, в т.ч. гепатопанкреас, згідно класичного методу, готували гістологічні препарати. При цьому відібраний матеріал проводили через батарею спиртів зростаючої концентрації, просвітлювали в ксилолі і заливали а парафін. Гістологічні зрізи товщиною 7...10 мкм забарвлювали гістологічними барвниками гематоксиліном і еозином.

Результат: на гістологічних препаратах гепатопанкреас равликів контрольної групи мав типову будову, описану в наукових джерелах. Більшість структур цього органу при забарвленні препаратів гематоксиліном і еозином було визначено. Паренхіма гепатопанкреасу представлена залозистими трубочками і системою вивідних протоків, які відкриваються в порожнину кишечника. Клітинний склад залозистих трубочок містив 4 типи клітин: травні (digestive cells), екскреторні (excretory cells), кальцієві (calcium cells) та тонкі клітини (thin cells). Травні клітини містили в цитоплазмі численні секреторні гранули та інколи зелені гранули різного розміру. Екскреторні клітини відрізнялися наявністю вакуолі з великою жовтою гранулою. Кальцієві клітини мали переважно трикутну форму, меншу висоту, великі ядра та оптично щільну цитоплазму, інколи виявляли сферичної форми кальцієві гранули. Гранули були присутні також у порожнині вивідних протоків та шлунку. Тонкі клітини є недиференційованими камбіальними клітинами. У равликів дослідної групи залоза зберігала типову будову, але містила окремі ділянки некрозів. Зруйновані залозисті трубочки були заміщені сполучною тканиною. У деяких місцях спостерігали руйнування стінки кровоносних судин. Прощарки сполучної тканини були збільшеними також і між неушкодженими залозистими трубочками. У трубочках кількість травних клітин була меншою. Екскреторні клітини були збільшеними за розміром з кількома жовтими (коричневими) гранулами. В інших місцях стінка трубочок складалась переважно з кальцієвих клітин, для яких була характерна наявність в цитоплазмі великої кількості оптично світлих, оточеними мембранами гранул.

Отже, гепатопанкреас равликів, які мешкали на території поблизу полігону побутових відходів, мав зміни мікроскопічної будови, які вказують на тривалу дію на їх організм факторів токсичної природи з хронічним перебігом альтеративних процесів з боку паренхіми органу і є свідченням наявності забруднення території токсичними речовинами. Саме гепатопанкреас мав характерні гістоструктурні зміни, які свідчили про наявність хронічного ураження організму равлика за тривалої дії токсичних речовин у низьких та граничних концентраціях.

Спосіб біоіндикації забруднення території токсикантами є технологічно нескладним, вимагає лише доступного обладнання та може бути використаний в роботі екологічних і ветеринарних лабораторій.

Таким чином, спосіб біоіндикації забруднення території токсикантами дозволяє визначити наявність або відсутність забруднення певної території токсикантами.

Джерела інформації:

1. Патент України № 25709, МПК А01G 7/00. Спосіб визначення ефекту комбінованої дії ксенобіотиків на рослини / В.С. Феденко (Україна); Дніпропетровський національний університет. Заявка № u200511251; заявл. 28.11.2005; опубл. 27.08.2007, Бюл. № 16. 4 с.
2. Патент України № 28295, МПК G01N 31/08. Спосіб визначення ступеня забруднення твердих та рідких середовищ нафтопродуктами / В.С. Бакулін, В.В. Зубрилов (Україна); Український науково-технічний центр "Сенсор". Заявка № u96051820; заявл. 12.05.1996; опубл. 16.10.2000, Бюл. № 5. 3 с.
3. Патент України № 51113, МПК G01N 21/35. Спосіб визначення рівня забруднення ґрунту нафтою і нафтопродуктами / М.М. Мірошніченко, А.І. Фатєєв, В.І. Якушко, Л.М. Мирошніченко, О.І. Назаренко, В.Г. Кожина, Я.В. Пщенко (Україна); Національний науковий центр "Інститут ґрунтознавства та агрохімії імені О.Н. Соколовського". Заявка № u2002010143; заявл. 03.01.2002; опубл. 15.11.2002, Бюл. № 11. 3 с.
4. Патент України № 61105 України, МПК А01G 7/00. Спосіб визначення комбінованого ефекту промислового забруднення на рослини / С.В. Беспалова, О.З. Глухов, О.С. Горецький, А.І. Сафонов (Україна); Донецький національний університет. Заявка № u201014613; заявл. 11.07.2010; опубл. 11.07.2011, Бюл. № 13. 4 с.
5. Патент України № 75513, МПК G01N 33/18; C12Q 1/00; G01N 33/20; G01N 33/24. Спосіб визначення забруднення оточуючого середовища металами / О.Ф. Рильський, П.І. Гвоздяк, І.А. Шевчук (Україна); Запорізький державний університет. Заявка № u20040706208; заявл. 26.07.2004; опубл. 17.04.2006, Бюл. № 4. 4 с.
6. Патент України № 128928, МПК G01N 33/12; C12Q 1/02; C12R 1/90; C12M 1/34. Спосіб визначення ступеня токсичності м'яса равликів / Данілова І.С., Яценко І.В., Данилейко С.В. (Україна); І.С. Данілова, І.В. Яценко, С.В. Данилейко. Заявка № u201804813; заявл. 02.05.2018; опубл. 10.10.2018, Бюл. № 19. 3 с.
7. Al-Alam J., Millet M., Harb M., Akoury E., Tokajian S., Wazne M. Field evaluation of metal bioaccumulation in the gastropod *Helix aspersa* at agricultural and industrial sites in Lebanon. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2022. 195(1). 197.
8. Carbone D., Faggio C. *Helix aspersa* as sentinel of development damage for biomonitoring purpose: A validation study. *Molecular Reproduction and Development*. 2019. 86(10). 1283-1291.
9. Ćirić J., Ćerić O., Marković R., Janjić J., Spirić D., Popović M., Pećanac B., Baltić B., Baltić M. Ž. Seasonal distributions of heavy metal concentrations in different snail (*Helix pomatia*) tissues from an urban environment in Serbia. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018. 25(33). 33415-33422.
10. Larba R., Soltani N. Use of the land snail *Helix aspersa* for monitoring heavy metal soil contamination in Northeast Algeria. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2014. 186(8). 4987-95.
11. Mleiki A., Marigómez I., El Menif N.T. Green garden snail, *Cantareus apertus*, as biomonitor and sentinel for integrative metal pollution assessment in roadside soils. *Environmental Science and Pollution Research*. 2017. 24(31). 24644-24656.
12. Rać M.E., Stachowska E., Machoy Z. Shell of snail *Helix aspersa maxima* (Helicidae) as a protection of bioaccumulation toxic sodium fluoride in soft tissue. *Folia Biologica (Krakow)*. 2005. 53(3-4). 235-8.
13. Radwan M.A., El-Gendy K.S., Gad A.F. Oxidative stress biomarkers in the digestive gland of exposed to heavy metals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2010. 58(3). 828-35.
14. Soodan R.K., Pakade Y.B., Nagpal A., Katnoria J.K. Analytical techniques for estimation of heavy metals in soil ecosystem: a tabulated review. *Talanta*. 2014. 125.405-10.
15. Vranković J., Janković-Tomanić M., Vukov T. Comparative assessment of biomarker response to tissue metal concentrations in urban populations of the land snail *Helix pomatia* (Pulmonata: Helicidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2020. 245. 110448.
16. Vukašinić-Pešić V., Pilarczyk B., Miller T., Rajkowska-Myśliwiec M., Podlasińska J., Tomza-Marciniak A., Blagojević N., Trubljanin N., Zawal A., Pešić V. Toxic elements and mineral content of different tissues of endemic edible snails (*Helix vladika* and *H. secernenda*) of Montenegro. *Foods*. 2020. 9(6). 731.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб біоіндикації забруднення території токсикантами, що включає збір равликів, що на ній мешкають, який **відрізняється** тим, що від равликів відбирають верхню частину тулуба, що містить гепатопанкреас, з якої виготовляють гістологічні препарати, на яких визначають його мікроскопічну будову, у разі порушення якої роблять висновок про наявність забруднення території небезпечними токсикантами.