

Корисна модель належить до галузі біотехнології та гідробіології, до охорони навколишнього середовища, природокористування, водного господарства. Більш детально, пропонуване рішення стосується біологічних методів оцінки якості абіотичних складових водних екосистем (вода, донні відклади) і може бути застосовано для визначення загальної токсичності води та донних відкладів прісноводних водойм.

Відомий спосіб біологічної оцінки токсичності води з використанням як тест-об'єктів дафній, який передбачає поділ дафній на дві групи - дослідну та контрольну, розміщення кожної групи у відповідній камері, пропуск через камеру з контрольною групою дафній чистої води та через камеру з дослідною групою - досліджуваної води, реєстрацію фізіологічного стану дафній у групах та порівняння отриманих результатів, при цьому, з метою підвищення чутливості, швидкості та достовірності оцінки, спочатку через обидві камери пропускають з однаковою швидкістю чисту воду з температурою 16-23 °C, а з початком пропуску через камеру з дослідною групою дафній досліджуваної води температуру води в камерах підвищують з однаковою швидкістю до 26-35 °C, при цьому як показник фізіологічного стану дафній реєструють зміну частоти рухів їхніх епіподитів, про токсичність води судять за різницею середніх частот рухів епіподитів у дослідній і контрольній групах, а оцінку ступеня токсичності проводять за величиною проміжку часу, протягом якого досягається зниження середньої частоти рухів епіподитів дафній у дослідній групі на 50 % порівняно з частотою рухів епіподитів дафній у контрольній групі (патент UA 8530, опубл. 23.01.1984, 30.09.1996, бюл. № 3/1996).

У рівні техніки описаний спосіб біологічного контролю води на токсичність, який включає використання для тестування біологічного об'єкта, де для визначення токсичності використовують луску корокових риб, оцінюють її стан шляхом визначення площі порушення поверхні луски за допомогою умовного радіуса луски та відсотка дефектних лускових пластин у пробі, при цьому основними показниками є визначення відсотка порушених лускових пластин у пробі та визначення розміру тієї частини умовного радіуса, на яку розповсюджується від центра луски зона деформації і при наявності порушення поверхні луски, яке розповсюджується не більш як на $\frac{1}{4}$ умовного радіуса і кількість порушених лускових пластин у пробі не перевищує 10 %, то якість водного середовища характеризується як "відмінна", зростання цих показників свідчить про наявність токсикантів у воді, якщо деформована ділянка займає до $\frac{1}{3}$ умовного радіуса і кількість порушених лускових пластин у пробі становить до 25 % - "добра", якщо $\frac{1}{2}$ і кількість порушених лускових пластин у пробі складає до 50 % - "задовільна", якщо центральне ядро деформовано на $\frac{2}{3}$ умовного радіуса і кількість порушених лускових пластин у пробі становить до 75 %, то "погана"; якщо на тілі риби деформовано більш ніж 75 % луски, то якість водного середовища "дуже погана", що свідчить про необхідність вживання заходів для оздоровлення водного середовища (патент UA 92553, опубл. 25.10.2010 р.).

У рівні техніки описаний спосіб визначення рівня хронічної токсичності природної води, що полягає у внесенні тест-об'єктів в контрольну і дослідну воду, щодобовому годуванні тест-об'єктів, веденні обліку кількості живих тест-об'єктів і потомства, проведенні оцінки хронічної токсичності води на підставі різниці між показниками виживаності або репродукції тест-об'єктів в природній воді і контрольній, де як тест-об'єкти використовують церіодафнії *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg віком до 24 годин, як контрольну воду використовують питну воду або штучну прісну воду, як дослідна вода використовується природна вода, із якої готують ряд розбавлень, перед щодобовим годуванням у кожній посудині з церіодафніями проводять заміну контрольної та дослідної води на відповідну свіжоприготовану, під час заміни води підраховують кількість живих вихідних церіодафній та новонароджених особин, після підрахунку новонароджених особин видаляють, біотестування закінчують після того, як у контролі 60 % вихідних самок дадуть по три послідовних помети, тривалість біотестування становить 7 ± 1 діб, вірогідність різниці між дослідом і контролем за показниками виживаності та/або плодючості встановлюють за критерієм Стюдента, для цього розраховують фактичний критерій вірогідності різниці і порівнюють його з теоретичним, на цій підставі роблять висновок про те, що дослідна вода або її розбавлення чинить або не чинить хронічну токсичну дію, у випадку наявності хронічної токсичності рівень хронічної токсичності дослідної води дорівнює мінімальній кратності розбавлення, за якою хронічна токсичність води вже не виявляється (патент UA 67014, опубл. 25.01.2012 р.).

З рівня техніки відомий спосіб підготовки біологічного об'єкта для визначення токсичності води, що включає відбір біологічного об'єкта, за який використовують риб, при цьому відбирають однорідні за масою і довжиною особини та витримують останні у контрольному сольовому середовищі 10-14 діб при температурі 18-22 °C (патент UA 97199, опубл. 10.01.2012 р.).

З рівня техніки відомий спосіб встановлення гранично допустимого рівня токсичності зворотної води, що полягає у внесенні церіодафній *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg в контрольну і дослідну воду, як дослідну воду використовують зворотну воду, із якої готують ряд розбавлень, в яких експонують церіодафній протягом 48 годин без годування та наприкінці експонування підраховують живих церіодафній і розраховують відсоток загинувших церіодафній у контрольній воді, зворотній воді та розбавленнях зворотної води, визначають рівень токсичності зворотної води шляхом розрахунку її середнього летального розбавлення з урахуванням експериментально встановленого коефіцієнта, що

забезпечує виживаність церіодафній близько 100 %, який відрізняється тим, що на основі отриманих результатів з визначення рівнів гострої летальної токсичності розраховують фактичний рівень токсичності (ФРТ) зворотної води, для цього для кожної проби зворотної води розраховують кратність розбавлення, отримані значення кратності розбавлень використовують для розрахунку необхідної кратності розбавлення окремих проб зворотної води (НКРП), що характеризує ступінь розбавлення зворотної води водою водного об'єкта, остаточне значення необхідної кратності розбавлення (НКР) обчислюється як середнє арифметичне ряду значень НКРП окремих проб зворотної води, результат обчислення НКР дорівнює ФРТ зворотної води, отримане значення ФРТ використовують для встановлення гранично допустимого рівня токсичності зворотної води (патент UA 85348, опубл. 11.11.2013 р.).

З рівня техніки відомий спосіб визначення токсичності морської води з використанням, наприклад, середземноморської мідії *Mytilus galloprovincialis*, який складається в дослідженні м'якунів, побудові калібрувальної прямої і порівнянні з нею даних з різних районів дослідження, який відрізняється тим, що у м'якунів *Mytilus galloprovincialis* досліджують морфологічні показники, а саме площу і об'єм зяберних пелюсток, розраховують показник приведеної питомої поверхні S_0 , будують контрольний графік залежності приведеної питомої поверхні S_0 від довжини черепашки L для умовно чистого району і порівнюють дані S_0 і N , отримані для м'якунів із районів дослідження, причому S_0 для відносно чистих районів дослідження розташовуються на рівні або нижче контрольної прямої, а для забруднених районів - вище (патент UA 34783, опубл. 15.03.2001 р.).

З рівня техніки відомий спосіб біотестування токсичності ґрунтів та донних відкладів прісноводних водойм, згідно з яким проводять біологічне тестування ґрунтів та донних відкладів за допомогою двох наборів тест-об'єктів, кожен з яких складається з рослинної і тваринної форм; один з наборів (цибуля звичайна *A. сера*, дзвінець опушений *Chironomus plumosus* L.) використовується для біотестування безпосередньо ґрунтів та донних відкладів, а інший (ряска мала *L. minor*, церіодафнія афінис *C. affinis*) – для біотестування їх водних витяжок. Використання цих наборів дозволяє виявляти декілька видів загальної токсичності (гостру, хронічну, цито- та генотоксичність) і оцінювати їх рівні за допомогою розрахунку інтегральних індексів. В залежності від поставлених завдань кожен з тест-наборів може бути використаний окремо. Однак для отримання більш повної інформації з високим ступенем вірогідності щодо забруднення ґрунтів та донних відкладів, є більш доцільним використання одночасно обох наборів. У описаному біотестуванні на гостру та хронічну токсичність були визначені кількість іммобілізованих церіодафній та личинок хірономід, довжина кореневого пучка цибулі, довжина кореня та кількість утворених листців ряски. Дослідження на тваринних тест-об'єктах були проведені аналогічно до базового варіанту. Церіодафній і хірономід використовували в обох способах біотестування. Цитотоксичність виявляли за появою некротичних клітин, що утворились упродовж 8-ми діб на коренях та листцях ряски. Генотоксичність визначали, використовуючи клітини зони росту корінців цибулі, за мікроядерним індексом. Дію важких металів досліджували за морфологічними порушеннями, що відбуваються у рослинах ряски: зміною кольору листців, поділом рослин на окремі листці, відокремленням кореня. Хронічну дію кислот у складі відкладів досліджували за кількістю кореневих волосків цибулі у дослідних групах порівняно з контролем, застосовуючи таку саму формулу, що і для визначення індексу токсичності. На основі отриманих даних здійснювали комплексну оцінку небезпечності донних відкладів за визначеними для кожного тест-об'єкта індексами токсичності. Для інтегральної оцінки токсичної дії донних відкладів на організми розраховували середньоарифметичні значення визначених у дослідженнях індексів токсичності (патент UA 121873, опубл. 26.12.2017 р.).

У рівні техніки описаний спосіб визначення рівня гострої летальної токсичності зворотної води, що полягає у внесенні церіодафній в контрольну і дослідну воду, експонуванні протягом 48 годин без годування церіодафній, підрахунку живих церіодафній і розрахунку відсотка загиблених церіодафній у дослідній воді відносно кількості живих церіодафній у контрольній воді через 48 годин експонування з подальшою оцінкою токсичності води за критерієм загибелі 50 % і більше церіодафній, який відрізняється тим, що як дослідну воду використовують зворотну воду, із якої готують ряд розбавлень, в яких експонують церіодафнії та наприкінці експонування підраховують живих церіодафній і розраховують відсоток загиблених церіодафній у контрольній воді, зворотній воді та розбавленнях зворотної води, визначають рівень токсичності зворотної води шляхом розрахунку її середнього летального розбавлення з урахуванням експериментально встановленого коефіцієнта, що забезпечує виживаність церіодафній близько 100 % (патент UA 65090, опубл. 25.11.2011 р.).

У рівні техніки описаний спосіб біологічного тестування води, що полягає у внесенні церіодафній в контрольну воду і в дослідну воду, експонуванні протягом 48 годин без годування церіодафній, підрахунку живих церіодафній і розрахунку відсотка загиблених церіодафній у дослідній воді відносно кількості живих церіодафній у контрольній воді, відповідно, через 1, 6, 24 і 48 годин експонування з подальшою оцінкою токсичності води за критерієм загибелі 50 % і більше церіодафній, який відрізняється тим, що виконують додаткові підрахунки живих церіодафній і розрахунки відсотка загиблених церіодафній у дослідній воді відносно кількості живих церіодафній у контрольній воді через 3

і 12 годин від початку експонування, як контрольну воду використовують штучну прісну воду. Найкраще використовувати церіодафній *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg віком до 24 годин. Рекомендовано використовувати церіодафній, яких не менш як за 2 години до експонування перестають годувати. Штучну прісну воду краще готувати на дистильованій воді, в яку додають реактиви: магній сірчаноокислий, натрій вуглекислий кислий, кальцій сірчаноокислий, калій хлористий, натрій селеністоокислий. Додаткові підрахунки живих тест-об'єктів у початковій 12 годин експонування з подальшими розрахунками відсотка загиблих церіодафній у дослідній воді відносно кількості живих церіодафній у контрольній воді дозволяють вчасно виявити гостру летальну токсичність дослідної води з високим ступенем достовірності, оскільки саме на початку біотестування церіодафній найбільш чутливі до дії токсикантів. Це пояснюється інтенсивним ростом церіодафній, кормом для яких є лише складові відповідно дослідної води і контрольної води. Стабільність складу останньої гарантує відсутність в ній будь-яких домішок, які б впливали на життєдіяльність церіодафній, а тому і на результат розрахунків відсотка загиблих церіодафній у дослідній воді відносно кількості живих церіодафній у контрольній воді і, як наслідок, підвищує достовірність біотестування (патент UA 45053, опубл. 26.10.2009 р.).

Найближчого аналога до запропонованої корисної моделі не виявлено.

В основу корисної моделі поставлено задачу створення такого способу біологічного тестування води і донних відкладів, за яким за рахунок використання нових прийомів буде підвищена експресність виявлення токсичної дії при підтримці високої достовірності результатів досліджень.

Поставлена задача вирішується за рахунок способу біотестування токсичності води та донних відкладів прісноводних водойм, за яким, згідно з корисною моделлю, вносять тест-об'єкти у проби води, водні витяжки і порові води донних відкладів, де як тест-об'єкти використовують планктонні та бентосні організми, при цьому як планктонні організми використовують *Ceriodaphnia affinis*, *Daphnia magna*, а як бентосні організми використовують *Echinogammarus ischnus*, *Hyalella azteca*, при цьому вносять тест-об'єкти у дослідне і контрольне середовища та визначають рухову активність організмів в тестових ємностях, яку реєструють через 4, 8 і 24 год після внесення тест-об'єктів у дослідне і контрольне середовища, при цьому проводять автоматичну відеофіксацію рухової активності тест-об'єктів.

Згідно з запропонованою корисною моделлю, пропонується використання тест-об'єктів різних трофічних рівнів - планктонних (*Ceriodaphnia affinis*, *Daphnia magna*) і бентосних (*Echinogammarus ischnus*, *Hyalella azteca*) - для тестування токсичності води і донних відкладів (водні витяжки, порові води). Експресність способу досягається за допомогою порівняння рухової активності тест-об'єктів у дослідних і контрольних зразках, починаючи з ранніх етапів експозиції.

Контроль і підтримку фізико-хімічних параметрів середовища (температура, pH, концентрація розчиненого кисню, освітлення) для досягнення достовірних і відтворюваних результатів, забезпечує кліматостат.

Аналіз параметрів рухової активності організмів проводять шляхом відеофіксації з подальшою комп'ютерною обробкою отриманих відеоматеріалів.

Пропонований спосіб реалізують наступним чином:

Перед тестуванням проби води попередньо профільтровують через сито або тканинний фільтр з розміром вічок 50-100 мкм для видалення сторонніх організмів. Водні витяжки донних відкладів готують струшуванням наважки донних відкладів з реконструйованою водою середньої твердості [згідно з ДСТУ 4173:2003 "Якість води. Визначення гострої летальної токсичності на *Daphnia magna* Straus та *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (Cladocera, Crustacea)" (ISO 6341:1996, MOD)] (мг/дм^3 , NaHCO_3 96,0; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 60,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 60,0; KCl 4,0; pH 7,4-7,8) у співвідношенні 1:4 за вагою протягом 1 год, після чого її відстоюють, а надосадову рідину обережно зливають і використовують для тестування [згідно з "Методика получения водных вытяжек из донных отложений для их биотестирования"/Щербань Э.П. и др. Гидробиол. журн. 1994. No 4. С. 100-111.]. Порові води являють собою водорозчинну і біодоступну фракцію донних відкладів, їх готують центрифугуванням протягом 30 хв при 1200 g і 4 °C. Якщо концентрація розчиненого кисню у пробі нижче 4 мг/дм³, її лагідно аерують протягом 30 хв.

В експериментальні і контрольні ємності об'ємом 10 мл (наприклад, скляні стакани на 25 мл) вносять у п'яти повторах по 3 екземпляри молоді *Ceriodaphnia affinis* або *Daphnia magna* віком до 24 год. В інші ємності об'ємом 20 мл (наприклад, чашки Петрі діаметром 60 мм) вносять по 3 екземпляри молоді *Hyalella azteca* або *Echinogammarus ischnus* з лінійними розмірами, що не перевищують 3 та 4 мм, відповідно. За 2 години до внесення організмів у дослідні і контрольні зразки їх переносять з культиватійних ємностей у чисте середовище.

Фіксацію рухової активності організмів в тестових ємностях, що знаходяться у кліматостаті, проводять за допомогою відеозапису, який проводять через 4, 8 і 24 год після внесення тест-об'єктів дослідне і контрольне середовища. Відеозапис роздільною здатністю не менше 1280×720 пікселів з частотою не менше 15 кадрів в секунду виконують протягом 20 с із верхнього положення камери при додатковому нижньому освітленні тестових ємностей через матовий екран. У подальшому фрагменти

відео протяжністю 20 с піддають автоматичній комп'ютерній обробці, яка розділяється на такі етапи: переведення колірного режиму фрагмента у відтінки сірого, віднімання фону задля видалення статичних об'єктів; накладання кадрів у адитивному режимі для виявлення траєкторій тест-об'єктів, пропорційних пройденому ними шляху; підрахунок кількості пікселів, колір яких відповідає кольору траєкторій.

Роблять висновок про наявність токсичного впливу, оснований на статистичній оцінці достовірності різниці між пройденим шляхом тест-об'єктів у контрольних і дослідних зразках.

Приклади та варіанти втілення є лише ілюстративними і спеціалістам у даній галузі пропонуються різні модифікації та зміни, які охоплюються суттю запропонованої корисної моделі та обсягом формули корисної моделі.