

**МІНІСТЕРСТВО
НАУКИ І ОСВІТИ УКРАЇНИ**

**ХЕРСОНСЬКИЙ
ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНО-
ЕКОНОМІЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ**

**Факультет рибного
господарства та
природокористування**



**ВИЯВЛЕННЯ ТОКСИКАНТІВ У ОРГАНІЗМІ
РИБ**

Методичні рекомендації для проведення
практичного заняття з дисципліни
Екологічна токсикологія

Херсон -2021

Методичні рекомендації для проведення практичного заняття з дисципліни Екологічна токсикологія за темою: «Методи визначення токсинів у воді» розглянуто і схвалено засіданням методичної комісії факультету Рибного господарства та природокористування ДВНЗ «Херсонський державний аграрно - економічний університет», протокол № 7 від 26. 03 .2021 р.

Рецензенти:

Бреус Д.С. кандидат с.г. наук

Евтушенеко О.Т. кандидат с.г. наук

Оліфіренко В.В. Козичар М.В. Методичні рекомендації для проведення практичного заняття з дисципліни Екологічна токсикологія за темою: «Методи визначення токсинів у воді»- Херсон: ДВНЗ ХДАЕУ, 2021. 13 с.

Методичні рекомендації призначені для використання у навчальному процесі при підготовці бакалаврів спеціальностей 101 «Екологія» та 183 «Технологія захисту навколишнього середовища». Методичні рекомендації орієнтують здобувачів вищої освіти на підходи до самостійного вивчення передбачених програмою матеріалів, значно розширюють і поглиблюють свої знання, набувають практичних навичок дослідницькій роботі. У методичних рекомендаціях розглянута тема згідно робочої програми дисципліни "Екологічна токсикологія" та вказані підходи до вивчення теми, форми представлення вивчених матеріалів та контролю рівня їх засвоєння

© Оліфіренко В.В. – 2021

© Козичар М.В.- 2021

Тема : ВИЯВЛЕННЯ ТОКСИКАНТІВ В ОРГАНІЗМІ РИБ

Мета: Засвоїти головні методологічні засади виявлення токсикантів в різних органах та рідинах тіла та можливості їх застосування у польових умовах, навчитись за різними ознаками визначати вплив токсикантів на риб.

Прилади та матеріали: Свіжий матеріал риб різних родин, скальпелі, ножиці, кювети, предметні скельця, чашки Петрі, терези, мірна стрічка, мірна дошка, марля, вата, олівці, лупи, бінокляри, електрична або газова плитка, каструля, центрифуга, пробірки для відбору крові.

Схема заняття

| № п/п | Етапи виконання роботи | Кількість хвилин |
|----------|--------------------------------------|------------------|
| 1. | Опитування студентів за темою роботи | 10 |
| 2. | Опрацювання методичних вказівок | 10 |
| 3. | Виконання лабораторної роботи | 50 |
| 4. | Захист роботи | 10 |
| Загалом: | | 80 |

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

Характеристика дії отрут. Отрути локальної дії руйнують респіраторний епітелій зябер до його повного відділення від ниток зябрових пластин. Вони іноді викликають крововиливи із зябер. Спостерігаються зміни у клітинах – хроматофорах. На шкірі утворюється багато слизу. Слиз щільно вкриває зябра і це перешкоджає процесу дихання. Внаслідок цього нестача кисню і накопичення великої кількості вуглекислого газу. Спочатку ритм і глибина дихання збільшується. Риба у поверхні води хапає пухирці повітря і гине. У загиблої риби рот і зяброві кришки відкриті.

Нервово-паралітичні отрути викликають втрату рівноваги, спостерігається скажене спіралеподібне плавання. Риба стрімко кидається в різні боки і вгору, навіть виплигує з води. Очі тремтять. Клонічні судоми. Плавці розкриті. При великій дозі отруйної речовини збудження не буває, замість нього спостерігають в'ялість, пригнічення і загибель.

Отрути протоплазматичної дії викликають у внутрішніх органах патологічні зміни, уявні при розтині черевної порожнини.

При загибелі від гемолітичних отрут плазма крові набуває рожевого кольору.

Отрути наркотичної дії викликають клінічні ознаки сп'яніння, пригнічення (табл. 1).

Таблиця 1 – Симптоми отруєння риб різними групами отрут

| Отрути | Патогенна дія | Патанатомія | Назви деяких отрут |
|-----------------------|---|--|--|
| Локальної дії | Руйнується респіраторний епітелій до крововиливів. Багато слизу на шкірі, зябрах. Дихання глибше і частіше. | Зяброві пелюстки зруйновані. Ознака нестачі кисню – відкриті зяброві кришки і рот. Велика кількість слизу-захисна реакція організму. | Cl ₂ , H ₂ O ₂ , луги, KMnO ₄ , O ₃ , солі важких металів, формальдегід, кислоти, органічні барвники, дубильні речовини, детергенти |
| Нейропаралітичні | Втрата рівноваги, скажене спіральне плавання. Риба кидається вгору, в різні боки. Судоми, тремтіння очей, плавці розкриті як віяло, пригнічення та параліч. | Розкритий рот. Плавці віялом. | NH ₃ , солі аміаку, CO ₂ , лужні і лужноземельні метали, деякі неорганічні сполуки, P, нафта, фенол, смоли, дьогті і алкалоїди, сапонін, терпени, пестициди, гербіциди |
| Протоплазматичної дії | Порушення обмінних процесів, блокування дії ферментів | У черевній порожнині, червоний трансудат. Печінка, нирки набряклі. Нирки бліді. | F, ціаніди, меркаптани, сечовина |
| Гемолітичної дії | Гемоліз еритроцитів | Плазма крові і рідина черевної порожнини червоні | NH ₃ , солі аміаку, Pb, ціаніди, Sb, сапоніни, токсини синьо-зелених водоростей |
| Наркотичної дії | Наркоз без стадії збудження | Пригнічення, загибель | Вуглеводні, етилен, пентан, хлороформ, CCl ₄ , дихлоретан, ефір, кетони, етанол, альдегіди, нітросполуки |
| Комбінованої дії | Вказані вище з перевагою якогось із симптомів | Вказані вище | Амоніак, його солі, сапонін як нейропаралітичні, гемолітичні отрути або як отрути локальної дії |

Доказ токсичних властивостей водного середовища за допомогою рибної проби. Для доведення токсичності водного середовища проводять біологічні дослідження – рибну пробу та акваріумні досліди з найбільш чутливими гідробіонтами. Сутність біологічного методу ґрунтується на дії токсичної речовини на організм гідробіонта або інших тварин і урахуванні деяких патофізіологічних показників.

Рибну пробу провадять таким чином. У відділений від водойми садок поміщують найбільш чутливих до токсичних речовин риб, виловлених із благополучної водойми і спостерігають за ними. Одночасно в акваріумах проводять дослідження з чутливими тест – об'єктами – дафніями, хірономідами, циклопами, акваріумними рибками. Ці дослідження нескладні та наочні, переконливо доводять факт токсичності середовища.

Одночасно досліджують на токсичність ґрунт, проби води різних ділянок водойми.

Проба варкою – якісна реакція присутності токсиканта. До колби (чи каструлі) розміщують дрібні нарізані шматочки риби, заливають водою, закривають кришкою і нагрівають до закипання. Нюхають пару. Таким чином, можна визначити отруюючу речовину.

Запах та присмаки концентруються переважно у тканинах, багатих на жири – з боків риби і у черевній порожнині. Жир, легший за воду, розміщується на поверхні гарячої води. В процесі кипіння пари води виринаються з води крізь поверхню, вкриту тонким шаром жиру, і на мікроскопічному рівні краплини води з'єднуються з молекулами жиру, який має запах, специфічний для даної породи риби, і запах токсину, яким риба була отруєна. Це можуть бути: фенол та його похідні, бензол та його похідні, нафта та нафтопродукти (бензин, гас, солярове масло), смоли, каніфоль, камфора, ментол, ефірні масла, формальдегід, камфора тощо.

Специфічний запах мають різні пестициди, особливо фосфорорганічні, пліснявина, свіжа трава, огірки, діамантові водорості. Особливо нудотний запах у синьо-зелених водоростей, що розкладаються після закінчення

цвітіння. Ці запахи відрізняються від запаху риби свіжої і тієї, що розкладається.

Інтенсивність запахів оцінюють за 5 – бальною шкалою (рис.1).



1. Фенол та його похідні
2. Бензол та його похідні
3. Нафта та нафтопродукти (бензин, солярове масло)
4. Смоли
5. Дьогті
6. Каніфоль
7. Камфора
8. Ментол
9. Ефірні масла
- 10.Формальдегід
- 11.Пестициди, в т.ч. хлорорганічні та фосфорорганічні
- 12.Пліснява
- 13.Синьо-зелені водорості
- 14.Фіалки тощо

Оцінка інтенсивності запахів за 5-ти бальною шкалою:

- | | |
|-------|---------------------|
| + | дуже слабкий запах; |
| ++ | слабкий запах; |
| +++ | помірний запах; |
| ++++ | сильний запах; |
| +++++ | дуже сильний запах |

Рис. 1 Проба варкою – якісна реакція на присутність токсиканта

Біологічні та фізіологічні тести. Клінічний огляд проводять вибірково безпосередньо у водоймі при контрольному вилові, або розміщенні риб у спеціальні ємкості (акваріуми, садки, басейни та ін.).

Рекомендується продивлятися не менше 100 риб кожного виду і віку. Реєструють поведінку риб, лякливість, пригнічення, збудження, координацію

рухів, рівновагу у воді. Продивляють шкіряні покриви і плавці, звертають увагу на кількість і якість слизу, зміну кольору, наявність припухлостей, крововиливів, виразок, рубців, цист, куйовдження луски. Піднімаючи зяброві кришки продивляються зябра. Звертають увагу на колір, форму, малюнок і ступінь ослизнення зябер, структуру пелюсток, продивляючись їх за допомогою лупи. На губах і слизовій ротової порожнини реєструють наявність крововиливів, виразок, новоутворень.

Важливо звертати увагу на зміну в очах – западання або вирячкуватість (екзофтальм), крововиливи на роговиці, скаламутнення кришталіка.

Проводять облік риб в абсолютному та відсотковому вираженні.

Риб з клінічними ознаками направляють на патологоанатомічний розтин. Досліджують стан м'язів (колір, консистенцію, наявність крововиливів, гідремію тощо). У черевній порожнині звертають увагу на наявність ексудату (кількість, колір, запах, консистенція), на топографію і стан внутрішніх органів, стан жиру (кількість і колір), стан крові. Паренхіматозні органи проглядають на розтині (колір, консистенція, наявність крововиливів і некрозів).

Шлунок і кишки після зовнішнього огляду розрізають і реєструють факт заповнення їх кормовими масами.

У головному мозоку звертають увагу на стан судин, колір і консистенцію мозкової речовини.

Гематологічні дослідження. Кров – це чутлива система організму. Зміни у крові бувають якісні і кількісні. Це зміни у рідині і у формених елементах крові, а також порушення кількісних співвідношень між ними.

Кількісні зміни характеризуються збільшенням або зменшенням кількості еритроцитів, лейкоцитів, швидкості осадження еритроцитів, кількості гемоглобіну, гематокриту у порівнянні з нормою.

Зниження кількості лейкоцитів (або лейкопенію), спостерігають при гострих токсикозах.

Кров беруть із серця, зябрових судин, підшкірної артерії, або при відсіканні хвостового стебла. Шприц і голку обробляють розчином антикоагулянту (оксалат натрію, гепарин). Місце пункції після видалення луски обробляють 70° спиртом, ваткою знімають слиз.

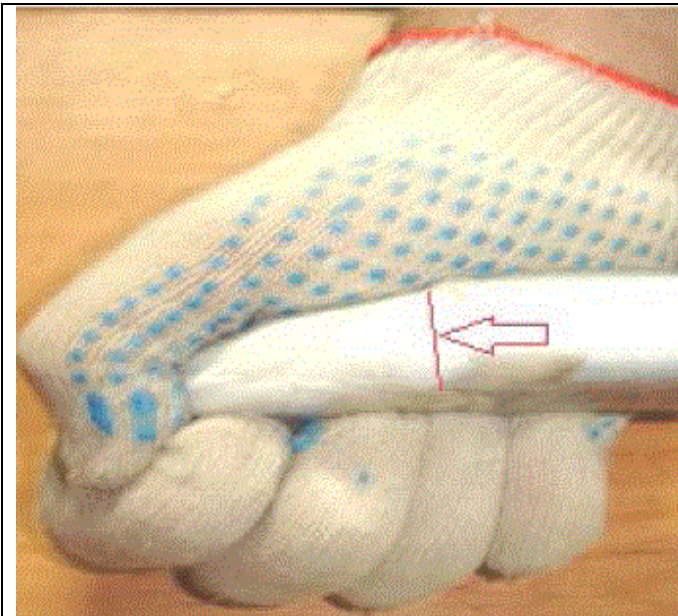
Найпростіше відсікати хвостове стебло, поверхня якого до того дезінфікується, місце відбору крові вказане на рисунку 2.



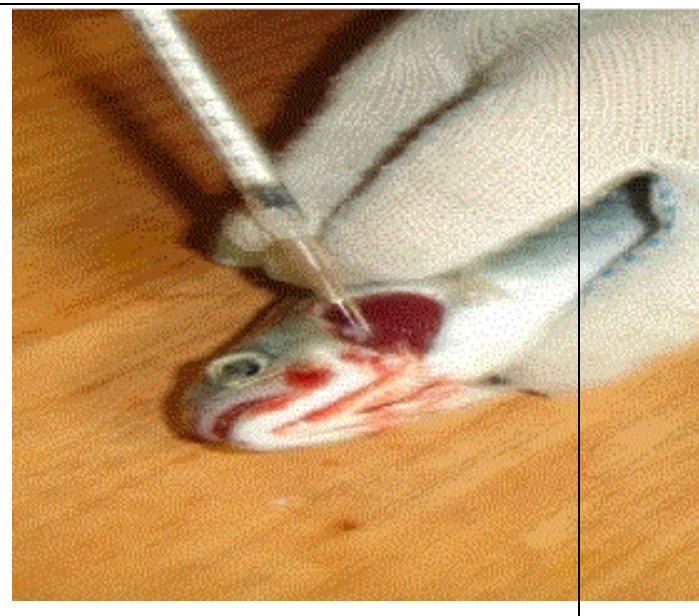
а



б



в



г

Рис. 2 Місце відбору крові у рыб: із хвостової артерії рыб : а – у стерляді, б – форелі; в - із серця (позначено місце пункції), г – із зябрової вени

Задля одержання сироватки крові пробірку з кров'ю 1 годину витримують в термостаті. Згусток крові відділяють голкою від скла. Сироватку можна одержати відцентрифугувавши формені елементи крові або витримавши кров при +4°C 12 годин. Якщо кров направляється до лабораторії, то до неї додають антикоагулянти (фтористий натрій, гепарин).

Гематологічні дослідження необхідні для виявлення отрути, що спричинила загибель риби. Отрути гемолітичної дії руйнують еритроцити, змінюють їх структуру. Деякі отрути викликають згущення або розрідження крові, змінюють швидкість осідання еритроцитів, викликають нейтрофілію, моноцитоз.

Гематологічні дослідження – важливий додатковий тест діагностичного дослідження на отруєння. Розроблені і широко використовуються лабораторні аналізи на визначення кількості еритроцитів і лейкоцитів. Сумішшю із спеціальним розчином заправляють скляні камери Горяєва, Тюрка та інші (вони уявляють собою предметне скло з лункою для рідини, на дні якої намальовані клітинки). Лунки накривають покривним склом так щільно, щоб на краях з'явилась веселка. Лунку заповнюють рідиною, яку досліджують. Під мікроскопом рахують формені елементи крові і визначають їх кількість і співвідношення.

Нейтрофілію викликає МНФ.

ТХМ – моноцитоз.

ТХМЗ – еритропенію,

а всі гербіциди – гемоліз.

Деякі токсини мають антигенні властивості. Для виявлення таких токсинів виготовляють анти сироватки (імунізуючи морських свинок в дозі LD₅₀). Організм тварини виробляє антитіла. У такої морської свинки беруть сироватки. Сироватка отруєної риби має отруту (токсин - антиген). В агаровому гелі роблять заглиблення. В одне з них капають сироватку морської свинки з антитілами, а в друге сироватку крові отруєної риби з антигеном. По закону, притаманному для всього живого, антиген з'єднується з антитілом, а

по законам фізколоїдної хімії рідини дифундують в гелі – там, де вони зустрічаються, з'являється біла риска. Це місце з'єднання антигену з антитілом. В лабораторії обов'язково заготовлені сироватки морських свинок, імунізованих різними отрутами.

Цей метод дозволяє точно встановити отруту, що викликала загибель риби.

Біохімічні індикатори. Біохімічними індикаторами визначають зміни в діяльності різних функціональних систем організму під дією отруйних речовин. Це неспецифічний метод діагностики, тобто він не дає відповіді на питання саме яка отрута викликала загибель.

В дослідницькій лабораторії завжди є індикатори, які дозволяють визначити вміст цукру в крові, кількість глікогену в печінці, ступінь дезактивації токсином ферментів та інше. Крім того, дослідник має довідник, в якому перелічені отрути, що викликають такі зміни.

Лабораторні дослідження

Студент за допомогою викладача вивчає таблицю 1 «Гідрохімічні показники для рибоводних господарств», де показані джерела забруднення, бажані і згубні межі забруднюючих факторів та їх наслідки.

Проба варкою і оцінка інтенсивності запахів за 5-ти бальною шкалою (згідно рисунку 2).

3 групи студентів досліджують проби риби отруєної:

- нафтопродуктами;
- фенолом;
- формаліном.

А також доброякісну рибу у якості контролю.

Група студентів провадить відбір крові з хвостової артерії. Кров центрифугують і визначають наявність гемолізу.

Результати досліджень занотовують у зошиті і докладають їх перед групою.

Питання для самоперевірки

1. Назвіть основні характеристики дії отрут.
2. Які ознаки нервово-паралітичних отрут? Що їх викликає?
3. Які ознаки отрут протоплазматичної дії? Що їх викликає?
4. Які ознаки отрут гемолітичної дії? Що їх викликає?
5. Які ознаки отрут наркотичної дії? Що їх викликає?
6. Які ознаки отрут комбінованої дії? Що їх викликає?
7. Методика біологічного методу визначення токсикантів.
8. Проба варкою– якісна реакція присутності токсиканта.
9. Назвіть категорії шкали оцінки запахів за проби варкою.
10. Методика проведення біологічних та фізіологічних тестів.
11. Порядок клінічного огляду риби.
12. Методика проведення гематологічних досліджень.
13. Біологічні індикатори.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ:

1. Давыдов О.Н., Куровская О.Я. и др. Экспресс диагностика болезней рыб. – Киев, 2001. – С. 43 – 50, 123 – 127, 156.
2. Давидов О.Н., Темніханов Ю.Д. основи ветсанконтролю у рибництві. Київ: Фірма «Інкос», 2004. – С. 49 – 50.
3. Канаев А.И. Ветеринарная санитария в рыбоводстве. М.: Колос, 1973. – С. 34 – 56, 138 – 147.
4. Козин Р.Б. Методика постановки биологической пробы в ихтиопатологии. Методы диагностики отравлений рыб в водоемах. М., 1971. С. 20 – 22, 31 – 32, 34.
5. Метелев В.В., Канаев А.И., Дзасохова Н.Г. Водная токсикология. М.: Колос, 1971. С. 51.
6. Оліфіренко В.В. Використання у лабораторній практиці експрес-методу біологічної оцінки риби. Таврійський науковий вісник : збірник статей та монографій. Айлант. 1998. Вип. 5, Ч. 2. С. 102–104.
7. Микитюк П.В., Присяная В.В., Бусалова Н.В. Лабораторний практикум з біології, патології та ветсанекспертизи прісноводних риб. Біла Церква, 1994. С. 10.
8. Оліфіренко В.В., Рачковський А.В., Козичар М.М. Використання біотестів на інфузоріях *Tetrahymena pyriformis* для еколого-токсикологічної оцінки водних об'єктів. Таврійський науковий вісник. Херсон. 2013. Вип. 84. С.246-248.
9. Оліфіренко В.В., Козичар М.М., Оліфіренко А.А. Визначення харчової та біологічної цінності риби за допомогою тест-організмів Таврійський науковий вісник. Херсон: Видавничий дім «Гельветика», 2013. Вип. 110.Ч.2. С.246-248.

Додаток А

Словник термінології ветеринарної медицини

Антиген – високомолекулярні колоїдні речовини, здатні викликати створення в організмі особливих глобулінів, здатних специфічно реагувати з антигеном.

Антигенні властивості – здатність бути антигеном.

Антисироватка – сироватка, яка має специфічні антитіла.

Антитіла – білкові речовини крові, здатні специфічно реагувати з антигеном.

Гель – дисперсна система, подібна за консистенцією до холодної (завдяки агар-агару або желатину), використовується для мікробіологічних досліджень.

Гематокрит – прилад для визначення співвідношення об'ємів формених елементів крові та плазми.

Гемоглобін – дихальний пігмент крові, у здоровому організмі гемоглобін знаходиться в еритроцитах, при деяких хворобах гемоглобін надає плазмі рожевого кольору.

Гематологічні дослідження – вивчення змін у крові для діагностики захворювання і отруєння.

Гідремія – підвищений вміст води в крові.

Глікоген – тваринний крохмаль.

Дезінфекція – знищення збудників інфекційних хвороб переважно хімічними і фізичними засобами.

Забруднюючі фактори – бактерії, віруси, збудники мікологічних захворювань, отруйні речовини.

Імунізація – засіб профілактики вакцинацією, засіб виробництва специфічної сироватки.

Індикатор - (той, що вказує) речовина, яка в невеликій кількості зміною кольору визначає наявність речовини, яку шукає дослідник. В сучасній лабораторії це прилад.

Координація рухів – узгодження між собою рухів здорової тварини.

Лейкопенія – зменшення кількості лейкоцитів в одиниці об'єму крові порівняно з нормою.

Лейкоцитоз - підвищення кількості лейкоцитів в одиниці об'єму крові порівняно з нормою.

Місце пункції – місце уколу ін'єкційної голки.

Паренхіма – тканина якогось органа, що виконує його специфічну функцію. Наприклад паренхіма печінки, нирок або м'язів.

Плазма крові – рідка частина крові без формених елементів.

Симптоми – ознаки хвороби.

Судоми клінічні – сильні безперервні рухи хворої тварини з великою напругою м'язів.

Термостат – шафа або приміщення, у якій підтримується задана температура.

Формені елементи крові – лейкоцити, еритроцити, тромбоцити, моноцити тощо.