



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **135972** (13) **U**
(51) МПК (2019.01)
A01G 13/00
G01N 33/24 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2019 01823	(72) Винахідник(и): Мельничук Віталій Васильович (UA), Юськів Ігор Дмитрович (UA)
(22) Дата подання заявки: 22.02.2019	(73) Власник(и): ПОЛТАВСЬКА ДЕРЖАВНА АГРАРНА АКАДЕМІЯ,
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.07.2019	вул. Сковороди, 1/3, м. Полтава, 36003 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.07.2019, Бюл.№ 14	

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ЯЄЦЬ НЕМАТОД У ПРОБАХ ҐРУНТУ

(57) Реферат:

Спосіб виявлення яєць нематод у пробах ґрунту включає відбір проб, підготовку зразку та дослідження на наявність яєць нематод шляхом мікроскопії проб з подальшим визначенням рівня контамінації ґрунту в перерахунку на 1 кг. Для дослідження з однієї проби відбирають 4 зразки ґрунту по 20 г, підготовка останніх здійснюється змішуванням ґрунту з флотаційною рідиною, відстоюванням проб впродовж 15-17 хвилин та подальшим підрахунком інвазійних елементів та визначенням рівня контамінації ґрунту за формулою.

UA 135972 U

Запропонована корисна модель належить до галузі ветеринарної медицини, а саме - ветеринарної паразитології, і може бути використана для дослідження ґрунту на наявність яєць гельмінтів з метою визначення забрудненості об'єктів довкілля пропагативними стадіями розвитку збудників паразитарних захворювань.

Нині в доступній літературі існує значна кількість способів дослідження об'єктів довкілля на наявність яєць гельмінтів. Слід зазначити, що більшість з них ґрунтуються на використанні простих або складних - багатокомпонентних флотаційних рідин, та володіють різною ефективністю.

Так, відомим є "Спосіб виявлення яєць гельмінтів, кліщів і ооцист найпростіших в пробах ґрунту" за методом Долбіна та ін. (2012).

Згідно методики пробу ґрунту вагою 25 г поміщають в центрифужну пробірку місткістю 250 мл і заливають 150 мл води, суміш ретельно розмішують скляною паличкою протягом 5 хв і центрифугують протягом 3 хв при 800-1000 об./хв, воду зливають, а в пробірку додають 150 мл трикомпонентної флотаційної системи, що складається з насичених розчинів цинку хлориду (2 кг $ZnCl_2$ на 1 л), натрію хлориду (0,42 кг NaCl на 1 л) і гліцерину, взятих у співвідношенні 1:1:1, в пробірку доливають той же розчин до утворення опуклого меніска, пробірку закривають знежиреним склом так, щоб воно торкалося шару рідини, через 20-30 хв скло знімають і проводять мікроскопію, зняття стекл рекомендується повторити 2-3 рази [Долбин Д. А., Лутфуллин М. Х., Соколова Ф. М. Обследования почвы на яйца гельминтов. Российский паразитологический журнал. 2014. № 2, 2014. С. 70-76].

Недоліком вказаного способу є використання як флотанту складної рідини, в якій хлорид цинку ($ZnCl_2$) є досить вартісним компонентом і автоматично в рази підвищує собівартість дослідження.

Як найближчий аналог використано загальновідомий "Спосіб виявлення в ґрунті яєць нематод" за методом Романенко (1968) та Гуджабідзе (1969).

Згідно методики, пробу ґрунту 25 г поміщають у центрифужну пробірку 250 мл і заливають 3 % розчином їдкого натрію чи калію у співвідношенні 1:1. Вміст пробірок ретельно розмішують, відстоюють 20-30 хв, потім центрифугують 5 хв за 800 об./хв. Надосадову рідину зливають, а осад промивають водою від 1 до 5 разів до отримання прозорої надосадової рідини. Після промивання до ґрунту додають 150 мл насиченого розчину натрію нітрату, ретельно розмішують і центрифугують 3 хв. За відсутності натрію нітрату можна використовувати розчин магнію сульфату. Після центрифугування пробірки із сумішшю ставлять у штатив і обережно доливають флотаційний розчин до утворення випуклого меніска, а потім накривають предметними скельцями. Суміш у пробірках відстоюють 30 хв, після чого скельця знімають, на їх місце ставлять чисті. На зняті скельця наносять декілька краплин 50 % водного розчину гліцерину. Краплини накривають покривними скельцями і мікроскопують [Котельников Г. А. Гельминтологические исследования животных и окружающей среды: Справочник. М. 1983. С. 150].

Недоліками вказаного способу є низька щільність флотаційного розчину та його швидка кристалізація на предметному склі, вказані недоліки істотно впливають на ефективність дослідження та об'єктивність отриманих результатів.

Задачею корисної моделі є підвищення діагностичної ефективності способу та скорочення часу дослідження.

Поставлена задача вирішується за рахунок того, що для дослідження однієї проби відбирають 4 зразки ґрунту по 20 г, підготовка останніх здійснюється змішуванням ґрунту з флотаційною рідиною, (двокомпонентний флотаційний розчин кальцієвої селітри (1000 г $Ca(NO_3)_2$ на 1 л води) з лугом (20-30 г KOH або NaOH) з питомою вагою 1,38-1,39 г / cm^3) відстоюванням проб впродовж 15-17 хвилин та подальшим підрахунком інвазійних елементів й визначенням рівня контамінації ґрунту за формулою:

$$K_p = \frac{(n_1 + n_2 + n_3 + n_4) \times 1000}{K_n},$$

де:

$$K_p = \frac{(n_1 + n_2 + n_3 + n_4) \times 1000}{K_n}$$

- рівень контамінації ґрунту (екземплярів яєць нематод/1 кг ґрунту);

$$K_p = \frac{(n_1 + n_2 + n_3 + n_4) \times 1000}{K_n}, \quad K_p = \frac{(n_1 + n_2 + n_3 + n_4) \times 1000}{K_n}, \quad n_3, n_4 - \text{кількість}$$

яєць нематод у зразку (n розраховується шляхом додавання кількості яєць нематод, виявлених у двох предметних скельцях, знятих з одного зразку ґрунту);

5 K_n - коефіцієнт перерахунку для визначення кількості яєць нематод в 1 кг ґрунту, складає 80 (розраховується додаванням ваги ґрунту кожного зі зрізків досліджуваної проби).

Спосіб виявлення яєць гельмінтів у пробах ґрунту проводять наступним чином. Спочатку готують двокомпонентний флотаційний розчин шляхом розчинення в 1 л в киплячій воді 1000 г кальцієвої селітри $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, після закипання додають 20-30 г лугу (NaOH або KOH), розчин охолоджують та фільтрують (щільність виготовленого розчину 1,38-1,39 г / cm^3).

10 Спосіб виконують наступним чином. З об'єднаної проби ґрунту беруть на дослідження 4 порції по 20 г, поміщають їх в центрифужні пробірки об'ємом 100 мл і заливають 3 % розчином натрієвого або калієвого лугу (в співвідношенні 1:1) й одразу вміст пробірок ретельно розмішують, відстоюють протягом 5 хв і центрифугують 3 хв при 800-1000 об. /хв. Надосадову рідину зливають, а до осаду додають воду. Після ретельного розмішування пробу залишають на 5 хв у спокої та зливають надосадову рідину, знову додають воду й ретельно розмішують осад. Промивання таким чином роблять 3-4 рази. Після промивання до ґрунту додають двокомпонентний насичений розчин в об'ємі 40-50 мл. ґрунт з розчином ретельно розмішують паличкою, отриману суміш центрифугують 5 хв при 800-1000 об./хв. Пробірки встановлюють у штатив, доливають розчином солі до рівня на 2-3 мм нижче країв пробірки і накривають чистим знежиреним предметним склом розміром 60 × 75 мм таким чином, щоб між краєм пробірки і предметним склом залишився простір шириною не більше 5 мм, куди за допомогою піпетки вносять насичений розчин солі до його зіткнення з нижньою стороною скла, яке обережно пересувають до повного покриття центрифужної пробірки. Через 15-17 хв відстоювання стекла знімають та обережно перевертають нижньою стороною до верху. На зняті скельця наносять декілька краплин водного розчину гліцерину. За потреби предметні скельця з поверхневою плівкою накривають покривними скельцями і мікроскопують. На місце знятих скелець ставлять інше. Визначення рівня контамінації ґрунту проводять згідно формули:

$$K_p = \frac{(n_1 + n_2 + n_3 + n_4) \times 1000}{K_n} p$$

де:

30 K_p - рівень контамінації ґрунту (екземплярів яєць нематод/1 кг ґрунту);

n_1, n_2, n_3, n_4 - кількість яєць нематод у зразку (n розраховується шляхом додавання кількості яєць нематод, виявлених у двох предметних скельцях, знятих з одного зразку ґрунту);

K_n - коефіцієнт перерахунку для визначення кількості яєць нематод в 1 кг ґрунту, складає 80 (розраховується додаванням ваги ґрунту кожного зі зрізків досліджуваної проби).

35 Для підбору ефективної щільності виготовленого флотаційного розчину проведено експериментальне дослідження. З цієї метою відібрано 15 проб ґрунту по 1000 г кожна. До кожної з проб вносили по 500 яєць трихурисів (виділених з кінцевих відділів гонад самок гельмінтів) виду *Trichuris ovis*. ґрунт з яйцями нематод ретельно перемішували, після чого витримували певний час у спокої з метою появи адгезії ґрунту з яйцями.

40 Показниками ефективності визначено кількість позитивних проб, кількість виявлених яєць в перерахунку на 1 кг ґрунту екз. / кг (середнє та його мінімальні й максимальні значення), а також наявність сторонніх решток різного розміру, облік яких умовно оцінювали: - незначна кількість дрібних сторонніх решток (*); - одночасне виявлення великої кількості дрібних решток та незначної кількості великих за розмірами (**); - велика кількість як дрібних, так й значних за розмірами сторонніх решток (***). Отримані результати наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Порівняльна ефективність пропонованої флотаційної рідини залежно від щільності розчину (n=15)

Щільність флотаційного розчину, г/см	Позитивних проб, екз.	Виявлено яєць		Наявність сторонніх решток
		екз/кг, M±m	min-max	
1,35	7	241,43±16,39	160-290	*
1,36	8	311,25±26,01	190-420	*
1,37	11	364,55±20,91	240-440	*
1,38	15	420,67±13,33	330-520	*
1,39	15	431,33±13,27	370-540	*
1,40	15	430,67±12,13	350-520	**
1,41	15	349,33±13,50	220-420	***

Дослідженнями встановлено, що пропонований флотаційний розчин за щільності від 1,35 до 1,41 г/см³ володіє флотаційними властивостями щодо яєць трихурисів. Зареєстровано, що найбільшу кількість яєць в пробах ґрунту виявлено за щільності розчинів від 1,38 до 1,40 г/см³ (від 420,67±13,33 до 431,33±13,27 екземплярів яєць/кг ґрунту). За визначення якості дослідження під час мікроскопії встановлено, що використання флотаційного розчину з щільністю 1,40 г/см³ призводить до значного спливання великої кількості сторонніх решток як дрібних так й великих за розмірами, що значно перешкоджає підрахунку та негативно впливає на об'єктивність отриманих результатів.

Таким чином встановлено, що за якісними та кількісними показниками, найбільш оптимальними для проведення дослідження слід вважати двокомпонентний флотаційний розчин кальцієвої селітри в поєднанні з лугом, щільність якого коливається в межах від 1,38 до 1,39 г/см³.

Приклад конкретного виконання.

З метою встановлення ефективності способу в умовах лабораторії проведено експериментальне дослідження 20-ти проб ґрунту, відібраного з місць утримання овець. Попередньо кожену пробу ретельно змішували та досліджували на наявність яєць нематод (трихурисів, капілярій, стронгілят, стронгілоїдесів та скрябінем). Одну й ту ж пробу досліджували за методом:

Романенко (1968) та Гуджабідзе (1969) – найближчий аналог;

Долбіна та ін. (2012) - аналог;

Пропонованим способом.

Визначали час, витрачений на підготовку та дослідження одного зразку проби з дворазовим зняттям покривних стекол, число позитивних проб, кількість виявлених яєць в одному зразку проби та їх мінімальні й максимальні значення. Результати досліджень наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

Порівняльна ефективність способів дослідження проб ґрунту на наявність яєць нематод (n=20)

Спосіб дослідження	Витрати часу, хв, M±m	Позитивних проб, екз.	Виявлене яєць	
			M±m	min-max
Пропонований спосіб	82,90±0,80	20	9,15±0,48	6-15
Романенко (1968) та Гуджабідзе (1969) (найближчий аналог)	126,95±1,33 ***	18	5,61±0,49 ***	2-9
Долбіна та ін. (2012) (аналог)	84,40±0,67	20	6,95±0,51 **	3-12

Примітка: **-p<0,01, ***-p<0,001 - порівняно з показниками пропонованого способу

Згідно результатів досліджень встановлено, що пропонований новий спосіб володіє вищими показниками ефективності порівняно зі способами Долбіна та ін. (2012) й Романенко (1968) та Гуджабідзе (1969). А саме, за показниками витрат часу на 1,78 % й 34,70 % (p<0,001) а також

кількістю виявлених яєць нематод у досліджуваному зразку проби на 24,04 % ($p < 0,01$) 38,69 % ($p < 0,001$) відповідно. За показником кількості позитивних проб на 10 % порівняно зі способом Романенко (1968) та Гуджабідзе (1969).

5

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб виявлення яєць нематод у пробах ґрунту, який включає відбір проб, підготовку зразку та дослідження на наявність яєць нематод шляхом мікроскопії проб з подальшим визначенням рівня контамінації ґрунту в перерахунку на 1 кг, який **відрізняється** тим, що для дослідження з однієї проби відбирають 4 зразки ґрунту по 20 г, підготовка останніх здійснюється змішуванням ґрунту з флотаційною рідиною, відстоюванням проб впродовж 15-17 хвилин та подальшим підрахунком тваринних елементів та визначенням рівня контамінації ґрунту за формулою:

$$K_p = \frac{K_n}{80} \cdot 100$$

15

де:
 K_p - рівень контамінації ґрунту (екземплярів яєць нематод/1 кг ґрунту);
 n_1, n_2, n_3, n_4 - кількість яєць нематод у зразку (n розраховується шляхом додавання кількості яєць нематод, виявлених у двох предметних скельцях знятих з одного зразку ґрунту);
 K_n - коефіцієнт перерахунку для визначення кількості яєць нематод в 1 кг ґрунту складає 80 (розраховується додаванням ваги ґрунту кожного зі зрізків досліджуваної проби).

20

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як флотаційну рідину використовується двокомпонентний флотаційний розчин кальцієвої селітри (1000 г $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ на 1 л) з лугом (20-30 г КОН або NaOH) з питомою вагою 1,38-1,39 г/см³.

Комп'ютерна верстка В. Юкін

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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