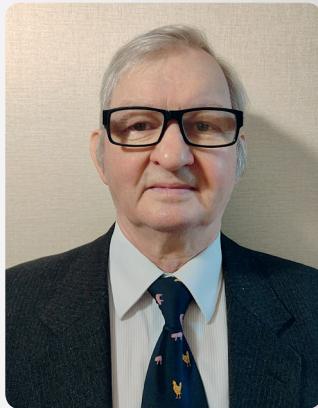


ЭКСПРЕСС-МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕЙ ТОКСИЧНОСТИ



При использовании экспресс-метода определения общей токсичности комбикормов и сырья для их производства у многих сотрудников лабораторий возникают вопросы. Мы решили повторить публикации статей **Андрея Олеговича Гроздова**, кандидата биологических наук, в которых он подробно излагает особенности работы, в частности, с простейшими — инфузориями стилонихиями и парамециями. Автор принимал участие в разработке и внедрении данного метода (впервые был введен в действие в 1991 г.), обучал специалистов его проведению. И сегодня к Андрею Олеговичу, занимающемуся микроскопией в ООО «Ависар», по-прежнему обращаются за консультациями. Надеемся, что его статьи помогут в производственной деятельности, в выпуске безопасной комбикормовой и животноводческой продукции.



ИСТОРИЯ СОЗДАНИЯ

Экспресс-метод определения общей токсичности был внесен в ГОСТ 29136-91 «Мука кормовая из рыбы, морских млекопитающих, ракообразных и беспозвоночных. Метод определения токсичности». Его разработка проводилась во Всесоюзном научно-исследовательском институте морского рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО) при совместном участии двух подразделений — технологического отдела и лаборатории прикладной физиологии и токсикологии, в которой автор данной статьи проработал 27 лет.

При разработке экспресс-метода использовали образцы рыбной муки, отобранный от различных партий со сроком хранения не более месяца со дня выработки. Мука была изготовлена из свежего рыбного сырья. Одна часть каждого образца хранилась в открытом пакете, прикрытым от пыли фильтровальной бумагой, в химически чистом помещении при комнатной температуре, другая часть — в холодильнике. В начале исследований, а затем через каждый месяц в

течение года определялось кислотное число жира (мг КОН), которое является индикаторным показателем, косвенно характеризующим уровень окислительных процессов и, соответственно, образования токсических веществ при окислении жира. Кислотное число жира в исходных образцах рыбной муки составляло 12–15 мг КОН / 1 г жира. Параллельно определялась выживаемость инфузорий стилонихий (*Styloynchia*) в водных растворах ацетоновых экстрактов рыбной муки. Концентрация ацетонового экстракта в водном растворе подбиралась практическим путем таким образом, чтобы в исходных образцах она была максимально недействующей (пороговой), выше которой проявляется псевдотоксический эффект вследствие повышенного содержания протеина (гиперпротонемия). Пороговой концентрацией ацетонового экстракта в водном растворе для инфузорий стилонихий, при которой еще не наступила их гибель (ЛКо), была концентрация 0,5 мл в 80 мл водной среды. Контрольная 0,5%-ная концентрация чистого ацетона

(удельный вес ацетона 0,8 г/мл) не вызывала гибели инфузорий. Параллельные исследования кислотного числа жира в рыбной муке в процессе хранения и выживаемости инфузорий при действии на них ее водного раствора ацетонового экстракта выявили тесную корреляционную связь между этими показателями. Максимально недействующей величиной кислотного числа жира для инфузорий (ЛКо), независимо от исходного значения и условий хранения муки, были 20 мг КОН. Достоверное различие, при котором начиналась гибель стилонихий (выживаемость 90%), наблюдалось при значениях 21–22 мг КОН. При дальнейшем увеличении кислотного числа жира выживаемость снижалась, полная гибель наступала при величине около 40 мг КОН. Примечательно, что максимально недействующее (пороговое) значение по кислотному числу жира в рыбной муке для инфузорий стилонихий соответствовало значению, указанному в Методических указаниях по диагностике и профилактике токсической дистрофии сельскохозяйственных птиц (№115-6а от 15.08.1984), утвержденных Главным управлением ветеринарии Минсель-

хоза СССР, с изменением (№117-7 от 10.04.1985) «О внесении изменений в Методические указания» — пункт 6.2. дополнить следующим: «Не рекомендуется скармливать птице корма животного происхождения с кислотным числом выше 20 мг КОН...».

При разработке экспресс-метода проводилась также работа с рыбной мукою, изготовленной из «задержанного» (слегка протухшего) сырья различной степени испорченности. Такая работа была продиктована тем, что директора заводов гранулированных рыбных кормов (таких заводов в системе Минрыбхоза СССР было четыре) часто предъявляли претензии к качеству рыбной муки, произведенной на плавбазах, которые проводили лов рыбы в экваториальных областях океана. Выловленная рыба хранилась в бункерах-накопителях при достаточно высокой температуре, а не в холодильниках, в результате сырье, поступавшее на переработку в рыбную муку, часто имело слабый душок. При работе с такой рыбной мукою было установлено, что мука с незначительным сроком хранения и кислотным числом жира чуть более 20 мг КОН может быть высокотоксичной. В данном случае определялась токсичность продуктов распада белка (трупных ядов). В связи с этим хотелось бы привести конкретный случай из своей практики, который произошел жарким летом 2010 г. Один предприниматель скупил в рыбхозе «Бисерово» всю рыбу после ее массового замора, возникшего из-за перегрева прудов, изготовил из нее рыбную муку и обратился в испытательную лабораторию для получения заключения о качестве. По результатам экспресс-метода рыбная мука оказалась высокотоксичной, что его крайне удивило.

Кроме того, при разработке экспресс-метода мы исследовали рыбную муку, имевшую незначительное количество мелких плесневелых частиц, — такая мука всегда была токсичной. Плесневение рыбной муки иногда возникает при нарушении

Сущность экспресс-метода заключалась в извлечении токсичных веществ ацетоном из рыбной муки и дальнейшем воздействии водного раствора ацетонового экстракта и присутствующих в нем мелкодисперсных частиц продукта на инфузорий стилонихий. Схема экспрессного определения токсичности муки кормовой из рыбы (с небольшим дополнением автора):



- измельчить среднюю пробу (три столовых ложки) в электрической лабораторной мельнице в течение двух минут,
- поместить навеску пробы массой 10 г в стеклянную посуду для экстракции (лучше всего подходят баночки из-под детского питания на 100 мл с крышкой),
- в баночку с навеской добавить мерной пипеткой ацетон в количестве 10 мл (для лучшей экстракции — 15 мл),
- встряхивать энергично содержимое баночки с плотно закрученной крышкой в течение двух минут, после чего крышку открутить, не снимая,
- отстаивать в течение 10 мин. Если это время просрочено и составляет более 15 мин, необходимо встряхнуть баночку с содержимым несколько раз до полного взмучивания осадка и отстаивать еще 10 мин,
- осторожно, не взмучивая осадок, отобрать 0,5 мл ацетонового экстракта шприцем и перенести в другую баночку с отстоянной в течение двух суток водопроводной водой средней жесткости и комнатной температуры в количестве 80 мл, тщательно перемешать,
- перенести инфузории калиброванной стеклянной пипеткой по одной капле из суточной культуры в микроаквариумы из оргстекла емкостью 0,4 мл в количестве 10–20 шт., в пяти повторностях (микроаквариумах),
- добавить в микроаквариумы по три капли водного раствора ацетонового экстракта другой калиброванной пипеткой с тем, чтобы дно микроаквариума было полностью смочено раствором, и провести подсчет инфузорий под микроскопом бинокулярным стереоскопическим (МБС-10), после чего добавить еще семь капель испытуемого раствора. Если водный раствор ацетонового экстракта вносится в микроаквариумы через некоторое время после его приготовления, его необходимо взболтать,
- через один час экспозиции провести повторный подсчет инфузорий, определить процент их выживаемости и сделать оценку токсичности рыбной муки: выживаемость 100–80% — нетоксична; выживаемость 79–50% — слаботоксична; выживаемость 49–0% — токсична.

технологии ее производства на плавбазах, когда она фасуется в мешки в недостаточно охлажденном виде. В этом случае на внутренней стороне мешка конденсируется влага, из спор микрогрибов, присутствующих повсюду, прорастают гифы, из которых впоследствии образуется тонкий слой микрогрибов (плесени)

в стадии спороножения. Споры начинают прорастать в рыбной муке, если ее влажность составляет более 12%. Позднее, при одновременном микроскопическом исследовании и экспресс-анализе на токсичность, было выявлено, что рыбная мука с наличием гифов микрогрибов всегда в той или иной степени токсична.

Основной особенностью экспресс-методов на инфузориях, как для рыбной муки, так и для других видов сырья и комбикормов, является использование комбинированной функциональной нагрузки, в качестве которой выступают протеин в тестируемом продукте и экстрагент-ацетон. При наличии каких-либо токсинов в кормовом продукте их токсичность накладывается на пороговую концентрацию (ЛКо) протеина, в результате чего токсичность выявляется в более низких концентрациях и в течение более короткого времени, что было бы невозможно без функциональной нагрузки. Функциональная нагрузка протеина регулируется концентрацией водного раствора ацетонового экстракта: чем выше содержание сырого протеина в продукте, тем ниже концентрация ацетонового экстракта данного продукта в водном растворе. Так, при среднем содержании сырого протеина в рыбной муке 60%, а в комбикормах 20%, концентрация ацетоновых экстрактов продуктов составит соответственно 0,5 мл в 80 мл и 0,5 мл в 40 мл водной среды, то есть с учетом удельного веса ацетона (0,8 г/мл) — это 0,5% и 1,0%. Как видим, здесь наблюдается нелинейная обратно пропорциональная зависимость: концентрация протеина в рыбной муке в 3 раза выше, чем в комбикорме, а концентрация водного раствора ацетонового экстракта ниже в 2 раза. Вероятно, функциональная нагрузка протеином зависит не только от его содержания, но и от аминокислотного состава, а также от ряда других факторов. Функциональная нагрузка протеином регулируется также концентрацией мелкодисперсной взвеси продукта в тестируемом растворе, что определяется временем отстаивания ацетонового экстракта, которое равно 10 мин (допускается до 15 мин). В случае если при отстаивании ацетонового экстракта рыбной муки в течение 10 мин образец покажет слабую токсичность, то при отстаивании экстракта в течение 30 мин образец будет нетоксичным (в схеме определения токсичности это учтено в пунктах 5 и 8).

Более высокое токсическое действие при более высокой концентрации мелкодисперсной взвеси продукта объясняется не только более высокой концентрацией протеина, но и большим количеством токсичных частиц продукта, поступающих через клеточный рот инфузорий в их пищеварительную вакуоль.

Судьба ГОСТ 29136-91 «Мука кормовая из рыбы.... Методы определения токсичности» решилась в 2006 г. — его действие было прекращено. Однако необходимо напомнить, что приведенным в нем экспресс-методом рыбная мука при кислотном числе жира 40 мг КОН/1 г жира определялась как токсичная. А в действующем сегодня межгосударственном стандарте ГОСТ 2116-2000 «Мука кормовая из рыбы, морских млекопитающих, ракообразных и беспозвоночных. Технические условия» кислотное число жира в рыбной муке допускается до 55 мг КОН/1 г жира.

В настоящее время крупные комбикормовые заводы, а также крупные свиноводческие и птицеводческие комплексы, имеющие собственное комбикормовое производство, закупают рыбную муку не в соответствии с техническими условиями ГОСТ 2116-2000, а по договорам, в которых одним из основных условий является требование к кислотному числу жира — менее 20 мг КОН/1 г жира.

Тем не менее экспресс-метод определения токсичности рыбной муки продолжает жить — он является фрагментом межгосударственного стандарта ГОСТ 31674-2012 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности» (с Изменением №1 от 2017 г.). Согласно таблице 1, приведенной в пункте 4.1.2.9 данного ГОСТ, рыбная мука относится к виду испытуемого корма, токсичность которого определяется экспресс-методом на инфузориях.

О НАЧАЛЕ ПУТИ. СТИЛОНИХИИ



В 1992 г. экспресс-метод с использованием инфузорий стилюнихий был внесен в ГОСТ 13496.7-92 «Зерно фурражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения токсичности». Этот же метод, как было сказано выше, был включен в ГОСТ 29136-91 «Мука кормовая из рыбы, морских млекопитающих, ракообразных и беспозвоночных. Метод определения токсичности». В качестве основного (арбитражного) метода в нем приведен метод оценки токсичности по снижению прироста численности инфузорий стилюнихий в сравнении с контролем в процентах при 24-часовом действии нефильтрованного водного экстракта, содержащего мелкодисперсную взвесь кормового продукта. Ранее этот метод был разра-

ботан автором настоящей статьи для определения токсичности гранулированных комбикормов, используемых в садковом рыбоводстве. Метод прошел производственную проверку и получил положительную оценку в конце рыболовного цикла в трех рыболовных хозяйствах, одним из которых было Волгореченское. Прототипом данного метода послужил метод определения токсичности донных грунтов в местах сброса сточных вод различными производствами с применением инфузорий стилюнихий. Метод изложен в кандидатской диссертации автора: «Токсикологическая характеристика некоторых видов зоопланктона в связи с биотестированием сточных вод и загрязняющих веществ». Производственная проверка 24-часового

метода определения токсичности гранулированных рыбных комбикормов в Волгореченском рыбхозе в 1988 г. послужила отправной точкой для создания экспресс-метода определения токсичности комбикормов для садкового рыбоводства с использованием их водных растворов ацетоновых экстрактов и с экспозицией инфузорий в течение одного часа. На этом хотелось бы остановиться подробнее.

Волгореченский рыбхоз выращивал товарную рыбу (карп, форель, осетровые) в проточных садках в течение всего года на теплых водах, поступающих с Костромской ГРЭС. Потребление корма было высоким, все его партии проверялись на наличие токсичности на рыбках гуппи. Исходя из своей практики, рыбоводы полностью доверяли данному методу. Разработан он был во ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии (ВНИИВСГЭ) Курмановым И.А. и утвержден ГУВ МСХ СССР 4 июня 1980 г. Метод основан на введении концентрированного ацетонового экстракта корма в банку с водой, в которую помещают пять рыбок гуппи. Степень токсичности корма определяют по количеству погибших рыбок через 24 ч экспозиции. Он работает на совместном действии всех присутствующих токсинов и уникalen по подбору тест-организма: токсины поступают сразу в кровь рыбок через жабры и разносятся во все органы и ткани, минуя пищеварительную систему, в результате чего достигается быстрота ответной реакции всего организма — через 24 ч. При непосредственном кормлении рыбок гуппи токсичными кормами ни одна не погибла, так как у них мощная система пищевой детоксикации, которая, к сожалению, пока никем не изучена.

В Волгореченском рыбхозе нами была предпринята попытка реализовать метод определения токсичности на рыбках гуппи в приложении к другому тест-объекту — инфузориям стилонихиям. Для этого использовались рыбные корма с различными сроками хранения: свежие; находившиеся на хранении; с законченным сроком

годности. На рыбках гуппи они были определены как нетоксичные, слаботоксичные и токсичные, соответственно. Основной задачей при отработке экспресс-метода являлась практическая «привязка» инфузорий к рыбкам гуппи на комбикормах, которые показали на рыбках отсутствие токсичности. Для этого практическим путем на нетоксичных кормах была подобрана концентрация водного раствора ацетонового экстракта, которая не вызывала гибели инфузорий (ЛКо). При увеличении концентрации фиксировалась гибель инфузорий, причем в течение часа. С увеличением времени экспозиции более одного часа гибель инфузорий не возрастала. При установленной концентрации водного раствора ацетонового экстракта далее тестировались на инфузориях корма, показавшие на рыбках гуппи слабую токсичность и токсичность. Выживаемость стилонихий составила соответственно около 60% и 10%, а время, за которое происходила их гибель, также было равно одному часу. Это время оказалось характерным для динамики токсического действия подобранный концентрации — 0,5 мл ацетонового экстракта, извлеченного из 10 г мелкоизмельченного корма, на 50 мл водной среды, и оно стало временем экспозиции для инфузорий стилонихий при определении токсичности комбикорма. Перед тестированием приготовленные водные растворы ацетоновых экстрактов фильтровались через бумажный фильтр для удаления из них жира, создающего пленку на поверхности водной среды. При этом мелкодисперсный взвешенный жир, соответствующий по размерам пищевым частицам для инфузорий, придавал белесый цвет раствору, мутность которого зависела от содержания жира в пробе. С увеличением объема исследований комбикормов различной степени токсичности была разработана шкала оценки токсичности по проценту выживаемости инфузорий, которая дана в схеме определения токсичности на странице 54.

Результаты работы в Волгореченском рыбхозе в дальнейшем легли в основу заявки на изобретение от 14.04.1992, и в 1995 г. был получен Патент №2049994 на изобретение «Способ оценки качества кормовых и пищевых продуктов» (авторы: Гроздов А.О. и Цвылёв О.П.).

Расширению использования и распространению экспресс-метода на другие виды комбикормов и сырья содействовали специалисты производственной лаборатории одного из крупнейших в то время свиноводческих комплексов страны — совхоза «Пермский» (поголовье 160 тыс. свиней). После публикации статьи об экспресс-методе в 1989 г. к нам обратилась ветеринарный врач-токсиколог этого совхоза Дорогфеева Ф.Г. с просьбой разработать экспресс-метод определения токсичности комбикормов для свиней. Экспресс-метод мог помочь решить проблему сохранности молодняка. На свинокомплексе токсичность комбикормов определяли по ГОСТ 13496.7-87 «Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения токсичности» на белых мышах по воспалительной реакции при подкожном введении им ацетоновых экстрактов (метод кожной пробы на кроликах был оставлен только для определения токсичности зерна фуражного и продуктов его переработки).

Поскольку методом на белых мышах не выявлялась токсичность комбикормов для свиней, ее определяли методом кожной пробы на кроликах, который показывал высокую (85%) сходимость с клинической картиной, полученной на свиньях. Однако из-за длительности биоанализа на кроликах, который составлял семь дней, этот метод не способствовал предотвращению отхода поросят и абортированного опороса свиноматок, он только давал объяснение причин ущерба. Свиноводству был крайне необходим экспресс-метод, который объективно выявлял бы токсичность комбикормов.

Экспресс-метод определения токсичности кормов для свиней был разработан за четыре месяца, в течение которых из совхоза «Пермский» оперативно поступали на исследования образцы комбикормов для поросят и свиноматок (всего 60 шт.). По кожной пробе на кроликах комбикорма были определены как нетоксичные и слаботоксичные, с различной степенью гиперемии, что подтверждалось клинической картиной на свиньях. Рабочую концентрацию водных растворов ацетоновых экстрактов для данных видов кормов установили аналогичным способом, что и для рыбных кормов. Она составила 0,5 мл ацетонового экстракта, извлеченного из 10 г мелкоизмельченного корма, на 40 мл водной среды, то есть это 1%-ный раствор. При выживаемости инфузорий ниже 90% те же корма по кожной пробе на кроликах показали слабую токсичность. Степень токсичности кормов, определяемой по выживаемости инфузорий, была проранжирована по кожной пробе на кроликах как единственного арбитражного метода, применяемого в течение многих лет (исключением является метод, описанный в ГОСТ 13496.7-87).

Слабая токсичность корма, выявленная на инфузориях стилонихиях, подтвердилась на поголовье свиней: у свиноматок и поросят наблюдалось снижение поедаемости корма, рвота, гастроэнтериты. Потребление таких кормов в течение недели и больше приводило к массовому падежу поросят и abortам у свиноматок. Совпадение результатов по токсичности комбикормов, полученных на инфузориях стилонихиях, с клинической картиной на поросятах и свиноматках достигает 90%, с кожной пробой на кроликах — 85%. Более высокое совпадение результатов экспресс-метода со свиноводческими показателями объясняется тем, что кожная проба на кроликах реагирует только на действие микотоксинов дермонекротического действия, а инфузории регистрируют действие токсинов более широкого спектра.

В совхоз «Пермский» комбикорма поступали с расположенного вблизи Краснокамского комбикормового завода и скармливались не позднее недели со дня производства, то есть корма были неокисленные. Токсичность свежих комбикормов обуславливалась в основном присутствием микотоксинов, что подтверждалось высоким (85%) совпадением результатов кожной пробы на кроликах со свиноводческими показателями. Позднее автору поступали сообщения с некоторых свиноводческих хозяйств, которые использовали комбикорма с незаконченным сроком годности, но определенные экспресс-методом как слаботоксичные (выживаемость инфузорий составляла 70%). На фоне скармливания этих кормов происходил массовый падеж поросят, при этом токсичность не подтверждалась арбитражным методом кожной пробы на кроликах (он был единственным арбитражным методом до 2005 г.), а кислотное число жира составляло около 26 мг КОН.

С 14 марта 1990 г. совхоз «Пермский» начал проводить биотестирование поступающих кормов экспресс-методом на инфузориях стилонихиях, при этом слаботоксичных кормов было выявлено 10,2%. По итогам 1990 г. был произведен расчет ожидаемого экономического эффекта при использовании экспресс-метода определения токсичности комбикормов для свиней на инфузориях, полученного за счет предотвращенного ущерба от скармливания слаботоксичных кормов. Расчет основывался на показателе сохранности молодняка, который мог быть выращен и сдан на мясокомбинат. Экономический эффект составил 835,9 тыс. руб. в год в ценах 1990 г. В том же году совхоз «Пермский» обратился с письмом в отдел стандартизации в пищевой, легкой промышленности и сельском хозяйстве Госстандарта СССР о необходимости пересмотра ГОСТ 13496.7-87 с включением в следующий ГОСТ экспресс-метода определения токсичности комбикормов. Реакция

Госстандарта оказалась быстрой и через месяц было проведено совещание, на котором установили порядок проведения производственных проверок. Создание экспресс-метода по определению токсичности кормов для свиней являлось внеплановой работой без привлечения госфинансирования, поэтому метод прошел тщательную проверку в девяти организациях страны: Республиканской производственной лаборатории комбикормовой промышленности (РПЛКП) Минхлебопродуктов Белорусской ССР, РПЛКП Минхлебопродуктов Молдавской ССР, РПЛ Госхлебинспекции Минхлебопродуктов РСФСР, областной ветеринарной лаборатории Ростовского Агропромсоюза, Ростовской областной проектно-изыскательской станции химизации сельского хозяйства Госагропрома РСФСР, на Раменском комбинате хлебопродуктов, в совхозе «Пермский», на птицефабрике «Томилинская». Последняя производственная проверка проводилась в начале 1992 г. во ВНИИ комбикормовой промышленности, организованная Техническим комитетом по стандартизации ТК4 «Корма, комбикорма, кормовые добавки», который рассматривал вопрос о внесении метода определения токсичности на инфузориях стилонихиях в качестве предварительного ускоренного метода в ГОСТ 13496.7-92 «Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения токсичности». Для этого в течение одного дня экспресс-методом на инфузориях стилонихиях определяли токсичность комбикормов и сырья (всего 18 образцов), результаты тестирования сравнивали с результатами, полученными ранее методом кожной пробы на кроликах (основной, арбитражный). Совпадение результатов основного и экспрессного методов составляло 80%. Несовпадение в 20% было обусловлено тем, что экспресс-методом токсичность выявлялась, а основным — нет. Это легко объяснимо. Как уже упоминалось

выше, метод кожной пробы на кроликах регистрирует наличие только микотоксинов дермонекротического действия, а экспресс-метод на инфузориях регистрирует совокупное действие всех токсинов, которые поступают в организм-клетку в растворенном виде через клеточную оболочку и с

мелкодисперсной взвесью продукта через клеточный рот инфузорий в пищеварительную вакуоль.

На основании комплексной производственной проверки, которая показала высокую сходимость (до 90%) с объектами выращивания (свиньи, птица), а также с арбитражным методом

кожной пробы на кроликах (80%), решением Технического комитета по стандартизации ТК4 экспресс-метод на инфузориях стилонихиях был внесен в ГОСТ 13496.7-92 «Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения токсичности».



ПРОДОЛЖЕНИЕ ПУТИ. ПАРАМЕЦИИ

В 1993 г. ГОСТ 13496.7-92 «Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения токсичности» был утвержден и введен в действие. Следующим был ГОСТ 13496.7-97 под тем же названием.

При создании данного стандарта ВНИИ рыбного хозяйства и океанографии в качестве разработчика не привлекался, в результате чего не были устранены недостатки экспресс-метода на инфузориях стилонихиях, которые обнаружились в процессе внедрения этого метода на 450 предприятиях. Основной недостаток — отсутствие стандартной среды культивирования инфузорий. На отстоянной водопроводной воде средней жесткости культура инфузорий показывала одинаковую токсикорезистентность (устойчивость к токсическому воздействию), но на воде с повышенной жесткостью она значительно возрас- тала, в результате чего токсичность кормов не выявлялась. Все недостатки экспресс-метода на инфузориях стилонихиях были устранены в следую- щей разработке автора на инфузориях парамециях (*Paramecium caudatum*). Данной работе была посвящена серия статей под названием «Определение общей токсичности на инфузориях парамециях», опубликованных в журнале «Комбикорма» в №4 за 2001 г., №5 и №6 за 2005 г. Описанный в статьях экспресс-метод комплексной оценки токсичности комбикормов и сырья на

инфузориях парамециях актуален и сегодня, так как прост в исполнении и дает достоверные результаты по токсичности комбикормов, предна- значенных для объектов сельскохо- зяйственного выращивания.

Данный метод включает в себя тести- рование водных экстрактов и водных растворов ацетоновых экстрактов ис- следуемых проб. При разработке ме- тода на парамециях с тестированием водных растворов ацетоновых экстрак- тов кормовых продуктов за основу был взят метод определения токсичности на инфузориях стилонихиях по ГОСТ 13496.7-97, но отстоянная водопровод- ная вода была заменена стандартной средой Лозина-Лозинского. Парал- лельные исследования по определе- нию токсичности комбикормов, прове- денные с использованием отстоянной водопроводной воды средней жестко- сти (московская водопроводная вода) и среды Лозина-Лозинского, показали идентичность токсикорезистентности инфузорий. Для биотестирования применялись парамеции из культуры в фазе замедленного роста в возрасте от 2 до 6 недель, в течение которых токсикорезистентность инфузорий не изменилась. Практическим путем бы- ли подобраны индивидуальные дози- ровки водного раствора ацетонового экстракта кормового продукта таким образом, чтобы результаты на парамециях не отличались от результатов, полученных стандартным методом на

стилонихиях из суточной культуры. Время экспозиции, равное двум часам, оказалось характерным для динамики токсического действия подобранных концентраций для инфузорий парамеций на стадии замедленного роста. С увеличением времени экспозиции более двух часов гибель инфузорий не возрастила.

Для биотестирования водных экстрактов кормов использовались парамеции из культуры того же возраста, что и при тестировании ацетоновых экстрактов (их водных растворов). Необходимость применения водных экстрактов кормов была продикто- вана тем, что они тестировались в неразбавленном виде, а ацетоновые экстракты — при разбавлении водной средой минимум в 130 раз (для комбикормов: 0,3 мл ацетонового экстракта в 40 мл водной среды Лозина-Лозинского). В результате около 5% тестируемых образцов на водных экстрактах токсичность выявляли, а на ацетоновых нет. В качестве примера можно привести фальсификацию сы- рого протеина в комбикормах и сырье небелковым азотом в виде карбамида или сульфата аммония, токсичность которых выявляется только при био- тестировании водных экстрактов.

Метод комплексной оценки токсич- ности комбикормов и сырья позволяет выявлять токсичность в 95% случаев, при тестировании только ацетоновых экстрактов (их водных растворов) —

в 90%. Для крупных свинокомплексов и птицефабрик суммарная оценка токсичности довольно существенна, а для небольших хозяйств, вероятно, достаточно тестирования водных растворов ацетоновых экстрактов.

Инфузории парамеции удобны в работе, так как при их культивировании исчезает проблема сохранности культуры, которая актуальна для стилонихий. В резервной чашке Петри культура парамеций может сохраняться без пересадки в течение года. Метод комплексной оценки токсичности позволяет в течение месяца проводить биотестирование на культуре инфузорий парамеций в фазе замедленного роста без предварительной подготовки тест-организмов к анализу, то есть исключая ежедневное пересаживание инфузорий на свежую среду, как в методе на стилонихиях. При этом количества парамеций достаточно для того, чтобы ежедневно анализировать до 10 образцов кормов, исследуя как водные растворы ацетоновых экстрактов, так и водные экстракты исследуемых проб.

Методические особенности комплексной оценки токсичности комбикормов и сырья с использованием инфузорий парамеций.

Культивирование. Инфузории парамеции менее требовательны к условиям культивирования, чем другие виды инфузорий. Длительное время их можно легко культивировать в чашках Петри на стандартной среде Лозина-Лозинского без дополнительного введения органических питательных веществ в виде сенного настоя, пептона и др. Для выведения культуры инфузорий в фазу замедленного роста (когда они используются для биотестирования) их пересаживают из резервной чашки со старой культурой в чашку Петри, заполненную наполовину свежей средой Лозина-Лозинского, и добавляют корм — три зерна риса. Культивирование проводят с фотопериодизмом (смена дня и ночи) при постоянной температуре 24–26°C. Это можно делать или в прозрачном термобоксе, изготовленном из оргстекла, с помощью нагрева-

тельного элемента, термодатчика и терморегулятора, избегая попадания прямых солнечных лучей, или в термостате, но в этом случае в нем необходимо установить маломощную лампу дневного света с реле времени, регулирующим «день–ночь». В упрощенном варианте для создания оптимальной температуры можно использовать лампу накаливания, располагая ее на высоте по показанию термометра, находящегося рядом с чашками Петри с культурой инфузорий. На ночь для затемнения чашку Петри со всех сторон прикрывают картоном, не допуская перегрева культуры.

В фазу замедленного роста культуры переходит через две недели со дня пересадки. В этой фазе ее можно поддерживать в течение месяца, добавляя в чашку Петри по одному зерну риса один раз в неделю. Свыше полутора месяца со дня пересадки инфузории переходят в стационарную фазу. С этого времени их не используют для биотестирования и чашки Петри с культурой переводят в разряд резервных. В жизнеспособном состоянии культуру инфузорий в стационарной фазе можно поддерживать в термобоксе в течение года. Для этого необходимо раз в месяц, по мере испарения среды из чашки Петри, доливать среду Лозина-Лозинского, разбавленную дистиллированной водой в соотношении 1:5, и добавлять по одному зерну риса. Культивирование инфузорий и биотестирование проводят в химически чистом помещении при температуре не выше 28°C и отсутствии даже слабых запахов краски, табака, парфюмерии и других летучих химических соединений, которые могут проникать в чашку Петри с культурой (прикрытой стеклянной крышкой) и многократно накапливаться в водной среде.

Среда культивирования. В качестве среды культивирования используют стандартный раствор Лозина-Лозинского на дистиллированной воде, содержащий в 1 л: NaCl в количестве 0,1 г; KCl — 0,01 г; CaCl₂ — 0,01 г; MgCl₂ — 0,01 г; NaHCO₃ — 0,02 г. Среда Лозина-Лозинского является наибо-

лее простой по составу и в то же время достаточной для культивирования инфузорий. Дистиллированную воду отгоняют непосредственно в стерильные бутыли емкостью от 1 до 5 л с плотно закрывающимися пробками. В этих же бутылях готовят среду Лозина-Лозинского, добавляя по 1 мл «маточного», то есть концентрированного в 1000 раз раствора каждой соли на 1 л дистиллированной воды. Соли (CaCl₂ и MgCl₂) часто бывают в виде кристаллогидратов, в этом случае при приготовлении «маточного» раствора нужно произвести перерасчет на сухую соль (то есть увеличить концентрацию с учетом присутствия H₂O). Хранят приготовленную среду Лозина-Лозинского в закрытых бутылях в темном месте не более одного месяца. «Маточные» растворы хранят при тех же условиях не более шести месяцев.

Для кормления парамеций используют термически обработанные зерна риса. Применять следует только длиннозерный рис с начальным сроком хранения (расфасовки). Его промывают дистиллированной водой не менее трех раз, полностью высушивают на фильтровальной бумаге, прикрытой сверху также фильтровальной бумагой, и затем пастеризуют при температуре 80°C в течение двух часов. Готовый рис хранят в стерильной баночке с притертоей крышкой не более шести месяцев.

Подготовка проб к биотестированию. Исходную пробу кормового продукта, независимо от степени измельчения, измельчают на лабораторной мельнице в день проведения анализа.

Приготовление ацетонового экстракта кормового продукта и его водного раствора. Навеску пробы в количестве 10 г помещают в стеклянную посуду для экстракции, заливают 15 мл ацетона и экстрагируют при энергичном встряхивании в течение двух минут. Для полного извлечения токсинов экстракцию ацетоном лучше всего проводить в стеклянной посуде емкостью 100 мл. Для этого хорошо подходят баночки из-под детского питания на 100 г с крышкой. Если экстракционная смесь имеет кашицеобразную консистен-

цию (мука травяная, отруби, лузга и др.), то активная экстракция токсинов не будет происходить. В этом случае добавляют еще 5–10 мл ацетона с тем, чтобы продукт полностью находился в растворителе. После двухминутной экстракции ацетоновый экстракт отстаивают в течение 10 мин. Это время должно быть строго фиксированным, так как оно определяет содержание мелкодисперсной взвеси продукта в экстракте. Если прошло более 15 мин, экстракт необходимо несколько раз энергично встряхнуть и дать вновь отстояться в течение того же времени. Отстоявшийся экстракт осторожно отбирают стеклянным шприцем в количестве 0,3 мл, не взбалтывая осадок, для приготовления его водного раствора (таблица). Водный раствор ацетонового экстракта, независимо от вида кормового продукта, отфильтровывают через бумажный фильтр. Это избавляет раствор от крупнодисперсной жировой фракции (пленки) и стандартизирует размер мелкодисперсных частиц продукта. Бумажные фильтры хранят в герметично закрытом полиэтиленовом пакете.

Приготовление водного экстракта кормового продукта. Пробу в количестве 10 г помещают в стеклянную посуду для экстракции, приливают 50 мл среды культивирования и энергично встряхивают в течение 2 мин. После 10 мин отстаивания ее встряхивают еще 2 мин, а затем отстаивают 15–20 мин. Образовавшуюся надосадочную жидкость отбирают шприцем и переносят на бумажный фильтр. Если при отстаивании надосадочная

жидкость не образуется или для этого требуется много времени (для экспандированных и экструдированных кормов, жмыхов и др.), смесь центрифугируют 5 мин с частотой вращения 1000 об/мин, после чего полученную надосадочную жидкость фильтруют через фильтровальную бумагу. При фильтрации центрифугата избавляются от крупнодисперсной жировой фракции, в противном случае фильтрат и нефильтрованный центрифугат одной и той же пробы при тестировании могут дать различные результаты. После фильтрации пробы готовы к биотестированию. Она содержит водорастворимые фракции токсинов и мелкодисперсную взвесь — частицы размером около 5 мкм.

Испытание водного раствора ацетонового экстракта. Для биотестирования используют блок луночных микроаквариумов, схожий с тем, что указан в ГОСТ 31674-2012 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности» в пункте 4.1.2.1. Блок луночных микроаквариумов должен быть размером 15 x 8,5 x 1 (или 1,3) см. В пластине девять рядов по пять полированных или оплавленных стеклодувной горелкой лунок, расположенных поперек пластины. Каждый ряд предназначен для биотестирования одной пробы. Четыре лунки в ряду используют для биотестирования водного раствора ацетонового экстракта, а пятую (нижнюю) — для биотестирования водного экстракта исследуемой пробы.

Среду с инфузориями из чашки Петри вносят пипеткой (кончик необходимо

димо ополоснуть в баночке с чистой средой) во все испытуемые микроаквариумы по две капли, поэтапно. Сначала вносят по одной капле в каждую лунку по направлению вдоль блока луночных микроаквариумов (ряды с пробами расположены поперек) таким образом, чтобы последующая капля попадала в лунку следующей по порядку пробы. Это связано с тем, что инфузории, независимо от видовой принадлежности, образуют в чашках Петри обособленные клональные скопления, обладающие различной токсикорезистентностью. Эти скопления хорошо заметны в суточной культуре стилонихий. Парамеции в чашках Петри концентрируются под зернами риса и вокруг него. Для их отбора необходимо кончиком пипетки сдвинуть рис в сторону и равномерно забрать скопление инфузорий в пипетку. Заполнив все лунки, аналогично вносят вторую каплю. При дробном внесении инфузорий в микроаквариумы достигается равномерное распределение разночувствительных инфузорий в лунках каждой пробы. В каждой из четырех лунок пробы должно находиться около 10 инфузорий. После этого приготовленные ранее водные растворы ацетоновых экстрактов испытуемых проб еще раз перемешивают взбалтыванием и вносят опытной пипеткой в каждый микроаквариум по десять капель.

Подсчет инфузорий проводят через два часа экспозиции при легком постукивании пальцем по блоку микроаквариума. Сначала регистрируют только подвижных парамеций (выжившие), к ним прибавляют неподвижно лежащих на дне микроаквариума мертвых парамеций (погибшие парамеции за два часа не подвергаются полному лизису) — в сумме это численность посадки. Подсчет парамеций проводится значительно проще, чем стилонихий. Это связано с меньшей мутностью исследуемой пробы, так как дозировка ацетонового экстракта для парамеций ниже. После подсчета рассчитывают процент выживших инфузорий и определяют степень токсичности исследуемого продукта.

Приготовление водного раствора ацетонового экстракта в зависимости от содержания сырого протеина в пробе

Содержание сырого протеина в продукте, %	Количество среды Лозина-Лозинского, мл	Количество ацетонового экстракта, мл
25 и менее	40	0,3
26–35	50	0,3
36–45	60	0,3
46–55	70	0,3
56 и более	80	0,3
Комбикорм при хранении более двух недель со дня производства	40	0,1

Схемы определения токсичности на водных и ацетоновых экстрактах

Схема экспрессного определения токсичности комбикормов и сырья на ацетоновых экстрактах:

- 1) измельчить пробу в лабораторной мельнице в день проведения анализа;
- 2) навеску пробы в количестве 10 г поместить в баночку для экстракции;
- 3) внести 15 (20) мл ацетона пипеткой и плотно закрыть баночку крышкой;
- 4) встряхивать содержимое баночки в течение 2 мин;
- 5) отстаивать 10–15 мин, предварительно ослабив крышку баночки;
- 6) отобрать 0,3 мл ацетонового экстракта стеклянным шприцем и перенести в химический стакан (баночку) со средой Лозина-Лозинского, количество которого зависит от содержания сырого протеина в пробе (таблица);
- 7) перемешать пробу и отфильтровать через бумажный фильтр, полученный фильтрат готов к биотестированию;
- 8) отобрать инфузории из чашки Петри пипеткой (кончик ополоснуть в баночке с чистой средой) и поместить по одной капле в каждый микроаквариум;
- 9) проверить наличие инфузорий в каждом микроаквариуме и добавить еще по 1 капле с инфузориями (если инфузорий менее 8 шт.) или по 1 капле чистой среды (если инфузорий более 8 шт.) указанным выше способом;
- 10) внести в каждый микроаквариум соответствующего ряда по 10 капель подготовленной для тестирования пробы, записать время начала экспозиции;
- 11) провести подсчет инфузорий через два часа экспозиции, регистрируя выживших инфузорий и численность посадки (выжившие + погибшие инфузории, лежащие на дне микроаквариума);
- 12) определить выживаемость инфузорий в процентах и степень токсичности пробы.

Схема экспрессного определения токсичности комбикормов и сырья на водных экстрактах:

- 1) измельчить пробу в лабораторной мельнице в день проведения анализа;
- 2) навеску пробы в количестве 10 г поместить в баночку для экстракции;
- 3) внести 50 мл среды Лозина-Лозинского и плотно закрыть баночку крышкой;
- 4) встряхивать содержимое баночки в течение 2 мин;
- 5) отстаивать 10–15 мин;
- 6) встряхивать второй раз в течение 2 мин;
- 7) отстаивать 15–20 мин, предварительно ослабив крышку баночки; если надосадочная жидкость не образуется, разлить в две центрифужные пробирки и центрифугировать в течение 5 мин;
- 8) образовавшуюся надосадочную жидкость отобрать шприцем и поместить в бумажный фильтр быстрой фильтрации: центрифугат также необходимо отфильтровать через бумажный фильтр; полученный фильтрат готов к биотестированию;
- 9) отобрать инфузории из чашки Петри пипеткой (кончик ополоснуть в баночке с чистой средой) и поместить по 1 капле в каждый микроаквариум нижнего ряда блока микроаквариумов по количеству тестируемых проб; повторить данную операцию еще четыре раза для того, чтобы общее количество капель с инфузориями в каждом микроаквариуме было равно 5;
- 10) просмотреть под микроскопом все заполненные микроаквариумы; при наличии хлопьев корма удалить их пипеткой, заполнив отобранный часть чистой средой также пипеткой;
- 11) внести в каждый микроаквариум по 5 капель подготовленной для тестирования пробы в соответствии с номером по порядку, указанном в бланке проведения анализа; записать время начала экспозиции в бланк;
- 12) определить время гибели инфузорий и степень токсичности, просматривая микроаквариумы под микроскопом через 30 мин, 1 ч, 2 и 3 ч с начала экспозиции.

Тест-критерий токсичности кормового продукта. Проба нетоксична для птицы и свиней при 81–100%-ной выживаемости парамеций; для поросят, свиноматок и цыплят — при 91–100%-ной. Проба слаботоксична для птицы и свиней при 51–80%-ной выживаемости инфузорий; для поросят, свиноматок и цыплят — при 51–90%-ной. Проба токсична, если выжило 0–50% инфузорий.

Испытание водного экстракта кормового продукта проводят в пятом (последнем в ряду) микроаквариуме. В него вносят пипеткой из чашки Петри пять капель среды с парамециями (кончик необходимо ополоснуть в баночке с чистой средой), а затем пять капель подготовленной для тестирования пробы. При исследовании нескольких проб инфузорий вносят сначала по одной капле в лунки всех испытуемых проб и так продолжают, пока не внесут все пять капель в каждую лунку (пробу). При тестировании повторности необязательны, так как анализ качественный.

Оценка токсичности. Токсичность пробы оценивают по времени, за которое происходит гибель инфузорий. Проба остро токсична — гибель в течение 30 мин; токсична — от 31 до 60 мин; слаботоксична — от 1 ч до 3 ч; нетоксична — инфузории за 3 ч не погибли. В случае гибели инфузории становятся неподвижными, оседают на дно микроаквариума и при постукивании пальцем по блоку их движение не наблюдается (см. схемы определения токсичности).

Использование экспресс-метода при комплексном определении токсичности комбикормов ограничено двумя случаями: тестированием ацетонового экстракта стартерных (престартерных) комбикормов для поросят и телят, содержащих ароматизаторы, и тестированием водных экстрактов комбикормов для свиней, содержащих подкислители (органические кислоты), — в одном и в другом случае метод дает псевдотоксический эффект. О том, как устранить этот недостаток, будет изложено в следующем номере. ■