ЭКСПРЕСС-МЕТОДУ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕЙ ТОКСИЧНОСТИ — 30 ЛЕТ

А. ГРОЗДОВ, канд. биол. наук, ООО «АВИСАР»

В 1991 г., то есть 30 лет назад, экспресс-метод определения общей токсичности впервые 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.

Сущность экспресс-метода заключалась в извлечении токсических веществ ацетоном из рыбной муки и дальнейшем воздействии водного раствора ацетонового экстракта и присутствующих в нем мелкодисперсных частиц продукта на инфузорий стилонихий. Схема экспресс-ного 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.

Для разработки экспресс-метода были использованы образцы рыбной муки, отобранной от различных партий со сроком хранения не более месяца со дня выработки. Мука 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 было в пределах 12—15 мг КОН /1 г жира. Параллельно определялась выживаемость инфузорий 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, было 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 их выживаемость снижалась, полная гибель (выживаемость 0%) 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 Минсельхоза 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 мукой, изготовленной из «задержанного» (слегка протухшего) сырья различной степени испорченности. Такая работа была продиктована тем, что директора заводов рыбных гранулированных кормов (таких заводов в системе Минрыбхоза СССР было четыре) часто предъявляли претензии к качеству рыбной муки, изготовленной 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, поступающее на переработку в рыбную муку, часто имело слабый душок. При работе с рыбной мукой, изготовленной из «задержанного» сырья, было выявлено, что мука с незначительным сроком хранения и кислотным числом жира не многим 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 исследовалась рыбная мука, имевшая незначительное количество мелких плесневелых частиц, — такая мука всегда была токсичной. Проблема плесневения рыбной муки иногда возникает при нарушении технологии ее изготовления на плавбазах, когда она затаривается 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 спороношения. 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 была 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 бóльшим 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 ГОСТ 29136-91 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 создании ГОСТ 13496.7-92 «Зерно фуражное, продукты его переработки, комбикорма. Методы определения токсичности», в который впервые вошел экспресс-метод на инфузориях стилонихиях, будет сообщено в следующем номере. ■

реклама