

ПРОДОЛЖЕНИЕ ПУТИ ЭКСПРЕСС-МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОКСИЧНОСТИ НА ИНФУЗОРИЯХ ПАРАМЕЦИЯХ

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

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 возрастила, в результате чего токсичность кормов не выявлялась. Все недостатки экспресс-метода на инфузориях стилонихиях были устранены в следующей 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 статье 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, предназначенных для объектов сельскохозяйственного выращивания.

Данный метод включает в себя тестирование водных экстрактов и водных растворов ацетоновых экстрактов исследуемых проб. При разработке метода на парамециях с тестированием водных растворов ацетоновых экстрактов кормовых продуктов за основу был взят метод определения токсичности на инфузориях стилонихиях по ГОСТ 13496.7-97, но отстоянная водопроводная вода была заменена стандартной средой Лозина-Лозинского. Параллельные исследования по определению токсичности комбикормов, проведенные с использованием отстоянной водопроводной воды средней жесткости (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 изменялась. Практическим путем были подобраны индивидуальные дозировки 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 продиктована 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 сырого протеина в комбикормах и сырье небелковым азотом в виде карбамида или сульфата аммония, токсичность которых выявляется только при биотестировании водных экстрактов.

Метод комплексной оценки токсичности 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 куль-

тура 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.

Остановимся на методических особенностях 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 фотoperiodизмом (смена дня и ночи) при постоянной температуре 24–26°C. Это можно делать или в прозрачном термобоксе, изготовленном из оргстекла, с помощью нагревательного 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 чашки Петри ее со всех сторон прикрывают картоном, не допуская перегрева культуры.

В фазу замедленного роста культура 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), много-кратно накапливаться в водной среде и создавать тем самым опасность для культивирования инфузорий.

Среда культивирования. В качестве среды культивирования используют стандартный раствор Лозина-Лозинского на дистиллированной воде, содержащей 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 наиболее простой по составу и в то же время достаточной для культивирования инфузорий. Можно использовать дистиллированную воду, получаемую в дистилляторах, изготовленных из нержавеющей стали или стекла.

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.

Корм. Для 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 притертой 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 консистенцию (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 об разуется 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 готова к биотестированию. Она содержит водорастворимые фракции ток-

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

синов 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 × 8,5 × 1 (или 1,3) см. В пластиине 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 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 клonalные 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 (это 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.

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 до 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) — и в одном и в другом случае метод дает псевдотоксический эффект. О том, как устранить этот недостаток, будет изложено в следующей статье при анализе ГОСТ 31674-2012 «Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности» с Изменением №1 (введен в действие на территории РФ 01.07.2017).

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 надсадочная жидкость не образуется, разлить в две центрифужные пробирки и центрифугировать в течение 5 мин;
- 8) образовавшуюся надсадочную 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. ■