

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт
ветеринарной санитарии, гигиены и экологии

УТВЕРЖДАЮ

Академик-секретарь Отделения
ветеринарной медицины РАСХН
академик РАСХН

_____ А.М.Смирнов

« ____ » _____ 2009 г.

**АВТОМАТИЗИРОВАННЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ ПРО-
ДУКТОВ ЖИВОТНОВОДСТВА, КОРМОВ И ОБЪЕКТОВ
ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ИНФУЗОРИЯХ PARAMESCIUM
CAUDATUM И TETRAHYMENA PYRIFORMIS**

(методические рекомендации)

Москва - 2009

Методические рекомендации разработаны д.в.н., проф. Долговым В.А., д.б.н. Лавиной С.А., к.б.н. Арно Т.С., к.б.н. Семеновой Е.А., к.б.н. Островской А.В., Самохиным И.В. (ГНУ ВНИИВСГЭ), к.т.н. доц., Черемных Е.Г., к.х.н., доц. Симбиревой Е.И., Кулёшиным А. В. (МГУПБ).

Методические рекомендации предназначены для научно-исследовательских учреждений и лабораторий, занимающихся вопросами оценки качества и безопасности продуктов животноводства, кормов и других объектов ветеринарно-санитарного и экологического контроля.

Методические рекомендации одобрены на совместном заседании секции «Ветеринарно-санитарная экспертиза» Отделения ветеринарной медицины РАСХН и Ученого совета ГНУ ВНИИВСГЭ «22» сентября 2009 г., протокол № 3

Рецензент – профессор Дорожкин В.И.

Ответственный за выпуск – заведующая сектором Отделения ветеринарной медицины РАСХН, кандидат биологических наук Бабышова Л.В.

СОДЕРЖАНИЕ

1. Общие положения	4
2. Аппаратура, материалы, реактивы	5
3. Культивирование инфузорий	6
4. Подготовка проб.....	7
5. Проведение анализа	9

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Методические рекомендации предназначены для ускоренной оценки токсичности:

- продуктов животного происхождения:
 - мясо и мясопродукты,
 - молоко и молокопродукты,
 - яйца,
 - рыба и рыбопродукты;
- кормов:
 - зерно фуражное и продукты его переработки,
 - комбикорма,
 - мясокостная и рыбная мука,
 - жмыхи, шроты,
 - дрожжи кормовые,
 - различные кормовые добавки и др.;
- объектов окружающей среды:
 - вода,
 - почва,
 - полимерные и строительные материалы,
 - воздух,
 - органические отходы сельскохозяйственных предприятий.

Оценка токсичности указанных объектов осуществляется с помощью метода, состоящего из одного, двух и трех последовательных этапов:

- на первом этапе оценивают выживаемость в течение 2-х часов инфузорий *Paramecium caudatum* в водных экстрактах и водных растворах ацетоновых экстрактов исследуемых объектов, по результатам первого этапа оценивают токсичность исследуемого объекта или принимают решение о продолжении исследования на втором этапе;

- на втором этапе продолжают экспозицию инфузорий *Tetrahymena pyriformis* в пробах исследуемых объектов в течение 72 часов (при отсутствии выраженного загрязнения среды посторонней микрофлорой), по результатам всех трех этапов оценивают токсичность исследуемых объектов или принимают решение о продолжении исследования иными методами.

Принцип уточняющей оценки с увеличением времени экспозиции является надежной основой для выявления низких концентраций токсикантов, а использование максимально стандартизованной культуры инфузорий *Tetrahymena pyriformis* позволяет получать удовлетворяющие требованиям достоверности и сопоставимости результаты. На всех трех этапах результаты вычисляются на основе подсчета живых клеток простейших с помощью прибора для биологических исследований БиоЛаТ-3. Вывод о степени токсичности исследуемого объекта производится автоматически в соответствии с полученными результатами по критериям, представленным в разделе 5.

2. АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ

Прибор БиоЛаТ-3 (далее прибор), компьютер с программой AutoCiliataXP (далее программа).

Тест-организмы – инфузории *Paramecium caudatum*, концентрация которых не менее 500 ± 100 клеток/мл в чашке Петри, и *Tetrahymena pyriformis*, концентрация которых не менее 50000 ± 1000 клеток/мл в пробирке.

Микроскоп МБС-10, весы лабораторные с погрешностью взвешивания не более 0,1г, дистиллятор, шкаф сушильный электрический лабораторный, мельница лабораторная электрическая, аппарат для встряхивания (шуттель-аппарат), центрифуга лабораторная, гомогенизатор, спиртовка стеклянная лабораторная по ГОСТ 25336, петля бактериологическая, пробирки стеклянные бактериологические по ГОСТ 25336, вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556, вода дистиллированная по ГОСТ 6709, колбы стеклянные лабораторные по ГОСТ 25336, чашки Петри D100мм по ГОСТ 25336-82, шприцы медицинские одноразовые 2см³.

Ацетон по ГОСТ 2603-79, натрий хлористый по ГОСТ 4233, магний сернокислый 7-ми водный по ГОСТ 4523-77, натрий углекислый кислый по ГОСТ 4201-79, кальций хлористый 2-х водный по ГОСТ 4261-78, калий хлористый по ГОСТ 4234-77, натрий фосфорнокислый однозамещенный, дрожжи сухие по ГОСТ 28483-90, пептон сухой для бактериологических целей по ГОСТ 13805, экстракт дрожжевой по ТУ 6-09-3462-73, глюкоза кристаллическая гидратная по ГОСТ 975. Все реактивы должны быть х.ч. или о.с.ч.

3. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ИНФУЗОРИЙ

Культивирование инфузорий *Paramecium caudatum*

Культивирование инфузорий *Paramecium caudatum* осуществляется в чашках Петри со специальным устройством для внесения корма, представляющим собой пластиковую чашку диаметром 30 мм с отверстиями по периметру боковой поверхности.

Средой для культивирования служит модифицированная среда Лозина-Лозинского, которую готовят следующим образом:

а) готовят концентрированные растворы 5 солей, каждую соль отдельно растворяют в 100 мл бидистиллированной воды: NaCl – 10г, MgSO₄ – 2г, CaCl₂, NaHCO₃ – 1г, KCl – 1г; эти растворы хранят в колбах объемом 100 см³ с пришлифованными пробками;

б) собственно среду для культивирования готовят в колбе объемом 2000 см³, в которую вносят 2000 мл бидистиллированной воды и по 2 мл каждого концентрированного раствора 6 солей;

в) кипятят приготовленную среду в течение 5 минут.

Корм для *Paramecium caudatum* - сухие дрожжи, вносят в середину чашки Петри.

Дрожжи добавлять по мере их использования инфузориями.

Через сутки после начала культивирования и в течение последующих 7 суток инфузории *Paramecium caudatum* могут быть использованы для биотестирования.

Через 7 суток в чистую чашку Петри вносят инфузорий из старой чашки и добавляют свежую среду. Объем среды – около 50мл.

Вся стеклянная посуда должна быть высушена в сушильном шкафу при температуре 200°C.

Культивирование инфузорий *Tetrahymena pyriformis*

Культивирование инфузорий *Tetrahymena pyriformis* осуществляют на искусственной среде (рабочей), состоящей из 0,5 г пептона, 0,5 г глюкозы, 0,1 г дрожжевого экстракта, 0,1 г NaCl. Эти вещества разводят в 100 мл дистиллированной воды, разливают в пробирки по 3-5 мл, закрывают ватно-марлевыми или силиконовыми пробками с каналом и автоклавируют при 0,5 атм в течение 1 часа.

Петлей над горелкой засевают пробирки из культивационной пробирки с инфузориями. Через 3 суток и далее до 7 суток из вновь засеянных культивационных пробирок инфузории могут использоваться в опыте.

При случайном заражении культуры посторонней микрофлорой необходимо пересеять ее на вышеуказанную среду с добавлением антибиотика амоксициклина – 0,01 г на 100 мл среды. После нескольких пересеваний на

среду, содержащую антибиотик при условии отсутствия бактериальной зараженности пересеять культуру на рабочую среду.

4. ПОДГОТОВКА ПРОБ

4.1. Подготовка проб мяса, мясопродуктов, рыб, рыбопродуктов (водные экстракты)

Мясо и мясопродукты растирают в ступке или гомогенизируют в дистиллированной воде в соотношении 1:10. Встряхивают на аппарате для встряхивания жидкостей в течение 20 минут, центрифугируют 15 минут при 3000 об/мин или фильтруют.

4.2. Подготовка проб яиц (водный экстракт)

Содержимое яйца гомогенизируют и разводят дистиллированной водой в соотношении 1:10.

4.3. Подготовка проб молока, творожной и подсырной сыворотки (водные экстракты)

Подготовка проб молока, творожной и подсырной сывороток состоит в разведении исследуемых образцов в 4 раза дистиллированной водой.

4.4. Подготовка проб сухого молока, сухой творожной и подсырной сывороток (водные экстракты)

Подготовка проб сухого молока, сухой творожной и подсырной сывороток состоит в разведении их дистиллированной водой в соотношении 1:40.

4.5. Подготовка проб комбикормов и сухого сырья для их изготовления (водные и ацетоновые экстракты)

4.5.1. Подготовка водных экстрактов

Последовательность действий при подготовке проб, представляющих собой водные экстракты исследуемых объектов, следующая:

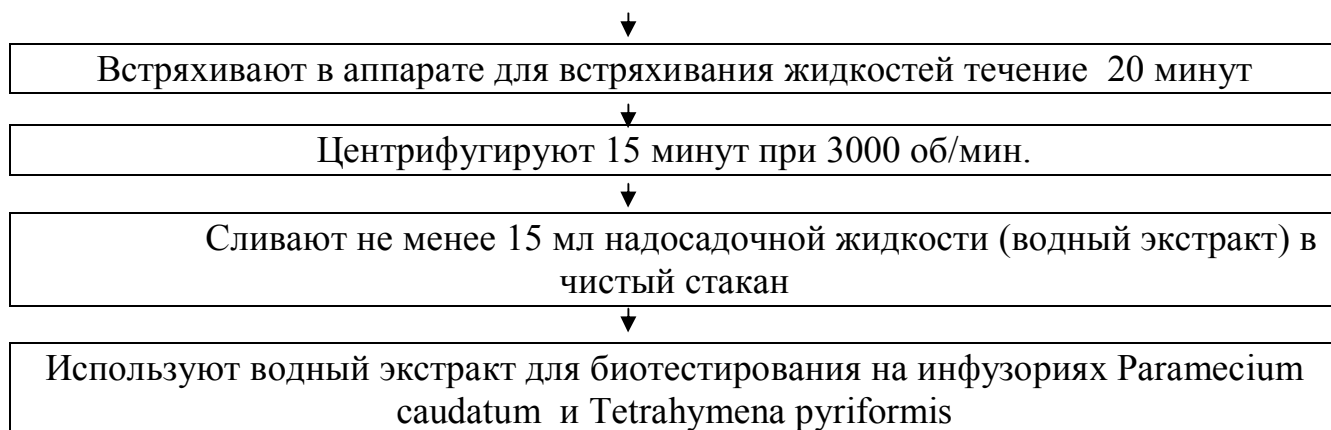
Измельчают исследуемый продукт в лабораторной мельнице (сухие продукты) или гомогенизаторе (влагосодержащие продукты)



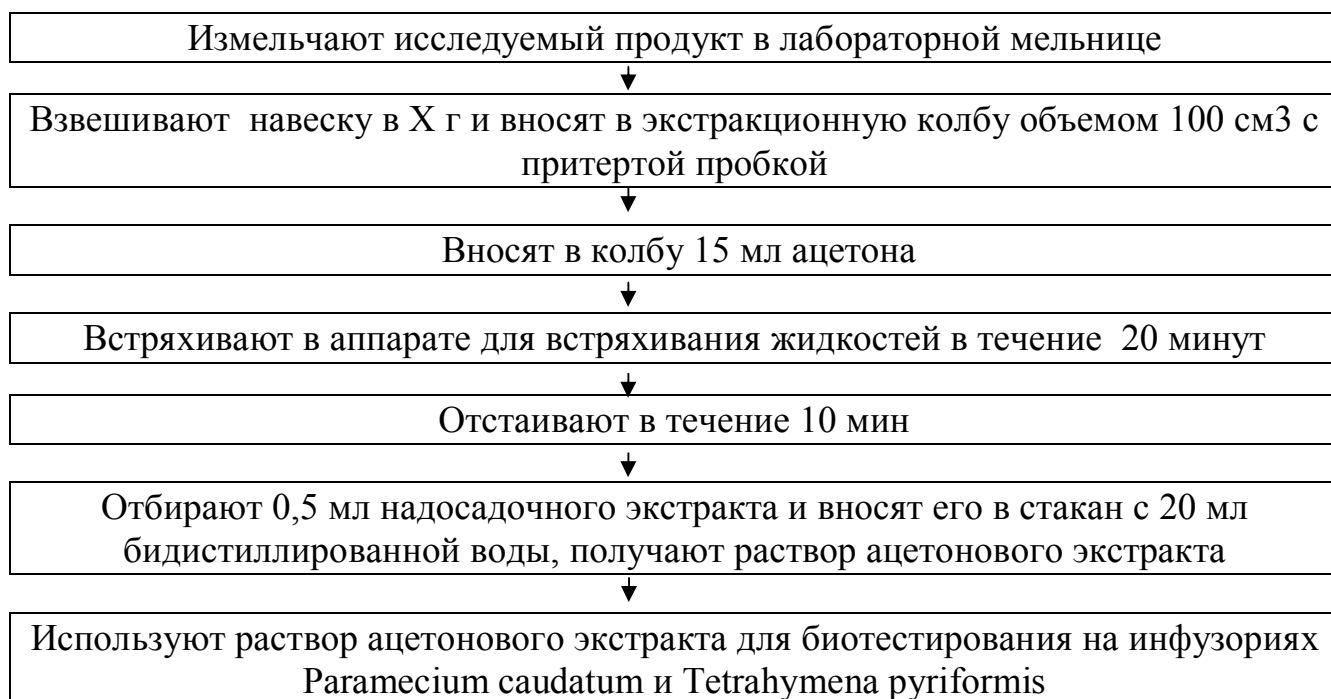
Взвешивают X г измельченного продукта и вносят в экстракционную колбу объемом 250 см³ с притертой пробкой



Вносят в колбу 100 мл дистиллированной воды



4.5.2. Подготовка растворов ацетоновых экстрактов



Навески продукта X при подготовке проб следующие:

- готовый комбикорм X=10г
- зерно и продукты его переработки X=10г,
- все сырье для изготовления комбикормов необходимо экстрагировать в смеси с заведомо нетоксичным зерном (пшеница, ячмень и др.) в концентрациях, соответствующих нормам введения в корма.

4.6. Подготовка проб объектов окружающей среды (водные экстракты)

Вода для исследования берется в исходном виде. При подготовке образца почвы её экстрагируют в дистиллированной воде в соотношении 1:10 в течение 20 минут на встряхивателе, затем фильтруют или подвергают центрифугированию.

4.7. Подготовка проб полимерных и строительных материалов (водные экстракты)

Полимерные и строительные материалы измельчают, заливают дистиллированной водой в соотношении 1:1 – 1:5 (в зависимости от вида исследуемой пробы), экстрагируют в течение 20 минут на встряхивателе, затем фильтруют или центрифугируют.

5. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Для водных и ацетоновых экстрактов, кормов (п. 4.5), водных экстрактов объектов окружающей среды (п. 4.6), полимерных и строительных материалов (п. 4.7) биотестирование начинают с первого этапа на инфузориях *Paramecium caudatum*, для проб продуктов (п.п. 4.1-4.4) – со второго этапа на инфузориях *Tetrahymena pyriformis*.

5.1. Первый этап биотестирования на инфузориях *Paramecium caudatum*

В соответствии с техническим описанием включают прибор и режим «Краткосрочное исследование – *Paramecium* - Начало». Затем задают параметры исследования, состоящие в назначении лунок пробам и названий проб, времени экспозиции и других условий опыта. Все действия оператора в каждом режиме исследования подробно описаны в техническом описании.

Проведение первого этапа начинается с внесения дозаторной пипеткой по 0,3 мл среды с инфузориями *Paramecium caudatum* и по 0,3 мл проб в лунки внутреннего круга планшета. Этот этап проводят для проб, подготовленных в виде водного экстракта и раствора ацетонового экстракта (п. 4.5), или только водного экстракта (п.п. 4.6, 4.7).

Водный экстракт и раствор ацетонового экстракта одного исследуемого объекта обозначают отдельными номерами. Например: «Проба 1» - водный экстракт продукта; «Проба 2» - раствор ацетонового экстракта этого же продукта.

После задания параметров проб и назначения лунок включают процесс подсчета в заданных лунках. Далее вносят пробы и через 2 часа повторяют подсчет, включая «Краткосрочное исследование – *Paramecium* - Окончание».

Оценка токсичности по первому этапу биотестирования производится автоматически на основании критериев, указанных в таблице 1. Расчет коэффициента K_1 производится также автоматически по формуле:

$$K_1 = N_1/N_2,$$

где N_1 – количество живых инфузорий после экспозиции в пробе,
 N_2 - количество живых инфузорий до начала этапа опыта.

Таблица 1

Критерии оценки первого этапа

Коэффициент выживаемости <i>Paramecium caudatum</i> , K_1		Оценка
Водный экстракт	Ацетоновый экстракт	
$\geq 0,9$	$\geq 0,9$	Нетоксичная проба
$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	Токсичная проба
Все остальные варианты значений коэффициента выживаемости учитываются при вычислении комплексной оценки после второго этапа		

Таким образом, в результате первого этапа исследования токсичности объектов получают 2 возможные оценки: токсичный и нетоксичный объект, или уточняют оценку на втором и/или третьем этапе.

5.2. Второй этап биотестирования на инфузориях *Tetrahymena pyriformis*

Второй этап начинается аналогично первому при задании режима «Краткосрочное исследование – *Tetrahymena* – Начало». В заданные лунки внешнего круга планшета прибора вносят 10мкл культуры инфузорий *Tetrahymena pyriformis* и 150мкл дистиллированной воды. Одновременно оценивают количество клеток до и затем вносят пробы.

Включают исследование, начало которого состоит в подсчете внесенных клеток и фиксации времени старта опыта 2 этапа. Планшет закрывают крышкой для предотвращения высыхания проб и выключают прибор.

Через 24 часа включают прибор и режим «Краткосрочное исследование – *Tetrahymena* – Окончание». После автоматического подсчета количества живых клеток программа выдает заключение о степени токсичности и ждет решения оператора. Заключение производится на основе критериев, указанных в таблице 2, вычисленных по формулам:

$$K_2 = (N_2/N_1)/K_{\text{контр}}, \quad (1)$$

$$K_{\text{контр}} = N_{1\text{контр}}/N_{2\text{контр}} \quad (2)$$

где N_1 , $N_{1\text{контр}}$ – количество инфузорий до начала экспозиции в пробе и контроле,

N_2 , $N_{2\text{контр}}$ - количество живых инфузорий по окончании второго или третьего этапа опыта.

Таблица 2

Критерии второго этапа

Коэффициент прироста инфузорий <i>Tetrahymena pyriformis</i> за 24 часа экспозиции (второй этап исследования), K_2		Оценка степени токсичности или решение о продолжении исследования
$\geq 0,9$	$\geq 0,9$	Объект нетоксичен
$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	Объект токсичен

Таким образом, в результате второго этапа исследования токсичности объектов получают 2 возможные оценки: токсичный и нетоксичный объект, или уточняют оценку иными методами токсикологической оценки.