

МЕТОДИ І МЕТОДИКИ

УДК 59.08

ТОКСИКО-БІОЛОГІЧНА ОЦІНКА РИБИ ТА ГІДРОБІОНТІВ ЗА ДОПОМОГОЮ ТЕСТ-ОБ'ЄКТІВ

Оліфіренко В.В. – к. вет. н., доцент

Козичар М.В. – к. с.-г. н., доцент

ДВНЗ «Херсонський державний аграрний університет»

kaf.chemistry@ukr.net

Використання інфузорії Тетрахітена піріформіс для токсико-біологічної оцінки риби та інших гідробіонтів зумовлене тим, що в більшості випадків цей тест-організм реагує на вплив хімічних і біологічних факторів адекватно вищим тваринам. Використання лабораторних тварин у ряді випадків не представляється можливим із міркувань економіки, трудомісткості, тривалості та безпеки досліджень. Застосування Тетрахітени піріформіс дозволяє швидко отримати достовірну інформацію про токсичність риб і інших гідробіонтів, токсичність води водойм різного призначення. Метод має ряд переваг і є перспективним напрямком, особливо в умовах сільськогосподарського виробництва.

Ключові слова: тест-організм, токсико-біологічна оцінка, якість риби, інфузорія, мікробіологія.

Постановка проблеми. Якість риби та інших водних організмів характеризується їх хімічним складом, фізичними та органолептичними властивостями, а також, що є найбільш важливим, біологічною цінністю.

На практиці для визначення якості гідробіонтів застосовують непрямі методи, хімічні, фізичні та інші, які не дають результати, що повністю співпадають із показниками біологічної оцінки, що проводиться безпосередньо на живому організмі.

Використання інфузорій Тетрахітена піріформіс для токсико-біологічної оцінки зумовлене тим, що в більшості випадків цей тест-організм реагує на вплив хімічних та біологічних факторів адекватно вищим тваринам. Використання вищих тварин для токсико-біологічної оцінки є складним і тривалим у часі, тоді як застосування інфузорії дозволяє швидко отримати достовірну інформацію.

Аналіз досліджень та публікацій. Відомо, що застосування тест-організму Тетрахітена піріформіс має низку переваг перед аналогічними методами з використанням вищих тварин. Під час використання методу на піддослідну тварину діє виключно той продукт, який вона спожила, а на Тетрахітену додатково діє продукт, який розчинився у воді. Тетрахітена має більш інтенсивний обмін речовин та скоріше реагує на токсичні компоненти.

Постановка завдання. Під час використання тест-організму можлива одночасна постановка великої кількості варіантів експерименту або дослідження. Метод простий, має низьку собівартість та компактний, його можна застосовувати у випадках, коли відсутні умови для проведення експерименту на вищих тваринах. Метод апробований та вдосконалений у лабораторії екологічної токсикології Китайсько-Українського науково-дослідного інституту науки про життя та гідрохімічній лабораторії ХДАУ. Його використання дає можливість протягом 24 годин зробити попередній висновок про наявність у воді або організмі гідробіонтів токсинів як антропогенного, так і природного походження. Вид та кількість визначених токсичних речовин уточнюються у подальших дослідженнях за існуючими методиками.

Матеріали і методи дослідження. Метод дозволяє також протягом 3 діб визначити біологічну цінність риби і інших гідробіонтів, що в 7 разів швидше, ніж в експериментах на вищих тваринах (крисах, котках, морських свинках та інші). Вартість таких досліджень більш як у 10 разів нижча за вартість аналогічних досліджень, проведених на вищих тваринах.

Таким чином, використання в'ійчастої інфузорії Тетрахітена піріформіс для токсико-біологічних досліджень є перспективним напрямом, особливо в рибництві та сучасній санітарії, гігієні екології та ветеринарно-санітарній експертизі, коли доводиться швидко вирішувати питання якості продукції та шляхи її реалізації. При цьому не применшується значення класичних та стандартних методів досліджень.

Для санітарно-біологічної оцінки гідробіонтів був використаний тест-організм інфузорія Тетрахітена піріформіс, вилучений із природних водойм.

Метод не потребує вартісних реактивів та обладнання, він дозволяє дати ветеринарно-санітарну та біологічну оцінку риби та інших гідробіонтів у тих випадках, коли їх неможливо отримати на вищих тваринах. Тривалість досліджень складає 24–72 год. Метод застосований на висівання культури Тетрахітена піріформіс у флакони з піддослідними пробами м'яса риб та інших водних організмів.

Середовищем розчинення слугує 0,56%-вий розчин морської солі. Оцінку якості риби, інших гідробіонтів, а також продуктів із них проводять за вирощеною культурою інфузорій.

Кількість найпростіших підраховують під малим збільшенням мікроскопу в камері Фукс-Розенталя або Горяєва. Якість інфузорій визначали за характером руху, наявністю змінених форм та мертвих клітин у культурі.

Маточну культуру інфузорії вирощували на стандартному середовищі: пептону бактеріологічного – 2 гр., глюкози – 0,5 гр., дріжджі пекарські – 0,1 гр., морської солі – 0,1 гр. на 100 мл дистильованої води. Після стерилізації до середовища вносили культуру інфузорії в кількості 0,1 мл на 50 мл середовища та вирощували її в термостаті при температурі +25°C. Пересів у свіже середовище здійснювали через 7 діб.

Культуру інфузорії можна зберігати при кімнатній температурі до 2 місяців шляхом консервування у 1% розчині глюкози. На 10 мл глюкози додавали 0,4 мл культури. При температурі 0 - +4 °C культура зберігається до 4 місяців без пересіву.

У 0,56% розчині морської солі і інфузорії не розмножуються, але зберігають життєздатність до 30-45 діб при кімнатній температурі. Проби для дослідження потребують підготовки. Для цього 100-200 гр. гідробіонтів, відібраних у якості середньої проби, 3-4 рази пропускали через м'ясорубку і в подальшому гомогенізували. Після гомогенізації 10 гр. гідробіонтів ретельно розтирали у фарфоровій ступці. Підготовку проб інших гідробіонтів здійснювали аналогічним чином.

Підготовлені проби можуть зберігатись у холодильнику при температурі -12-15°C до двох місяців. Такі проби використовують для повторних досліджень.

Контроль росту інфузорій здійснювали щоденно. Попередньо продивлялись проби безпосередньо в пробірках або флаконах під мікроскопом МБС.

Кількісний облік здійснювали в підрахунковій камері Фукс-Розенталя. Чистоту культури, густину росту, форму, рухливість та наявність мертвих інфузорій визначали під збільшенням мікроскопу (7×8) на предметному склі.

Результати досліджень. Токсикологічному дослідженню піддавали рибу та гідробіонтів, що підозрюються в отруєнні або виловлені із забруднених водойм. Дослідженню піддавали також гідробіонти, які, ймовірно, містять токсини.

Із підготовленої риби брали наважку 100 мг, вносили її у флакони по 50 мл, а потім добавляли у флакони по 2 мг 0,56%-го розчину морської солі. До проби добавляли одну краплину (0,04 мл) маточної культури інфузорії. Кожен зразок готували у трьох повтореннях. Контролем слугував 0,56%- розчин морської солі, у флакони деяких додався сухий яечний порошок, або порошок, виготовлений із сухого яйця.

Флакони обережно перемішували та ставили на інкубацію в термостат при температурі +18 - +25°C на 24 години. Флакони 3-4 рази на добу струмували для аерації та перемішування. Через 6,12,24 години вміст флаконів продивлялись під мікроскопом.

Токсичність піддослідних зразків визначали за наявністю загиблих інфузорій, пригніченням росту і розвитку, змінами форм, характером руху.

Наявність мертвих або деформованих клітин, пригнічення, уповільнення або зміна характеру руху, пригнічення росту і розмноження інфузорій у порівнянні з контролем свідчили про токсичність піддослідного матеріалу. Відсутність загибелі інфузорій або інших змін Тетрахітени за 24 години інкубації свідчить про відсутність токсичності м'яса риби та інших гідробіонтів. Одночасно проводили дослідження токсичності води з водойми, звідки були виловлені гідробіонти.

Для визначення токсичності води відбирали середню пробу води з водойми. Кількість середньої проби – 2-3 літри. Для дослідження брали 20 флаконів, у кожен з яких добавляли 2 мл досліджуваної води, потім до досліджуваних зразків добавляли по одній краплині культури інфузорій. Контролем слугували зразки, що містять 0,56-% розчин морської солі на дистильованій воді, та флакони, що містили воду з акваріуму.

Проби ретельно перемішували та ставили в термостат при температурі +18 – +25°C. Протягом доби флакони періодично перемішували. Через добу проводили оцінку результатів за зазначеною вище методикою.

На недоброякісність досліджували рибу на інших гідробіонтів, які могли мати токсигенні властивості. До таких відносили снулих гідробіонтів та рибу травмовану, хвору, після тривалого зберігання, а також у тих випадках, коли виникали сумніви щодо її доброякісності під час ветеринарно-санітарного огляду. Виникає необхідність також у випадках, коли риба або інші гідробіонти можуть містити в їстівній частині отрути мікробного походження. Для визначення доброякісності риби та інших гідробіонтів за допомогою тест-об'єкту досліджування проводили одночасно з прогріванням проб при температурі +80 - +120°C протягом 30-40 хвилин. Паралельно (одночасно) досліджували непрогріті проби.

Зразки м'яса риб та інших гідробіонтів підігрівали окремо або в середовищі розбавлення, охолоджували до температури +18 – +20°C та вносили культуру інфузорій із подальшим урахуванням результатів, як за методикою визначення токсичності риби.

Контролем слугували флакони, що містили 0,56-% розчин морської солі, флакони, що містили яечний порошок та флакони, що містили проби свіжого доброякісного м'яса аналогічного виду гідробіонтів. У разі, коли непрогріті проби викликали загибель та інші патологічні зміни інфузорій, проводили додаткові дослідження з використанням існуючих бактеріологічних методів дослідження з метою визначення видової належності мікроорганізмів.

Біологічну цінність риби визначали за інтенсивністю розмноження інфузорій на живильному середовищі, що містить в якості джерела білку та інших стимуляторів росту продукт, що досліджується. Критерієм біологічної цінності риби слугувала кількість клітин інфузорій, що вносили за три доби, по відношенню до кількості клітин, що вносили на контрольному стандартному кормі, висвітлене у відсотках. Усі роботи, пов'язані з підготовкою проб, живильних середовищ, вирощуванням інфузорій та ін., проводили згідно з вимогами до бактеріологічних досліджень.

Оцінку результатів досліджування проводили через три доби. Флакони з пліснявою або іншою мікрофлорою відбраковували. У кожний флакон вносили по краплині 5%-го спиртового розчину йоду, після чого проводили підрахунок.

Підрахунок здійснювали в 10 квадратах камери Фукса-Розенталя. Біологічну цінність риби визначали співвідношенням кількості клітин, що виростили на піддослідних зразках, до кількості інфузорій, що виростили на стандартному продукті (кормі) вираженому у відсотках.

Висновки. Ураховуючи досвід, отриманий під час використання тест-об'єктів для токсико-біологічної оцінки риби та гідро біонтів, слід зазначити, що всебічну, якісну оцінку може надати лише біологічний метод дослідження на вищих живих організмах. Однак існуючі класичні методи визначення токсико-біологічних показників на вищих тваринах – тривалі, вартісні, трудомісткі, і тому мало застосовуються в практичній роботі.

Мікробіологічний метод дослідження, на нашу думку, цілком придатний для попередньої експрес-оцінки якості риби та інших гідробіонтів. Придатний цей метод для кінцевої токсико-біологічної оцінки гідробіонтів у тих випадках, коли використання вищих тварин у дослідженнях є проблемним.

Використання в'ійчастої інфузорії Тетрахітена піриформіс у біологічних дослідженнях є перспективним напрямом, здатним вирішити низку проблем.

ТОКСИКО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЫБЫ И ГИДРОБИОНТОВ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-ОБЪЕКТОВ

*Олифиренко В.В. – кандидат ветеринарных наук, доцент
Козичар М.В. – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент
Херсонский государственный аграрный университет
kaf.chemistry@ukr.net*

Использование инфузории Тетрахитена пириформис для токсико-биологической оценки рыбы и других гидробионтов обусловлено тем, что в большинстве случаев этот тест-организм реагирует на воздействие химических

и биологических факторов адекватно высшим животным. Использование лабораторных животных в ряде случаев не представляется возможным по соображениям экономики, трудоемкости, длительности и безопасности исследований. Применение Тетрахитены пириформис позволяет быстро получить достоверную информацию о токсичности рыб и других гидробионтов, токсичности воды водоемов различного назначения. Метод имеет ряд преимуществ и является перспективным направлением, особенно в условиях сельскохозяйственного производства.

Ключевые слова: тест-организм, токсико-биологическая оценка, качество рыбы, инфузория, микробиология.

TOXIC-BIOLOGICAL ASSESSMENT OF FISH AND HYDROBINONS BY TEST-OBJECTS

*Olifrenko V.V. – Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor
Kherson State Agricultural University*

*Kozichar M.V. – Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor
Kherson State Agricultural University
kaf.chemistry@ukr.net*

The use of the tetrachiten pyriformis ciliate for the toxico-biological assessment of fish and other aquatic organisms is due to the fact that in most cases this test organism reacts to the influence of chemical and biological factors adequately to higher animals. The use of laboratory animals in some cases is not possible for reasons of economy, labor intensity, duration, and safety of research. Application Tetrachitenes pyriformis allows you to quickly obtain reliable information on the toxicity of fish and other aquatic organisms, the toxicity of the water of water bodies for various purposes. The method has several advantages and is a promising direction, especially in the conditions of agricultural production.

Key words: test-organism, toxic-biological assessment, fish quality, ciliates, microbiology.

ЛІТЕРАТУРА

1. Игнатъев А.Д., Шаблий В.Я. Использование инфузорий Тетрахитена пириформис как тест-объекта при биологических исследованиях в сельском хозяйстве. ВАСХНИЛ, обзор информ. М., 1978. С. 3–51.
2. Кизеветтер И.В. Биохимия водного происхождения. М., 1988. С. 5–28.
3. Шаблий В.Я., Пасечник Н.М. и др. Методические рекомендации по определению биологической ценности продуктов живого происхождения. ВАСХНИЛ – М., 1986. С. 3–75.
4. Клейментов И.Я. Пищевая ценность рыбы. М.: Пищевая пром., 1981. С. 3–32.