

ВИЗНАЧЕННЯ ТОКСИЧНОСТІ КОНСЕРВІВ М'ЯСНИХ З ВИКОРИСТАННЯМ ІНФУЗОРІЇ *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*

В. І. ХОМУТЕНКО, аспірант* кафедри ветеринарно-санітарної експертизи

О. М. ЯКУБЧАК, доктор ветеринарних наук, професор, завідувач
кафедри ветеринарно-санітарної експертизи

М. В. ІГНАТОВСЬКА, кандидат ветеринарних наук

Л. В. ШЕВЧЕНКО, доктор ветеринарних наук, професор кафедри гігієни
та санітарії імені професора А. К. Скороходька

**Національний університет біоресурсів і природокористування
України**

E-mail: m.ignatovskaya1@gmail.com

Анотація. В статті наведено практичне застосування удосконаленого методу визначення токсичності м'ясних консервів методом фарбування інфузорій 5 % водним розчином еозину та 10 % водним розчином нігрозину, в результаті чого відбувається точний підрахунок кількості живих і мертвих інфузорій, що дає змогу конкретно встановити токсичність продукту, а також попередити вживання небезпечної продукції й зниження рівня виникнення харчових отруєнь.

Ключові слова: біотестування, інфузорія, консерванти, тест-об'єкти, токсичність.

Актуальність. Вченими N. M. Staender, W. Schroedl і M. Krueger Інституту бактеріології і мікології в Лейпцигу вивчалось питання використання *T. pyriformis* для виявлення ботулінічного нейротоксину [1]. В дослідженнях в результаті росту інфузорій *Tetrahymena pyriformis* як модельного об'єкта в присутності культуральних рідин з 27 штамів грампозитивних і грамнегативних бактерій, вирощених на глюкозо-пептонно-дріжджовому середовищі, було встановлено, що бактеріальні метаболіти можуть як стимулювати, так і пригнічувати ріст інфузорій. Дане явище залежало від виду і штаму бактерій.

Встановлено, що гумінові кислоти, які є продуктами життєдіяльності бактерій, можуть стимулювати та пригнічувати ріст інфузорій [2, 3].

Крім того, *T. pyriformis* є чутливим індикатором біологічної цінності м'ясної сировини, отриманої від хворих тварин. Під час біотестування м'яса великої рогатої худоби виявлено зростання біологічної цінності на 7,4–20,7 %, залежно від зростання рН з 5,33 до 6,7. Під час вивчення впливу залишкової кількості фармакологічних препаратів у м'ясі виявляли інгібування росту інфузорій під впливом нативного фуразолідону в

© В. І. ХОМУТЕНКО, О. М. ЯКУБЧАК, М. В. ІГНАТОВСЬКА,
Л. В. ШЕВЧЕНКО, 2017

*Науковий керівник – доктор ветеринарних наук, професор О. М. Якубчак

кількості 0,35 мкг/кг та аналогічного впливу залишкової кількості в печінці – 0,011 мкг/кг, що пов'язано з біотрансформацією фуразолідону, аміназин в залишковій концентрації 0,1–0,3 мг/кг в м'язовій тканині пригнічує ріст на 15-20 %, порівняно з контролем [4].

В результаті проведених досліджень було виявлено ефективність використання інфузорії для оцінки токсичності м'яса забійних тварин. В пробах, які мали перевищення МДР Zn^{2+} в 1,5-2 рази, відзначали моментальну зміну в поведінці всіх тест-організмів від дослідного зразка, кругові рухи навколо своєї осі здійснювали близько 65 % інфузорій [5].

Оцінюючи токсичний вплив найбільш поширених консервантів у харчовій промисловості – калію сорбату (E202), натрію бензоату (E211) – кожного окремо та сумісно на *T. pyriformis* визначено, що біологічні ефекти мають дозозалежний характер. Внесення в поживне середовище 0,02 % E211 і 0,188 % E202 досліджуваних речовин спричиняє внутрішньоклітинні зміни з подальшою загибеллю інфузорій [6]. Комбінована дія суміші натрію нітриту, калію йодиду і мікотоксину охратоксину А за токсичністю (LD_{50}) характеризується потенціюванням токсичності в 1,52 рази, а за функціональним показником (пригнічення генеративної функції в хронічному експерименті) – зниження токсичного ефекту на етапі інтерфазної активності популяції *T. pyriformis*. У разі внесення суміші в поживне середовище в кількості, що відповідає середньому рівню аліментарного навантаження, відбувалось зниження біологічного і адаптивного потенціалу на 11 % і 9 %, відповідно ($p < 0,05$), а в концентрації, що перевищує рівень аліментарного навантаження – зниження біотичного і адаптаційного потенціалу популяції – на 24 % і 13 % ($p < 0,05$) [7].

Аналіз отриманих досліджень та публікацій. М'ясні консерви з яловичини є стратегічним продуктом, здатним зберігати свої поживні властивості впродовж тривалого часу. Проте негативні процеси, спричинені макроекономічною ситуацією, нестача безпечної та якісної сировини і несумлінне дотримання виробниками вимог національних стандартів призводять до погіршення показників безпечності та якості консервів м'ясних. Сучасна система контролю безпечності та окремих показників якості, яка базується на аналітичному контролі, не має можливості за короткі терміни часу визначити біологічну цінність та токсичність продукту, що особливо важливо під час контролю та введення в обіг харчового продукту. Тому, крім аналітичних методів, актуальності набуває використання адекватних експрес-методів комплексної оцінки біологічної цінності та токсичності консервів м'ясних.

Мета дослідження. Визначення токсичності консервів м'ясних з використанням тест-об'єкта інфузорії *Tetrahymena pyriformis*.

Матеріали та методи дослідження. Матеріалом для проведення досліджень слугували консерви м'ясні дев'яти різних виробників, тест-об'єкт інфузорія *Tetrahymena pyriformis* та контрольні проби, виготовлені за нашої участі.

Для дослідження токсичності чи біологічної цінності м'ясних консервів пробу піддають гомогенізації. Після відстоювання повторно

струшують протягом 2 хв і відстоюють 20 хв. Отриманий гемогенат фільтрують через фільтрувальний папір. Фільтрат досліджуваних проб в кількості по 1 см³ переносять в пеніцилінові флакончики і піддають стерилізації впродовж 30 хв. Після охолодження флакона до кімнатної температури в стерильних умовах вносять 1 см³ культури *Tetrahymena pyriformis* із заздалегідь визначеною в камері Горяєва кількістю клітин в 1 см³. Через 1 годину обережно струшують флакончик і переносять в стерильних умовах 0,1 см³ досліджуваного зразка в чисту пробірку. Вносять 0,2 см³ 5 % водного розчину еозину, перемішують з дослідним зразком і витримують 5 с. Наступним кроком додають 0,3 см³ 10 % водного розчину нігрозину, перемішують і витримують 6 с. Після закінчення фарбування наносять краплю на предметне скельце та шліфованим склом готують тонкий мазок.

Результати дослідження та їх обговорення. Токсичність дослідних проб консервів визначають за наявності інфузорій, що змінили форму, характер руху, мають пригнічений ріст або відзначають повну чи часткову загибель *T. pyriformis*. Наявність мертвих або деформованих клітин, зміна характеру руху, пригнічення росту та розмноження інфузорій, порівняно з контролем, є ознакою токсичності досліджуваної проби. Відсутність загиблих інфузорій або інших патологічних змін у клітинах свідчить про нетоксичність дослідних проб. Визначення кількості інфузорій проводили в камері Горяєва (рис. 1).

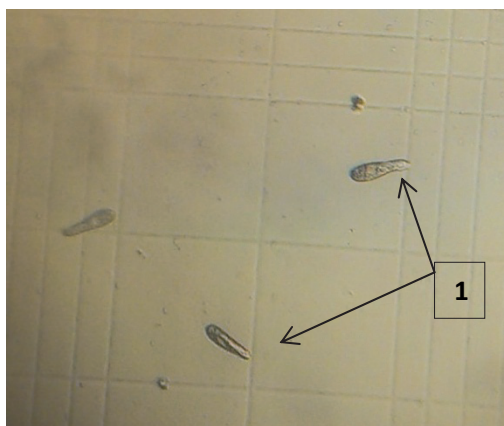


Рис. 1. Інфузорії *Tetrahymena pyriformis* в камері Горяєва
(1 – Інфузорії *Tetrahymena pyriformis*)

Підраховують кількість інфузорій у всіх великих квадратах. У квадраті рахуються клітини, що знаходяться в середині, а також ті, які розташовані на лівій і верхній межі. Клітини, що розміщуються на правій і нижній межах під час підрахунку не враховуються. Але оскільки під час здійснення підрахунку відбувається часткова загибель інфузорій внаслідок підсихання краплі, то не можливо точно визначити відсоток живих інфузорій.

Тому нами запропоновано удосконалений спосіб визначення токсичності м'ясних консервів шляхом підрахунку фарбованих інфузорій. А безпосередній підрахунок інфузорій здійснюється методом фарбування

інфузорій 5 % водним розчином еозину та 10 % водним розчином нігрозину. Після закінчення фарбування краплю наносять на предметне скельце та шліфованим склом готують тонкий мазок. Приготовані мазки висушують за кімнатної температури. Мазок переглядають під малим збільшенням мікроскопу (окуляр x7, об'єктив x40). Живі клітини не фарбуються, а мертві – фарбуються з рожевим відтінком (рис. 2).

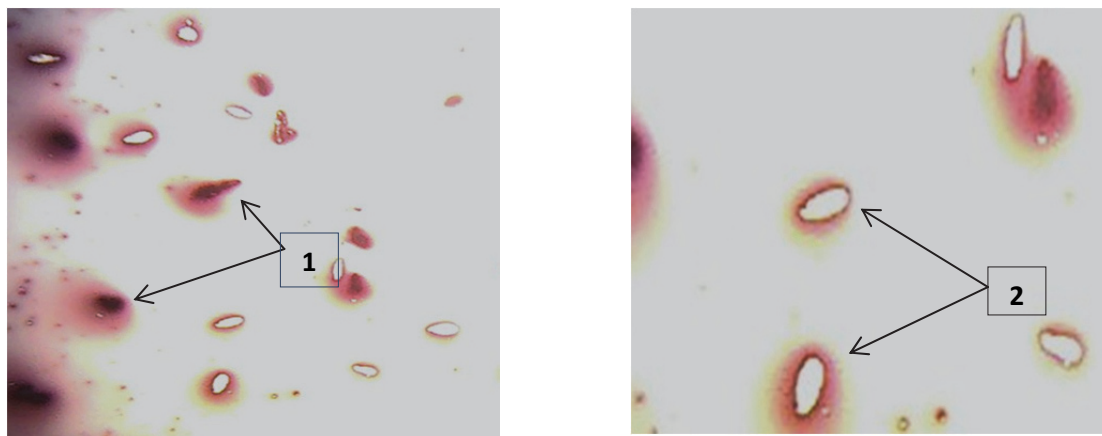


Рис. 2. *Tetrahymena pyriformis*, пофарбована еозин-нігрозином
(1 – мертві інфузорії, 2 – живі інфузорії)

Підраховують загальну кількість клітин в мазку. Відсотковий вміст мертвих клітин визначається за формулою:

$$Кл. мертві = \frac{Кл. рожеві}{Кл. загальні} \times 100$$

За результатами підрахунку живих і мертвих інфузорій оцінюємо ступінь токсичності консервів: нетоксична – не менше 80 % живих інфузорій; слаботоксична – не менше 50 % живих інфузорій; токсична – менше 50 % живих інфузорій.

Результати підрахунку пофарбованих інфузорій наведені в таблиці.

Результати підрахунку пофарбованих інфузорій, %

Інфузо- рії	№ проби									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Живі	84,3 ±1,10	82,6±1, 70	90,2± 1,30	83,8± 1,42	91,5± 1,15	95,3± 1,38	79,2± 2,10	67,3±1, 68	75,1± 1,87	70,4± 1,76
Мерт- ві	15,7± 1,39	17,4± 2,40	9,8± 1,25	16,2± 1,41	8,5± 1,21	4,7± 1,20	20,8± 1,52	32,7± 0,82	24,9± 1,62	29,6± 0,74

Отже, у результаті проведених нами досліджень встановлено, що консерви м'ясні виробників № 1, 2, 3, 4, 5 та 6 були нетоксичності, а відсоток живих інфузорій був у межах від 82,6 до 95,3, а консерви виробників № 7, 8, 9, 10 були слаботоксичними і відсоток живих інфузорій був у межах від 67,3 до 79,2 %.

Висновки і перспективи

1. Удосконалений метод визначення токсичності консервів з використанням інфузорії *Tetrahymena pyriformis* дає змогу визначити ступінь токсичності продукту з метою попередження виникнення харчових отруєнь.

2. Під час застосування методу фарбування інфузорій 5 % водним розчином еозину та 10 % водним розчином нігрозину відбувається точний підрахунок кількості живих і мертвих інфузорій.

Список використаних джерел

1. Staender, M. Exocytotic and phagocytotic activities of *Tetrahymena pyriformis* are not influenced by *Clostridium botulinum* neurotoxins / N. M. Staender, W. Schroedl, M. Krueger // *Protistology*. – 2009. – №6 (1). – С. 45–54.

2. Действие метаболитов бактерий и гуминовых кислот на рост инфузории *Tetrahymena pyriformis* / В. С.Федий, В. В. Тихонов, В. В. Демин, Б. А. Бызов. // *Естественные и технические науки*. – 2012. – №3. – С. 127–135.

3. Терехов, В. И. Индикация токсигенных *Escherichia Coli* с помощью инфузорий [Електронний ресурс] / В. И. Терехов // *Ветеринария кубани*. – 2015. – Режим доступа : http://vetkuban.com/num1_201505.html.

4. Долгов, В. А. Биотестирование продуктов, кормов и объектов окружающей среды. / В. А. Долгов, С. А. Лавина, Д. В. Козак. // *Вестник РУНД*. – 2014. – С. 69–78.

5. Биотестирование в оценке безопасности мяса / Б.С.Майканов, Ю.А.Балджи, Е.В.Кожухова, Р.Сатиева / Сейфуллинские чтения – 9: новый вектор развития высшего образования и науки: матер. Республиканской научно-теоретической конф., посвященной дню Первого Президента Республики Казахстан. – Казахстан, 2013. – С. 280.

6. Благовещенская, Д. Б. Исследование токсических свойств распространенных современных консервантов / Д. Б. Благовещенская, А. С.Мерзляков. // *Вестник новых медицинских технологий*. – 2011. – Т. XVIII, №2. – С. 501.

7. Токсичность и безвредность нитрита натрия, йодата калия и охратоксина А при комбинированном воздействии на *T. pyriformis* / А. С. Богдан, А. М. Бондарук, Л. Н. Журихина, Е. В. Федоренко, Т. Н. Свинтилова. // *Здоровье и окружающая среда: сб. науч. трудов*. – 2013. – Вип.22.. – С. 242–247.

References

1. Staender, N. M., Schroedl, W., Krueger, M (2009). Jekzocitoticheskaja i fagocitoticheskaja aktivnost' *Tetrahymena pyriformis* ne podverzheny vozdejstvu Clostridium botulinum neurotoxins. [Exocytotic and phagocytotic activities of *Tetrahymena pyriformis* are not affected by *Clostridium botulinum* neurotoxins]. *Protistology*, 6 (1), 45–54.

2. Fedyi, V. S., Tykhonov, V. V., Demyn, V. V., Byzov B. A.(2012). Deistvie metabolitov bakterii y humynovykh kyslot na rost ynfuzoryy *Tetrahymena pyriformis* [The effect of metabolites of bacteria and humic acids on the growth of infusoria *Tetrahymena pyriformis*]. *Natural and technical sciences*, 3, 127–135.

3. Terekhov, V. Y.(2015). Yndykatsiya toksyennykh *Escherichia Coli* s pomoshchiu ynfuzoryi [Elektronnyi resurs] [Indication of toxigenic *Escherichia coli* with infusoria [Electronic resource]. *Veterynaryia kubany*, Rezhym dostupu do resursu: http://vetkuban.com/num1_201505.html.

4. Dolhov, V. A., Lavyna, S. A., Kozak D. V. (2014). Byotestirovanye produktov, kormov y ob'ektov okruzhaiushchei sredy [Biotesting of food, feed and environmental objects]. Vesnyk RUND, 69–78.

5. Maikanov, B. S., Baldzhy, Yu. A., Kozhukhova, E. V., Satyeva R. (2013). Byotestirovanye v otsenke bezopasnosti miasa [Biotesting in assessing meat safety]. Mater. Republican Scientific and Theoretical Conference, dedicated to the Day of the First President of the Republic of Kazakhstan. – Kazakhstan. 280.

6. Blahoveshchenskaia, D. B., Merzliakov, A. S. (2011). Yssledovanye toksycheskykh svoystv rasprostranennykh sovremennykh konservantov [Study of the toxic properties of common modern preservatives]. Herald of new medical technologies, VIII 2, 501.

7. Bohdan, A. S., Bondaruk, A. M., Zhurykhyna, L. N., Fedorenko, E. V., Svyntylova., T. N. (2013). Toksichnost' i bezvrednost' nitrita natrija, jodata kaliya i ohratoksina A pri kombinirovannom vozdejstvii na T. Pyriformis. [Toxicity and harmlessness of sodium nitrite, potassium iodate and ochratoxin A in combination with T. pyriformis]. Zdorove y okruzhaiushchaia sereda. Sbornyk nauchnykh trudov, 22, 242–247.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ КОНСЕРВОВ МЯСНЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНФУЗОРИИ *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*

В. И. Хомутенко, А. Н. Якубчак, М. В. Игнатовская

Аннотация. В статье приведено практическое применение усовершенствованного метода определения токсичности мясных консервов методом окрашивания инфузорий 5% водным раствором эозина и 10% водным раствором нигрозина, в результате чего происходит точный подсчет количества живых и мертвых инфузорий, что позволяет конкретно установить токсичность продукта, а также предупредить употребление опасной продукции и снижение уровня возникновения пищевых отравлений.

Ключевые слова: биотестирования, инфузория, консерванты, тест-объекты, токсичность

DEFINITION OF TOXICITY OF CANNED MEAT WITH USE OF THE INFUSORIAN OF *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*

V. I. Khomumenko, O. N. Yakubchak, M. V. Ihnatovskaya

Abstract. The article presents the practical application of the improved method for determining the toxicity of canned meat by the method of staining infusoria with 5% aqueous solution of eosin and 10% aqueous solution of nigrosin, resulting in an accurate calculation of the number of live and dead infusoria, which allows specifically to establish the toxicity of the product, as well as Prevent the use of hazardous products and reduce the level of food poisoning.

Keywords: biotesting, infusoria, preservatives, test objects, toxicity