

П.П. Потапов, Т.Н. Рудёва, О.Я. Мезенова

О КОНТРОЛЕ БЕЗОПАСНОСТИ РЫБНЫХ КОНСЕРВОВ ПРИ ПОМОЩИ ИНФУЗОРИЙ *STYLONYCHIA MYTILUS* EHRENBURG, 1838 (PROTOZOA, CILIOPHORA, OXYTRICHIDAE)

Проведены исследования по определению порога выживаемости стилонихий относительно уксусной кислоты. Экспериментально показано негативное воздействие ее даже малых доз на выживаемость инфузорий. По результатам исследований порога выживаемости стилонихий по отношению к поваренной соли и ацетону установлено, что этот показатель начинает снижаться при концентрации соответственно 4 % и более 3,3 %.

Результаты исследования на выживаемость стилонихий в зависимости от содержания бенз(а)пирена в рыбных консервах, полученные методом суточного биотестирования, свидетельствуют, что при модификации методического подхода путем получения более концентрированного ацетонового раствора бенз(а)пирена и последующего наименьшего его разведения закономерностей в реакции выживаемости инфузорий не наблюдается. Это позволяет констатировать нерациональность применения для биотестирования на содержание бенз(а)пирена в рыбных консервах инфузорий *Stylonychia mytilus*.

Бенз(а)пирен, контроль, биотестирование, инфузории, *Stylonychia mytilus*.

Введение

Контроль качества пищевых продуктов имеет приоритетное значение, но зачастую для проведения соответствующих исследований требуется продолжительное время. Традиционное использование инфузорий *Stylonychia mytilus* (Ehrenberg, 1838) (Protozoa, Ciliophora, Oxytrichidae) в сельском хозяйстве для контроля качества кормов и сырья при их производстве позволяет в относительно короткие сроки дать заключение об их качестве. На кафедре пищевой биотехнологии Калининградского государственного технического университета ведутся исследования по установлению возможности использования данного вида для оценки безопасности рыбных стерилизованных консервов. Одним из опасных компонентов консервов из копченой рыбы является бенз(а)пирен, содержание которого в рыбных консервах типа «Шпроты» или «Рыба копченая в масле» не должно превышать 0,005 мг/кг. Цель работы – изучить особенности биологического развития и установить чувствительность инфузорий стилонихий к бенз(а)пирену с учетом влияния шумовых (сопутствующих) факторов (уксусная кислота, поваренная соль), обусловленных технологией изготовления консервов.

Материалы и методы

С марта по май 2010 года на базе кафедры пищевой биотехнологии ФГОУ ВПО «Калининградский государственный технический университет» и ФГУП «АтлантНИРО» была проведена серия экспериментов по определению влияния на выживаемость *S. mytilus* бенз(а)пирена, поваренной соли и уксусной кислоты. Растворы веществ тестировались в пяти повторностях трехкратно. При проведении суточных исследований по влиянию на выживаемость стилонихий бенз(а)пирена в каждой повторности использовали по 2–5 особей, а при проведении трехчасовых исследований по влиянию на выживаемость стилонихий уксусной кислоты и поваренной соли – по 5–15 особей. При проведении суточных исследований в

качестве контроля использовали водный раствор ацетона в соотношении 1:60 и инфузорий в количестве 2–5 особей. Всего было проведено 12 экспериментов в трех повторностях. Полученные результаты обрабатывали общепринятыми методами математической статистики, ошибка опытов не превышала 5 % при вероятности вывода 95 %.

Все исследования были проведены с использованием дикого штамма *S. mytilus*. Для проведения исследований отбирались инфузории из суточной культуры в экспоненциальной фазе роста, поскольку на этой стадии развития культуры клетки находятся в одном физиологическом состоянии и порог их чувствительности к воздействию веществ максимально низок [1]. Инфузории культивировались по методике, указанной в ГОСТ Р 52337-2005 [2].

Исходя из свойств бенз(а)пирена растворяться в органических растворителях для проведения тестирования на инфузориях было решено использовать водный раствор бенз(а)пирена, растворенного в ацетоне. В качестве тест-реакции инфузорий была выбрана реакция ингибирования размножения при суточной экспозиции. Это обусловлено тем, что процесс пищеварения длится 12–18 ч, поэтому мы предположили, что для переваривания эмульсии (водного раствора смеси бенз(а)пирен-ацетон) требуется подобный период времени [3].

Методическая основа проведения суточного эксперимента была заимствована из ГОСТ 29136-91, в настоящее время утратившего силу в РФ (формула расчета прироста численности клеток (ΔN) и критерия токсичности (T) при постановке суточного эксперимента), а также из ГОСТ Р 52337-2005 [2] (методика приготовления водного раствора ацетонового экстракта, количество раствора, вносимого в микроаквариумы, методика постановки трехчасового эксперимента, формула расчета выживаемости инфузорий при постановке трехчасового эксперимента).

В наших опытах источником бенз(а)пирена был выбран государственный стандартный образец «Бенз(а)пирен в гексане» (ГСО 7515-98) с концен-

трацией 100 мг/кг. Гексан выпаривался при температуре кипения (гексана – 69 °С), а сухой остаток растворялся в таком же объеме ацетона (2 мл). В качестве белкового компонента, моделирующего белковую составляющую рыбных консервов, были выбраны сухие пекарские дрожжи, которые в количестве 2,5 г разводились в 7,5 г 2,7 % уксусной кислоты. Концентрация кислоты была выбрана исходя из ее минимально нормируемого содержания в консервах, потенциально содержащих в себе бенз(а)пирен.

Из основного раствора бенз(а)пирена (100 мг/кг) путем разбавления готовилась серия растворов меньших концентраций (25; 10 мг/кг). Также тестировался основной раствор (100 мг/кг). После растворения дрожжей навеска заливалась 10 мл ацетона (контроль) или 9,5 мл ацетона и 0,5 мл бенз(а)пирена, растворенного в ацетоне (опыт). Навеска энергично встряхивалась в течение 10 минут, а затем отстаивалась в течение такого же времени. Дозатором осторожно отбирался надосадочный слой в объеме 0,5 мл и растворялся в 30 мл раствора Лозина-Лозинского (минеральный раствор для культивирования стилонихий). Полученный водный раствор ацетонового экстракта тестировался на стилонихиях. Время экспозиции составляло 24 ч. Из суточной культуры инфузорий в каждую лунку отбиралось по 20 мкл среды с клетками в количестве 2–5 штук. Учет производился при помощи микроскопа марки МБС-10 производства «ЛЗЭС» (Россия). Затем, после подсчета, в лунки добавлялся водный раствор ацетонового экстракта в количестве 200 мкл. Блок луночных микроаквариумов накрывался стеклом для предотвращения испарения. Через 24 ч подсчитывалось количество стилонихий в контроле и в опыте. При этом критерием токсичности служило снижение прироста численности инфузорий в опыте относительно прироста численности в контрольном опыте (в %).

Прирост численности особей (ΔN) определяли по формуле

$$\Delta N = N_t - N_0, \quad (1)$$

где N_t – средняя арифметическая численность клеток в конце анализа, шт.; N_0 – средняя арифметическая численность клеток в начале анализа, шт.

Критерий токсичности (T , %) рассчитывали по формуле

$$T = \Delta N_{оп} / \Delta N_{к} * 100, \quad (2)$$

где $\Delta N_{оп}$ – прирост численности инфузорий в опыте в конце анализа, шт.; $\Delta N_{к}$ – прирост численности инфузорий в контроле в конце анализа, шт.

При исследовании по определению порога выживаемости стилонихий по отношению к поваренной соли использовали серию растворов различной концентрации. Из суточной культуры отбирали по 20 мкл среды с инфузориями, которую помещали в ячейки блока луночных аквариумов в количестве 5–15 клеток. В лунки вносился исследуемый раствор в количестве 200 мкл. Продолжительность опыта составила 3 ч.

Выживаемость стилонихий (N , %) в тречасовых экспериментах определялась по формуле

$$N = N_2 / N_1 * 100, \quad (3)$$

где N_2 – среднее арифметическое значение количества стилонихий в конце опыта через 3 часа экспозиции, шт.; N_1 – среднее арифметическое значение количества стилонихий в начале опыта, шт.

При определении порога выживаемости стилонихий относительно содержания уксусной кислоты и поваренной соли готовили серию растворов различной концентрации. Из суточной культуры отбирали по 20 мкл среды с инфузориями и помещали их в ячейки блока луночных аквариумов в количестве 5–15 штук. Затем в лунки наливался исследуемый раствор в количестве 200 мкл.

Исследовано влияние на выживаемость инфузорий водного раствора ацетона различной концентрации.

Результаты и их обсуждение

В связи с широким использованием инфузорий *S. mytilus* при биотестировании кормовой продукции [2] представляет интерес обоснование возможности их применения для экспресс-оценки токсичности пищевой продукции. Для этого первоначально мы изучили особенности биологии и физиологии пищеварения инфузорий *S. mytilus*. Анализ литературных источников позволил выявить следующее.

Пищеварительный процесс *S. mytilus* протекает следующим образом. В организме инфузории существуют взаимосвязанные пищеварительные структуры, позволяющие ей переварить большие объемы пищи [4]. В процессе фагоцитоза поглощаются как пищевые, так и непищевые частицы. Инфузории не способны их различать. Адоральные (околоротовые) реснички создают ток воды, который направляет пищу к цитостому (клеточному рту). При поступлении пищи в эту зону плазматическая мембрана впячивается внутрь клетки и замыкается вокруг скопления пищи, образуя пищеварительную вакуоль, которая отшнуровывается от внешней мембраны и поступает в эндоплазму. Затем в пищеварительной вакуоли начинается процесс биодеструкции, рН в ней резко снижается и внутрь поступают пищеварительные ферменты. В этой среде начинается пищеварение. Через некоторое время рН среды в вакуоли повышается и пищеварение продолжается в слабощелочной среде. Двигаясь в эндоплазме по четко определенному пути, пищеварительная вакуоль выделяет переваренные питательные вещества в эндоплазму. После окончания процесса пищеварения вакуоль, теперь уже называемая дефекационной, приближается к поверхности клетки в области цитопига, где так же, как и в цитостоме, отсутствуют кортикальные структуры. Там происходит слияние мембраны дефекационной вакуоли и цитоплазматической мембраны, в результате чего непереваренные остатки пищи и непищевые частицы выбрасываются в окружающую среду. Площадь цитоплазматической мембраны в области цитостома и цитопига поддерживается путем постоянного транспорта мелких везикул,

которые, отшнуровываясь от цитоплазматической мембраны в области цитопижа, после некоторой трансформации поступают к цитостому и переносят мембранный материал [1].

Скорость поглощения пищи и вместительная способность у стилоухий весьма высоки (до 70–80 % объема клетки). Поглощенные пищевые частицы распределяются в три условно выделенные области – зоны А, В и С. При попадании пищи внутрь клетки зона А всегда остается пустой, а пища скапливается в зоне В. Зона С заполняется лишь после того, как заполнена зона В. Ультраструктурные исследования *S. mytilus* показали, что ее цитоплазма разделена на два структурно и функционально различных отдела. В первом находится цитоплазма с присутствующими в ней органоидами, во втором – организованная взаимосвязанная система пищеварительных каналов с многочисленными трубчатыми телами около 50 нм в диаметре. Каналы отсутствуют в зоне А, в то время как максимальная концентрация их располагается в зоне В. В процессе пищеварения пищевая частица всегда следует по пути из каналов и всегда окружена трубчатыми телами. Внутри каналов она лишена мембраны, образующей пищеварительную вакуоль. Захваченные инфузорицей клетки, изначально имеющие мембрану, теряют ее при входе в систему каналов [4].

Исследования ученых показали наличие кислой фосфатазы в трубчатых телах пищеварительных каналов, что говорит о ее роли в процессе пищеварения. Установлено, что выделение кислой фосфатазы в клетках *S. mytilus* из молодой (примерно 100 делений) и стареющей (примерно 2000 бесполой делений) культуры различается по времени выделения фермента после поглощения пищевой частицы клеткой. Пик действия фермента наступает на полтора часа раньше у особей из молодой культуры. Весь пищеварительный процесс в клетках из молодой культуры занимает около 12 ч по сравнению с 18 ч у инфузорий из стареющей культуры. Предполагают, что у стареющих особей *S. mytilus* активность кислой фосфатазы понижена [3].

При использовании в качестве тест-объектов свободноживущих инфузорий-седиментаторов токсичные вещества попадают в них как через поверхность тела, так и в результате фагоцитоза. Так осуществляется комбинация обоих способов нанесения возмущающего воздействия на тест-систему. Это большое преимущество инфузорий как тест-объектов. Во-первых, за счет фагоцитоза существенно увеличивается скорость проникновения токсичных веществ в тело инфузории, и без того довольно большая за счет большой удельной поверхности клетки. Во-вторых, некоторые вещества, сами по себе малотоксичные, в пищеварительной системе животного могут претерпевать химические изменения, в результате чего их токсичность возрастает многократно. В методиках, которые используют наружный способ нанесения воздействия на тест-систему, такие вещества могут оказаться невыявленными. В то время как в опытах на инфузориях, которые имеют пищеварительную систему, в некотором отношении подобную высшим организмам,

эти вещества проявят свое действие. В-третьих, нерастворимые в воде токсичные вещества, образующие в воде эмульсии, могут заглатываться инфузориями подобно пищевым частицам. Также установлено, что оптимальным для постановки биологического теста состоянием культуры инфузорий с точки зрения чувствительности ответной реакции является фаза экспоненциального роста у инфузорий, не образующих цист, или постцистная стадия жизненного цикла у цистобразующих видов. При использовании в тест-системе инфузорий, которые не способны к образованию цист покоя, необходимо их специально культивировать в периодическом режиме до определенной фазы роста [1].

Еще одна важная характеристика инфузорий как тест-объектов – стадия жизненного цикла. Установлено, что наибольшую чувствительность к токсичным веществам имеют только что разделившиеся особи, в процессе дальнейшего развития инфузории ее резистентность к токсичным веществам возрастает вплоть до следующего деления [1].

Все перечисленные выше общебиологические и физиологические особенности инфузорий были учтены нами в процессе проведения экспериментов. С учетом приведенных особенностей биологии и физиологии инфузорий стилоухий потенциально важны реакции их выживаемости при воздействии токсичного для человека бенз(а)пирена, попадаемого в организм при употреблении консервов из копченой рыбы, которые также содержат поваренную соль и уксусную кислоту в виде пищевых добавок.

На рис. 1 приведены результаты исследования выживаемости инфузорий стилоухий в зависимости от концентрации бенз(а)пирена в модельных системах, который вносили в виде водного раствора ацетонового экстракта.

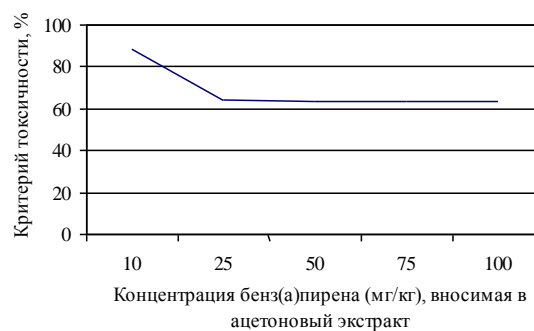


Рис. 1 Зависимость выживаемости стилоухий (критерия токсичности) от концентрации бенз(а)пирена в модельных образцах на основе сухих пекарских дрожжей

При повышении концентрации бенз(а)пирена критерий токсичности начинает падать и при концентрации 100 мг/кг практически равен критерию токсичности, полученному при тестировании раствора бенз(а)пирена с концентрацией 25 мг/кг. Минимальная концентрация раствора, использованная нами в эксперименте (10 мг/кг), превышает в 2000 раз допустимую норму, установленную действующим СанПиН. Это позволяет предположить, что при тестировании водного раствора ацетонового

экстракта с концентрацией бенз(а)пирена 0,005 мг/кг (норма безопасности, установленная СанПиН) прирост клеток в опыте и контроле окажется схожим, поскольку такая концентрация не окажет существенного влияния на клетки. Из этого можно сделать вывод, что использование *S. mytilus* в качестве тест-организма при контроле ПДК бенз(а)пирена в рыбных консервах не позволяет получить достоверные результаты.

При содержании инфузорий в 3%-м растворе NaCl их выживаемость составила 100 %, а при тестировании 4%-го раствора и выше выживаемость начинала снижаться (рис. 2).

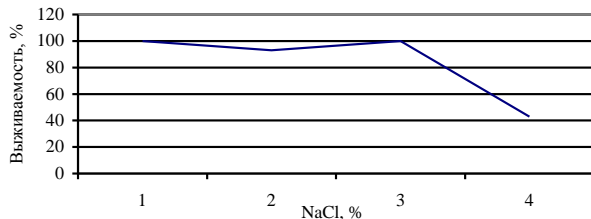


Рис. 2 Зависимость выживаемости *Stylosnychia mytilus* при тестировании растворов NaCl различной концентрации при трёхчасовой экспозиции

Поскольку содержание поваренной соли в консервах составляет 1,0–2,0 % (для консервов в масле типа шпрот), использовать инфузорий для тестирования по этому параметру нельзя. К тому же в процессе приготовления экстракта происходит снижение процента ее содержания в результате разбавления, поэтому при моделировании параметров рыбных стерилизованных консервов этот фактор был стабилизирован на одном уровне в заданном диапазоне.

При тестировании растворов уксусной кислоты различной концентрации ответная реакция инфузорий наблюдалась уже через 0,5 ч после постановки опыта. Таким образом, можно сделать вывод о том, что уксусная кислота даже в малых количествах резко угнетает жизнедеятельность инфузорий (рис. 3).

При определении выживаемости (по количеству оставшихся в живых клеток через 1 и 3 ч) разницы в значениях данного показателя не наблюдалось, что свидетельствует об отрицательном влиянии даже низких концентраций уксусной кислоты на жизнедеятельность клеток. Однако при тестировании водного раствора ацетонового экстракта, приготовленного на основе модельных рыбных стерилизованных консервов с содержанием уксусной кислоты 0,5 %, выживаемость стилонихий составила практически 100 %. При этом концентрация кислоты в водном растворе ацетонового экстракта составила примерно

0,0062 %. Сделано предположение о том, что отрицательное воздействие кислоты на выживаемость стилонихий нивелировалось в результате буферных свойств белков, входящих в состав стерилизованных рыбных консервов.

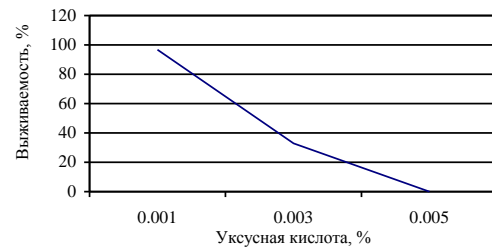


Рис. 3 Зависимость выживаемости *Stylosnychia mytilus* при тестировании растворов уксусной кислоты различной концентрации при трёхчасовой экспозиции

В эксперименте по определению порога выживаемости инфузорий по отношению к ацетону установлено, что при концентрации ацетона 3,3% (соотношение ацетон – раствор Лозина-Лозинского 1:30) при трёхчасовой экспозиции выживаемость стилонихий была стопроцентной, а при концентрации ацетона 5 % (соотношение 1,5:30) падала до нуля. Поэтому для приготовления более концентрированного водного раствора ацетонового экстракта при оценке тест-реакции стилонихий на бенз(а)пирен было выбрано соотношение ацетоновый экстракт – раствор Лозина-Лозинского 1:30.

Выводы

1. В результате литературного анализа изучены особенности биологического развития и пищеварения *S. Mytilus*.

2. Установлено резкое негативное воздействие даже малых доз уксусной кислоты на выживаемость инфузорий.

3. Выявлено, что выживаемость *S. Mytilus* по отношению к поваренной соли начинает снижаться при ее концентрации 4 %.

4. Определено, что закономерностей в реакции выживаемости инфузорий в зависимости от содержания бенз(а)пирена в рыбных консервах при проведении суточного биотестирования модифицированным методом путем повышения концентрации ацетонового экстракта токсиканта с последующим уменьшением его разведения не наблюдается. Это свидетельствует о нерациональности применения *S. mytilus* для биотестирования на содержание бенз(а)пирена в рыбных консервах.

Список литературы

1. Виноходов, Д.О. Научные основы биотестирования с использованием инфузорий: дис. ... д-ра биол. наук / Виноходов Дмитрий Олегович; Санкт-Петербургский государственный технологический институт. – СПб., 2007. – 263 с.
2. ГОСТ Р 52337-2005. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности. – Введ. 30.05.2005. – М.: Изд-во стандартов, 2005. – 19 с.
3. Chen Ying Localization of ATPase and its expression by induction in *Stylosnychia mytilus* (Protozoa, Ciliophora, Hypotrichida) / Chen Ying, Qiu Zi-Jian, Sui Shu-Guang, Shi Xin-Bai // Acta Zoologica Sinica. – 2003. – № 49(2). – С. 218–223.
4. Chen Ying Intracellular digestive process of food in a fresh water ciliate *Stylosnychia mytilus* (Protozoa, Ciliophora, Hypotrichida) / Chen Ying, Guang Ping, Qiu Zi-Jian // Acta Zoologica Sinica. – 2008. – № 54(3). – С. 510–516.

ГОУ ВПО «Калининградский
государственный технический университет»,
236000, Россия, г. Калининград, Советский проспект, 1.
Тел.: (4012) 21-62-91
Факс: (4012) 91-68-46
e-mail: rector@klgtu.ru

SUMMARY

P.P. Potapov, T.N. Ruleva, O.Y. Mezenova

The control of canned fish safety with the help of infusoria *Stylonychia mytilus* Ehrenberg, 1838 (Protozoa, Ciliophora, Oxytrichidae)

The researches on defining the survival rate threshold of *Stylonychia mytilus* concerning acetic acid has been carried out. The negative influence of its even small doses on infusoria survival has been experimentally shown. The results of researches of a *S. mytilus* survival rate threshold in relation to table salt and acetone have proved that this indicator decreases at the concentration of 4 % and more than 3,3 % accordingly.

The results of researches on *S. mytilus* survival rate depending on the content of benz(a)pyren in sterilized canned fish, that have been obtained by the method of daily biotesting, testify that the change of the procedure of getting a more concentrated solution of acetone extract of benz(a)pyren and its subsequent least dilution does not influence the regularities in infusoria survival rate reaction. It allows to ascertain irrationality of infusoria *S. mytilus* application for biotesting of the benz(a)pyren content in the sterilized canned fish.

Benz(a)pyrene, control, biotesting, infusoria, *Stylonychia mytilus*.

Kaliningrad state technical university
1, Soviet Prospect, Kaliningrad, Russia
Phone: (4012) 21-62-91
Fax: (4012) 91-68-46
e-mail: rector@klgtu.ru

