

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ КОРМОВ ПО РЕАКЦИИ ВЫЖИВАЕМОСТИ ИНFUЗОРИИ *PARAMESCIUM CAUDATUM*

*В статье дана оценка токсичности кормов по выживаемости *Paramecium caudatum* методом извлечения из исследуемых продуктов различных фракций токсических веществ ацетоном и последующем воздействии водных растворов этих фракций на инфузорию.*

*В ходе экспериментов было установлено, что токсичность большинства сельскохозяйственных, рыбных и птичьих кормов по выживаемости *Paramecium caudatum* оценена на уровне слабой и высокой токсичности. Временная динамика токсичности проб кормов по выживаемости парамеций совпала во всех вариантах, т.е. токсический эффект проявлялся на уровне снижения выживаемости парамеций в течение 5–60 мин эксперимента.*

Введение. Широкое внедрение методов биотестирования объясняется тем, что физико-химические методы способны оценить концентрацию и свойства поллютантов, но не могут дать интегральный ответ. Подобную оценку можно провести лишь биологическими методами анализа. Методы биотестирования позволяют учесть суммарное взаимодействие поллютантов (синергизм), их взаимную нейтрализацию (антагонизм), биологическую аккумуляцию веществ, что позволяет полнее оценить степень токсичности [1; 3; 5].

Свободноживущие инфузории широко используются при оценке токсичности разнообразных кормов, химических веществ и природных сред. Разработаны стандартные методы определения токсичности, накоплен определенный опыт применения простейших в анализе токсичности химических веществ, кормов, мониторинге пресных вод и в оценке токсичности сточных вод пресноводного происхождения [5; 7–9].

Целью данной работы является оценка токсичности кормов по выживаемости *Paramecium caudatum*.

К разрешению были поставлены следующие задачи: оценить токсичность кормов по выживаемости *Paramecium caudatum*, проанализировать временную динамику реакций тест-объекта на токсическое воздействие, провести сравнительный анализ результатов токсичности кормов по выживаемости *Paramecium caudatum*.

В качестве тест-объекта использовался одноклеточный организм инфузория *Paramecium caudatum* Ehrb. Данная инфузория относится к подцарству Protoza, к типу Ciliophora, подтипу Ciliata. Инфузория *Paramecium caudatum* широко распространена в пресных стоячих водоемах с большим количеством органического вещества, имеет размеры 200*40 мкм и сложное строение [4; 10].

Методика биотестирования. Метод определения общей токсичности кормов основан на извлечении из исследуемых продуктов различных фракций токсических веществ ацетоном и последующем воздействии водных растворов этих фракций на инфузорию [2; 6].

Культивирование инфузорий. *Инфузории культивируют в чашках Петри, которые моют мыльным раствором и ополаскивают водопроводной проточной водой, затем прокалывают в сушильном шкафу при температуре 150–180°C.*

Средой для культивирования инфузорий является водопроводная вода, которую отстаивают в закрытых ватным тампоном колбах в течение одной недели и стерилизуют нагреванием в кипящей водяной бане в течение одного часа.

В качестве корма используют сухие пекарские дрожжи в количестве около 0,003 г во время посева культуры. Пересев культуры проводят два раза в неделю. Культивирование осуществляют при комнатной температуре 18–28°C и естественном освещении, избегая прямых солнечных лучей.

Для биотестирования используют суточную культуру инфузорий. Навеску исследуемого продукта массой 10 г помещают в пробирку с шлифованной пробкой вместимостью 25 см³, заливают ацетоном в количестве 15 см³ и экстрагируют при энергичном встряхивании в течение не менее 2 минут. Пробирку помещают в штатив и дают отстояться в течение 15 минут. При необходимости допускают увеличение количества ацетона, но не более чем на 2 см³ (при высокой разбухаемости исследуемого продукта и невозможности получения отстоявшегося экстракта в нужном количестве) и вновь экстрагируют в течение 2 минут.

Экстракт в количестве 0,5 см³ осторожно отбирают при помощи длинной иглы шприцем и переносят в химический стакан с 40 см³ отстоянной в течение одной недели и декантированной воды комнатной температуры.

Ход работы:

1. Для исследования одного образца корма используют пять повторностей. Среднюю пробу исследуемого продукта измельчают и просеивают через сито.
2. Отбирают пастеровской пипеткой инфузорий и вносят их в каждый микроаквариум по одной капле. В каждом микроаквариуме должно быть по 5 капель с 5–10-ю инфузориями в каждой капле.
3. После распределения инфузорий в каждый микроаквариум другой пастеровской пипеткой вносят по две капли пробы для биотестирования, приготовленной ранее.
4. Через 5 минут подсчитывают инфузории в каждом микроаквариуме и заносят их численность в журнал. Травмированные инфузории при подсчете не учитывают.
5. Параллельно для определения качества ацетона и воды проводят контрольный опыт. Для этого также в пять микроаквариумов помещают вышеуказанным способом инфузории и доводят каждый микроаквариум водным раствором ацетона с массовой долей 1% до ½ его вместимости. Численность инфузорий в каждом аквариуме регистрируют в журнале.

Через 1 час экспозиции вторично подсчитывают численность инфузорий.

Инфузории в контроле должны оставаться живыми. В случае токсичности продукта, инфузории в опыте подвергаются распаду – лизису. Количество погибших (лизированных) организмов зависит от степени токсичности корма.

Степень токсичности исследуемого продукта определяют по выживаемости инфузорий через 1 час экспозиции в вытяжке исследуемого продукта. Токсичность оценивали по выживаемости тест-объекта. Достоверность различий между контрольными и опытными вариантами оценивалась по стандартному критерию Стьюдента [11].

Выживаемость инфузорий (N) в процентах вычисляют по формуле:

$$N = \frac{N_2}{N_1} * 100 ,$$

где N_2 – среднее арифметическое (из пяти повторностей) количество инфузорий через 1 час экспозиции, шт.;
 N_1 – среднее арифметическое (из пяти повторностей) количество инфузорий в начале опыта, шт.
 Степень токсичности исследуемого продукта определяют по табл. 1.

Таблица 1

Степень токсичности продукта

Степень токсичности испытуемого продукта	Выживаемость инфузорий (%) для	
	свиней	других видов сельскохозяйственных животных, птицы, рыб
Нетоксичный	90–100	81–100
Слаботоксичный	50–89	50–80
Токсичный	0–49	0–49

Анализ результатов. Для выявления острого токсичного воздействия кормов на выживаемость тест-объекта инфузории *Paramecium caudatum* проводились эксперименты с сельскохозяйственными, рыбными и птичьими кормами с целью поиска порога токсического воздействия. Достоверность различий между контрольными и опытными вариантами оценивалась по стандартному критерию Стьюдента.

Оценка токсичности сельскохозяйственных кормов по выживаемости *Paramecium caudatum*. В пробах протестированного свиного комбикорма по истечении первых 5 минут эксперимента было отмечено достоверное снижение выживаемости *Paramecium caudatum* (по критерию Стьюдента) по сравнению с контролем ($P < 0,05$): $X_k \pm m_k = 6,2 \pm 0,2$; $X_o \pm m_o = 1,8 \pm 0,4$.

В течение 60 минут эксперимента в опыте наблюдается увеличивающаяся смертность тест-объекта, что свидетельствует об острой токсичности пробы ($P < 0,05$): $X_k \pm m_k = 5 \pm 0,3$; $X_o \pm m_o = 0,8 \pm 0,4$ (табл. 2).

Таблица 2

Оценка токсичности свиного комбикорма по выживаемости *Paramecium caudatum*

Вариант	Время экспозиции, мин	Повторность					Xi	±m	Достоверность различий по критерию Стьюдента
		1	2	3	4	5			
Контроль	0	6	7	6	7	7	6,6	0,1	
	5	6	6	7	6	6	6,2	0,2	
	60	5	5	6	4	5	5	0,3	
Опыт	0	6	7	6	7	7	6,6	0,1	
	5	2	1	3	1	2	1,8	0,4	Достоверны
	60	1	-	2	-	1	0,8	0,4	Достоверны

В итоге проанализированные пробы свиного комбикорма оценивались как **токсичные**, $N=44,4\%$ (см. табл. 1).

Образцы протестированного куриного комбикорма в течение первых 5 минут эксперимента приводили к достоверному снижению выживаемости инфузорий (по критерию Стьюдента) по сравнению с контролем ($P < 0,05$): $X_k \pm m_k = 5,6 \pm 0,2$; $X_o \pm m_o = 4,0 \pm 0,4$.

Аналогичная тенденция наблюдается и по истечении 60 минут эксперимента ($P < 0,05$): $X_k \pm m_k = 4,6 \pm 0,3$; $X_o \pm m_o = 2,2 \pm 0,3$ (табл. 3).

Следовательно, пробы куриного комбикорма оценивались как **слаботоксичные**; $N=55\%$ (см. табл. 1).

Таблица 3

Оценка токсичности куриного комбикорма по выживаемости *Paramecium caudatum*

Вариант	Время экспозиции, мин	Повторность					Xi	±m	Достоверность различий по критерию Стьюдента
		1	2	3	4	5			
Контроль	0	6	6	6	6	6	6	0,6	
	5	6	6	5	6	5	5,6	0,2	
	60	5	5	4	5	4	4,6	0,3	
Опыт	0	6	6	6	6	6	6	0,6	
	5	3	4	5	4	4	4	0,4	Достоверны
	60	3	2	2	2	2	2,2	0,3	Достоверны

Проанализированные образцы соломы в течение первых 5 минут эксперимента приводили к незначительному снижению выживаемости *Paramecium caudatum* по сравнению с контролем ($P < 0,05$): $X_k \pm m_k = 5,0 \pm 0,2$; $X_o \pm m_o = 4,6 \pm 0,1$.

Аналогичная ситуация наблюдалась и по истечении 60 минут эксперимента ($P < 0,05$): $X_k \pm m_k = 4,2 \pm 0,2$; $X_o \pm m_o = 3,4 \pm 0,9$ (табл. 4).

Исходя из полученных данных пробы соломы оценивались как **слаботоксичные**; $N=73,9\%$ (см. табл. 1).

Таблица 4

Оценка токсичности соломы по выживаемости *Paramecium caudatum*

Вариант	Время экспозиции, мин	Повторность					Xi	±m	Достоверность различий по критерию Стьюдента
		1	2	3	4	5			
Контроль	0	5	7	5	6	6	5,8	0,4	
	5	5	6	5	5	4	5	0,2	
	60	5	5	4	4	3	4,2	0,2	
Опыт	0	5	7	5	6	6	5,8	0,4	
	5	5	5	5	5	3	4,6	0,1	Недостовверны
	60	4	4	3	3	3	3,4	0,9	Недостовверны

Оценка токсичности рыбьих кормов по выживаемости *Paramecium caudatum*. В пробах проанализированного корма «Флора» в течение 5 минут эксперимента наблюдалось достоверное уменьшение численности тест-объекта по сравнению с контролем ($P < 0,05$): $X_k \pm m_k = 4,8 \pm 0,5$; $X_o \pm m_o = 2,8 \pm 0,6$.

Снижение выживаемости инфузорий наблюдалось и по истечении 60 минут эксперимента ($P < 0,05$): $X_k \pm m_k = 5,0 \pm 0,3$; $X_o \pm m_o = 2,2 \pm 0,6$.

Полученные данные свидетельствуют о том, что пробы корма «Флора» оценивались как **слаботоксичные**; $N=78,6\%$ (см. табл.1).

Таблица 5

Оценка токсичности корма «Флора» по выживаемости *Paramecium caudatum*

Вариант	Время экспозиции, мин	Повторность					Xi	±m	Достоверность различий по критерию Стьюдента
		1	2	3	4	5			
Контроль	0	5	5	5	6	5	5,2	0,2	
	5	4	5	4	6	5	4,8	0,5	
	60	6	5	4	5	5	5	0,3	
Опыт	0	5	5	5	6	5	5,2	0,2	
	5	3	4	1	3	3	2,8	0,6	Достоверны
	60	4	4	1	2	-	2,2	0,6	Достоверны

В пробах протестированного корма «Универсал» в течение первых 5 минут опыта не наблюдалась смертность тест-объекта (по критерию Стьюдента) так же, как и в контроле ($P < 0,05$): $X_k \pm m_k = 5,2 \pm 0,2$; $X_o \pm m_o = 5,2 \pm 0,2$.

Аналогичная тенденция соблюдалась и после 60 минут эксперимента ($P < 0,05$): $X_k \pm m_k = 5,2 \pm 0,6$; $X_o \pm m_o = 4,6 \pm 0,4$ (табл. 6).

Следовательно, взятые пробы корма характеризуются как **слаботоксичные**; $N=55\%$ (см. табл.1).

Протестированные образцы корма «Гамарус» по истечении 5 минут приводили к снижению выживаемости тест-объекта (по критерию Стьюдента) в опыте по сравнению с контролем ($P < 0,05$): $X_k \pm m_k = 5,4 \pm 0,4$; $X_o \pm m_o = 3,8 \pm 0,5$.

Таблица 6

Оценка токсичности корма «Универсал» по выживаемости *Paramecium caudatum*

Вариант	Время экспозиции, мин	Повторность					Xi	±m	Достоверность различий по критерию Стьюдента
		1	2	3	4	5			
Контроль	0	6	5	6	6	5	5,6	0,2	
	5	6	5	5	5	5	5,2	0,2	
	60	5	6	5	4	6	5,2	0,6	
Опыт	0	6	5	6	6	5	5,6	0,2	
	5	5	5	5	6	5	5,2	0,2	Недостовверны
	60	4	5	4	6	4	4,6	0,4	Недостовверны

Типичная ситуация наблюдалась и по истечении 60 минут эксперимента ($P < 0,05$): $X_k \pm m_k = 5,4 \pm 0,4$; $X_o \pm m_o = 2,0 \pm 0,3$ (табл. 7).

Следовательно, протестированные пробы данного корма являлись **слаботоксичными**; $N=52,6\%$ (см. табл.1).

Таблица 7

Оценка токсичности корма «Гамарус» по выживаемости *Paramecium caudatum*

Вариант	Время экспозиции, мин	Повторность					Xi	±m	Достоверность различий по критерию Стьюдента
		1	2	3	4	5			
Контроль	0	6	5	7	6	6	6	0,3	
	5	5	5	6	6	5	5,4	0,4	
	60	6	5	6	5	5	5,4	0,4	
Опыт	0	6	5	7	6	6	6	0,3	
	5	4	3	5	4	3	3,8	0,5	Достоверны
	60	2	-	3	2	3	2	0,3	Достоверны

Оценка токсичности птичьих кормов по выживаемости *Paramecium caudatum*. Образцы проанализированного корма «Вака» в течение 5 минут приводили к незначительному снижению выживаемости *Paramecium caudatum* (по критерию Стьюдента) в опыте по сравнению с контролем ($P < 0,05$): $X_k \pm m_k = 5,0 \pm 0,0$; $X_o \pm m_o = 5,0 \pm 0,3$.

По истечении 60 минут эксперимента наблюдалось увеличение смертности клеток инфузорий до уровня слабой токсичности ($P < 0,05$): $X_k \pm m_k = 5 \pm 0,3$; $X_o \pm m_o = 3,6 \pm 0,4$ (табл. 8).

Следовательно, взятые образцы корма являются **слаботоксичными**; $N=72\%$ (см. табл.1).

Таблица 8

Оценка токсичности корма «Вака» по выживаемости *Paramecium caudatum*

Вариант	Время экспозиции, мин	Повторность					Xi	±m	Достоверность различий по критерию Стьюдента
		1	2	3	4	5			
Контроль	0	5	6	5	5	6	5,4	0,2	
	5	5	5	5	5	5	5	-	
	60	5	5	6	5	4	5	0,3	
Опыт	0	5	6	5	5	6	5,4	0,2	
	5	5	5	6	4	5	5	0,3	Недостовверны
	60	4	3	5	3	3	3,6	0,4	Достоверны

Пробы корма «Трилл» в течение 5 минут эксперимента приводили к значительному снижению выживаемости тест-объекта (по критерию Стьюдента) в эксперименте по сравнению с контролем ($P < 0,05$): $X_k \pm m_k = 4,8 \pm 0,2$; $X_o \pm m_o = 3,0 \pm 0,3$.

По истечении 60 минут в эксперименте гибель инфузорий сохранялась ($P < 0,05$): $X_k \pm m_k = 4,8 \pm 0,2$; $X_o \pm m_o = 1,4 \pm 0,4$.

В результате полученных данных можно сделать следующий вывод о том, что пробы взятого корма оценивались как **токсичные**; $N=46,6\%$ (см. табл.1).

Таблица 9

Оценка токсичности корма «Трилл» по выживаемости *Paramecium caudatum*

Вариант	Время экспозиции, мин	Повторность					X_i	$\pm m$	Достоверность различий по критерию Стьюдента
		1	2	3	4	5			
Контроль	0	5	5	6	6	5	5,4	0,2	
	5	5	4	5	5	5	4,8	0,2	
	60	5	5	4	5	5	4,8	0,2	
Опыт	0	5	5	6	6	5	5,4	0,2	
	5	3	3	2	3	4	3	0,3	Достоверны
	60	2	-	1	2	2	1,4	0,4	Достоверны

Пробы протестированного корма «Обжорка» в течение 5 минут эксперимента практически не приводили к смертности тест-объекта в эксперименте, как и в контроле ($P < 0,05$): $X_k \pm m_k = 5,0 \pm 0,3$; $X_o \pm m_o = 4,4 \pm 0,2$.

Аналогическая тенденция сохранилась и по истечении 60 минут в эксперименте ($P < 0,05$): $X_k \pm m_k = 4,8 \pm 0,2$; $X_o \pm m_o = 4,4 \pm 0,2$ (табл. 10).

Следовательно, пробы взятого корма оценивались как **нетоксичные**; $N=100\%$ (см. табл.1).

Таблица 10

Оценка токсичности корма «Обжорка» по выживаемости *Paramecium caudatum*

Вариант	Время экспозиции, мин	Повторность					X_i	$\pm m$	Достоверность различий по критерию Стьюдента
		1	2	3	4	5			
Контроль	0	5	5	5	5	5	5	-	
	5	5	6	5	4	5	5	0,3	
	60	5	5	5	4	5	4,8	0,4	
Опыт	0	5	5	5	5	5	5	-	
	5	4	5	4	5	4	4,4	0,2	Недостоверны
	60	4	5	5	4	4	4,4	0,2	Недостоверны

Сравнительный анализ результатов. Установлено, что пробы таких сельскохозяйственных кормов, как куриный комбикорм и солома, оценивались как слаботоксичные, т.е. вызывали достоверное снижение выживаемости парамеций (55,0–73,9%) по критерию Стьюдента ($P < 0,05$). Пробы свиного комбикорма оценивались как высокотоксичные, вызывая достоверное снижение выживаемости парамеций (44,4%) по критерию Стьюдента ($P < 0,05$). Временная динамика токсичности проб сельскохозяйственных кормов по выживаемости парамеций совпадала во всех вариантах, т.е. токсический эффект проявлялся на уровне снижения выживаемости парамеций в течение 5–60 мин эксперимента.

Таким образом, воздействие различных сельскохозяйственных кормов на выживаемость парамеций оценивалось однозначно, пробы характеризовались как высоко- и слаботоксичные.

Проанализированные пробы таких рыбных кормов, как «Флора», «Универсал» и «Гамарус», оценивались как слаботоксичные, т.е. вызывали достоверное снижение выживаемости парамеций (52,6–78,6%) по

критерию Стьюдента ($P < 0,05$). Временная динамика токсичности проб рыбных кормов по выживаемости парameций совпала во всех вариантах, т.е. токсический эффект проявлялся на уровне снижения выживаемости парameций в течение 5–60 мин эксперимента, но незначительно.

Следовательно, воздействие различных рыбных кормов на выживаемость парameций оценивалось однозначно, пробы характеризовались как слаботоксичные.

Пробы птичьих кормов «Вака» и «Трилл» оценивались как слабо- и высокотоксичные, т.е. вызывали достоверное снижение выживаемости парameций (46,6–72,0%) по критерию Стьюдента ($P < 0,05$). Пробы корма «Обжорка» оценивались как нетоксичные, т.е. выживаемость парameций в опыте была аналогичной контролю (100%) по критерию Стьюдента ($P > 0,05$). Временная динамика токсичности проб птичьих кормов «Вака» и «Трилл» по выживаемости парameций совпала во всех случаях, т.е. токсический эффект проявлялся на уровне снижения выживаемости парameций в течение 5–60 мин эксперимента.

Следовательно, воздействие различных птичьих кормов «Вака» и «Трилл» на выживаемость парameций оценивалось однозначно, пробы характеризовались как слабо- и высокотоксичные. Пробы корма «Обжорка» характеризовались как нетоксичные.

Данные острого эксперимента по выживаемости *Paramecium caudatum* в вариантах проб с различными сельскохозяйственными, рыбными и птичьими кормами сопоставимы в большинстве случаев, что свидетельствует о слабом токсичном воздействии проанализированных кормов на организмы протозойного звена.

Выводы

1. Токсичность большинства сельскохозяйственных, рыбных и птичьих кормов по выживаемости *Paramecium caudatum* оценена на уровне слабой и высокой (наибольшей) токсичности.

2. Временная динамика токсичности проб кормов по выживаемости парameций совпала во всех вариантах, т.е. токсический эффект проявлялся на уровне снижения выживаемости парameций в течение 5–60 мин эксперимента.

3. Пробы рыбных кормов по сравнению с сельскохозяйственными и птичьими оценивались как слаботоксичные во всех образцах, т.е. вариации результатов не наблюдалось.

4. Выживаемость тест-объекта *Paramecium caudatum* в вариантах проб с различными сельскохозяйственными, рыбными и птичьими кормами сопоставима в большинстве случаев, что свидетельствует о слабом токсичном воздействии проанализированных кормов на организмы протозойного звена.

Литература

1. Алексеев, В.А. О понятиях "чувствительности" и "устойчивости" гидробионтов к токсическому воздействию / В.А. Алексеев // Гидробиол. журн. – 1983. – Т.19. – №3. – С.77–81.
2. Бражерский, Ф.Д. Оценка качества сырья и комбикормов / Ф.Д. Бражерский. – М.: Колос, 1983. – 111 с.
3. Вопросы экологии простейших. – Л.: Наука, 1978. – Вып.3. – 144 с.
4. Движение и поведение одноклеточных животных. – Л.: Наука, 1978. – 159 с.
5. Инфузории в биотестировании: тез. докл. – СПб., 1998. – 304 с.
6. Кокова, В.Е. Непрерывное культивирование беспозвоночных / В.Е. Кокова. – Новосибирск: Наука, 1982. – 167 с.
7. Максимов, В.Н. Специфические проблемы изучения комбинированного действия загрязнителей на биологические системы / В.Н. Максимов // Гидробиол. журн. – 1977. – Т.13. – №4. – С. 34–45.
8. Малоземов, Ю.А. Краткий определитель беспозвоночных животных Среднего Урала / Ю.А. Малоземов, Л.А. Малоземова. – Екатеринбург: Изд-во УрГУ, 1996. – 280 с.
9. Морфология и физиология простейших. – М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1963. – 155 с.
10. Общая микробиология / под ред. А.Е. Вершигора. – Киев: Выща шк., 1988. – 343 с.
11. Плохинский, Н.А. Математические методы в биологии: учеб.-метод. пособие / Н.А. Плохинский. – М.: Изд-во МГУ, 1978. – 265 с.

