

ЭКОЛОГИЯ

БИОТЕСТИРОВАНИЕ ПИЩЕВЫХ ДОБАВОК НА ИНФУЗОРИЯХ

Е.Г. Черемных, А.В. Кулешин, О.Н. Кулешина

МГУ Прикладной биотехнологии
ул. Талалихина, 33, Москва, Россия, 109316

В работе показана возможность использования метода биотестирования пищевых добавок на инфузориях. Экспериментальные данные получены с помощью автоматизированного прибора «БиоЛаТ».

Ключевые слова: биотестирование, пищевые добавки, инфузории, токсикологическая оценка, автоматизация биологических исследований.

В современном крупнотоннажном пищевом производстве широко используются искусственные пищевые добавки. Для контроля качества выпускаемой продукции необходимо разработать простые и эффективные методы анализа, позволяющие дать токсикологическую оценку как самих пищевых добавок, так и разнообразных продуктов [4].

При изучении воздействия пищевых добавок на живые клетки перспективным является разработанный нами метод биотестирования на простейших с использованием автоматизированного прибора «БиоЛаТ».

Методические рекомендации «Автоматизированный метод оценки токсичности продовольственного сырья и кормов, объектов окружающей среды на инфузориях *Paramecium caudatum* и *Tetrahymena pyriformis*» разработаны д.в.н. проф. В.А. Долговым, д.б.н. С.А. Лавиной (ГНУ ВНИИВСГЭ), к.т.н. доц. Е.Г. Черемных, к.х.н. доц. Е.И. Симбиревой, А.В. Кулешиным (МГУПБ). Эти рекомендации одобрены на совместном заседании секции «Ветеринарно-санитарная экспертиза» Отделения ветеринарной медицины РАСХН и Ученого совета ГНУ ВНИИВСГЭ.

В этом методе для получения токсикологических характеристик пищевых продуктов, упаковочных материалов, используемых в пищевой отрасли, и объектов окружающей среды разработана единая методическая схема комплексной биологической оценки на инфузориях *Tetrahymena pyriformis*, которая включает три этапа:

1) первичная токсикологическая оценка, включающая 24-часовую экспозицию исследуемых проб с популяцией инфузორий. В течение этого времени фикс-

сируется острая токсичность пробы на *Paramecium caudatum* через 2 ч, через 24 ч на *Tetrahymena pyriformis* — подострая. По минимальным изменениям жизнедеятельности организмов без их гибели оценивается порог токсического действия;

2) при оценке объектов в хроническом эксперименте препараты и продукты исследуются при концентрациях, не проявивших выраженного токсического действия на первом этапе. Временная зависимость роста популяции в течение 96 ч (4 сут.) позволяет определить адаптогенные свойства, иммуномоделирующее действие и мутагенную активность исследуемых объектов;

3) пролонгированный эксперимент в течение 384 ч (16 сут.) проводится при необходимости уточнения данных предыдущих опытов.

Биотестирование проводится на основе анализа роста популяции инфузорий и сравнения их реакции на повышенные концентрации биологически активных веществ в исследуемых пробах, содержащих опытную и контрольную популяции.

Критерием определения токсичности служит время от начала воздействия испытуемого экстракта до гибели инфузорий, факт которой констатируют на основании полного прекращения движения и наличия признаков распада клеток. Оценка степени токсичности дается по временному интервалу: гибель в течение 3 мин. — объект остро токсичный, до 10 мин. — токсичный, до 3 ч — слабо токсичный. Если через 3 ч инфузории остаются подвижными, объект не токсичен.

Среди тест-организмов, применяемых при биотестировании, инфузории занимают значительное место. Они являются весьма удобными объектами для исследований, а полученные результаты имеют высокий коэффициент корреляции с данными подобных исследований на мышах, крысах, кроликах и других животных [2].

Инфузории как тест-организмы обладают следующими преимуществами:

— инфузории — эукариотические организмы, они имеют свойства и отдельного организма, и клетки, в силу чего могут быть использованы при биотестировании и как интегральные датчики на совокупность действующих факторов, и как одноклеточные тест-организмы при оценке цитотоксичности;

— малый жизненный цикл и высокая скорость размножения инфузорий позволяют проследить их реакцию на воздействие токсиканта в ряду поколений за короткое время (6—96 ч);

— с помощью инфузорий возможна оценка токсичности не только водорастворимых соединений, но и соединений, растворимых в ряде органических растворителей;

— высокая чувствительность инфузорий к загрязняющим веществам (тяжелым металлам, пестицидам, микотоксинам и др.) позволяет использовать их в экологических исследованиях;

— относительно большие размеры инфузорий (*Tetrahymena pyriformis* — $0,05 \times 0,02$ мм, *Paramecium caudatum* — $0,3 \times 0,05$ мм) позволяют легко оценивать их состояние визуально под микроскопом;

— стоимость лабораторного содержания инфузорий гораздо ниже стоимости содержания экспериментальных животных.

Инфузории используются также в качестве тест-организмов для экспрессного токсикологического исследования химических средств и лекарственных препаратов различных фармакологических групп.

В медицинской токсикологии используется методика на инфузориях *Paramecium caudatum*. Данный тест-организм позволяет оценить степень токсичности исследуемого вещества для теплокровных. Определение доз (от пороговых до смертельных) на этих инфузориях дает возможность выявить диапазон токсикологической активности веществ. Эти инфузории использовались при оценке тяжести эндогенной интоксикации, в частности для определения токсичности крови больного.

В исследованиях на *Tetrahymena pyriformis* обнаружена четкая корреляция между величинами токсичности для этого вида инфузорий и млекопитающих. Эта оценка основана на большом количестве химических соединений, в том числе нейротоксических, общеядовитых, цитотоксичных и веществ, нарушающих биоэнергетику.

Обнаружена высокая чувствительность инфузорий к мембранотропным веществам. Сравнительное дозозависимое исследование позволило предложить инфузории в качестве модели для скрининга и биологической стандартизации лекарственных средств антиоксидантного и мембраностабилизирующего типов действия.

В процессе адаптации простейших функции клетки изменяются относительно самостоятельно, так как каждая из функций определяется некоторой совокупностью взаимосвязанных биохимических процессов.

Из всех вероятных функций простейших наиболее доступны для измерения следующие тест-реакции: изменение подвижности, гибель организма и скорость размножения. Для оценки длительного воздействия малых концентраций действующих веществ тест-реакцией может служить гибель экспериментальных популяций монокультур за определенный период времени.

На изменение подвижности расходуется всего 1% энергии общего обмена. Двигательная реакция микроорганизмов на химический раздражитель называется хемотаксисом. Бактерии (инфузории) способны двигаться по направлению к аттрактантам (зачастую питательным веществам) и от репеллентов (например, токсинов) [1]. По отношению к части токсичных агентов хемотаксис имеет отрицательный характер (щелочи, щелочные и щелочно-земельные металлы), а некоторые кислоты привлекают инфузорий даже при опасных концентрациях. Функция изменения подвижности совместно с функцией хемотаксиса может увеличить представительность эксперимента по изменению подвижности.

Гибель отдельных клеток — более надежная реакция, но с ее помощью невозможно выявить низкие концентрации токсикантов. Для выявления низких концентраций используется тест-реакция снижения скорости размножения.

Для биотестирования наиболее часто используются два распространенных вида инфузорий: *Paramecium caudatum* (рис. 1) и *Tetrahymena pyriformis* (рис. 2). Клетка этих инфузорий имеет оболочку — пелликулу с отходящими от нее ресничками, а также стрекательные органеллы — трихоцисты. Инфузории имеют два ядра: макронуклеус и микронуклеус. В макронуклеусе содержатся гены, обеспечи-

вающие функционирование сформировавшейся клетки. Микронуклеус содержит полную генетическую информацию, соответствующую данному виду. Питание инфузорий осуществляется через глотку (фагоцитоз), или через клеточную мембрану (пиноцитоз). Большинство видов инфузорий являются аэробными организмами.

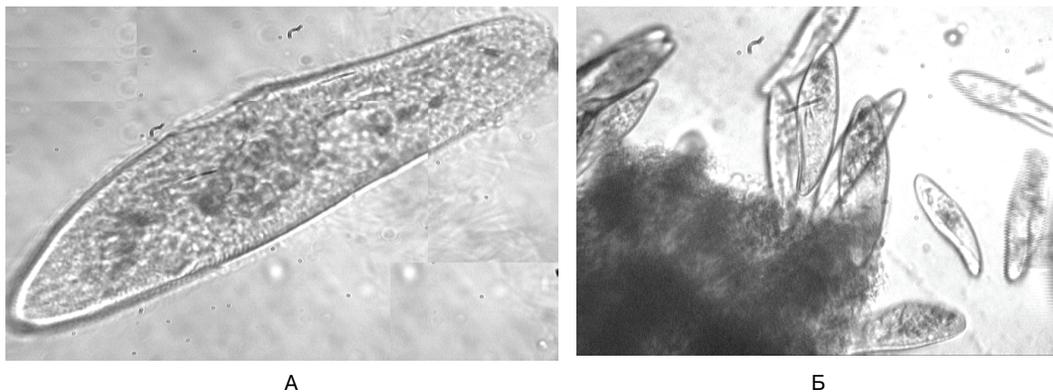


Рис. 1. *Paramecium caudatum*:

А — отдельная клетка (увеличение 7×100); Б — скопление *Paramecium caudatum* около дрожжей (увеличение 7×20)

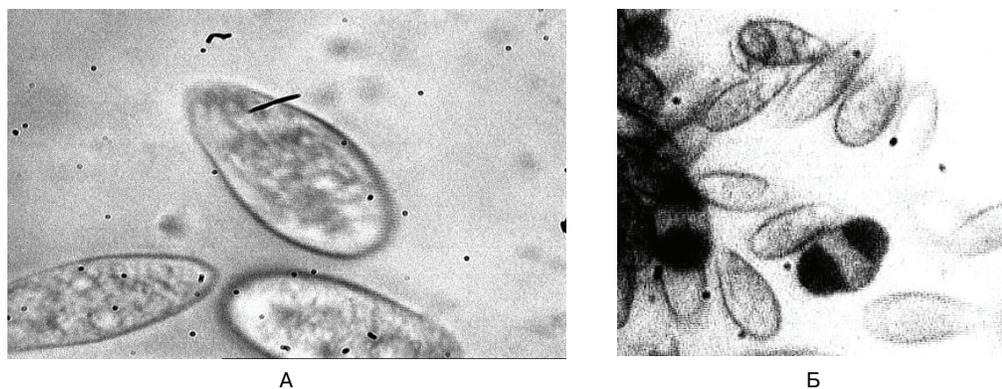


Рис. 2. *Tetrahymena pyriformis*:

А — нормальная форма клеток (увеличение 7×100); Б — аномалия морфологии при попадании в среду культивирования микроорганизмов (увеличение 7×40)

Размножение инфузорий происходит путем деления. Характерной чертой инфузорий является конъюгация — форма полового процесса, при которой происходит обмен гаплоидными половыми ядрами (ядрами с одинарным набором хромосом), образующимися из микронуклеусов двух клеток. Для любой живой клетки при заданном и постоянном наборе хромосом существует запрограммированное предельное количество делений, которое определяет длительность жизни организма и популяции.

Автоматизация биотестирования позволяет ускорить регистрацию роста популяции клеток. Для этих целей был разработан прибор «БиоЛаТ-3», оснащенный двумя видеокамерами, соединенными с компьютером (рис. 3) [5].

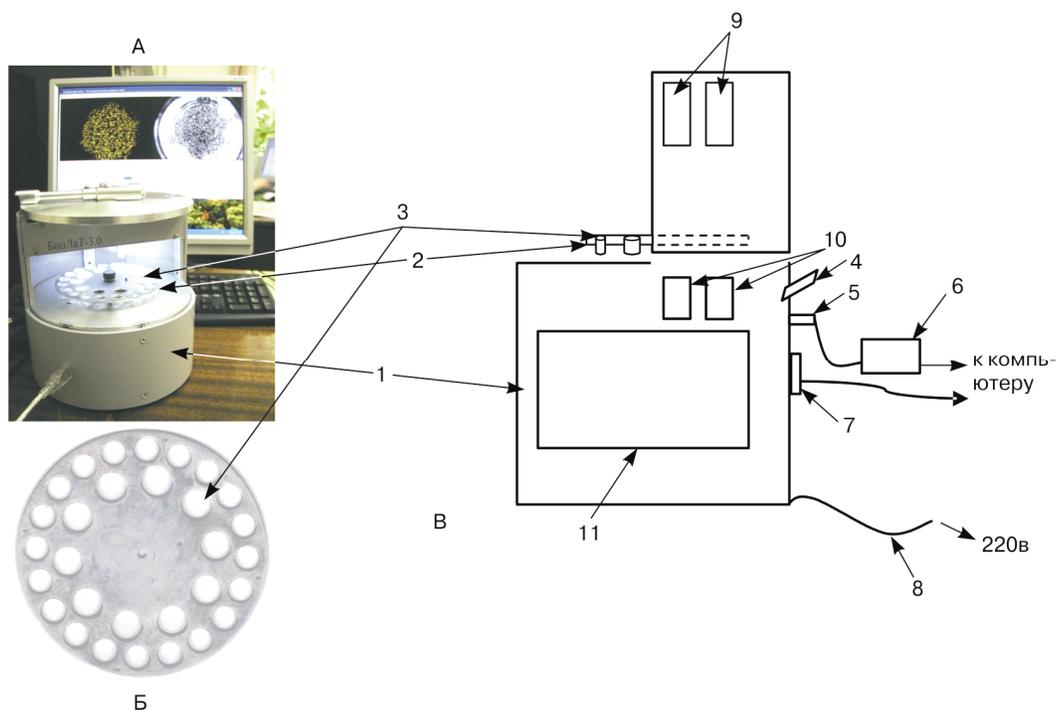


Рис. 3. Прибор «БиоЛат-3»:

А — внешний вид; Б — схема планшета для размещения лунок с образцами; В — схема прибора «БиоЛат-3»: 1 — корпус прибора; 2 — планшет; 3 — лунки; 4 — тумблер включения прибора; 5 — композитный разъем; 6 — внешний тюнер USB-Cap100; 7 — разъем USB; 8 — сетевой кабель; 9 — две видеокамеры; 10 — две подсветки; 11 — устройство управления

Принцип работы прибора состоит в программной обработке изображения лунок с инфузориями и пробами для подсчета живых тест-организмов. Лунки позиционируются под объективы двух видеокамер по специальным алгоритмам, заданным в программе.

Внешний ряд лунок предназначен для подсчета мелких тест-организмов, таких как *Tetrahymena pyriformis*, а внутренний ряд лунок — для крупных тест-организмов, таких как *Paramecium caudatum*.

Исследование можно проводить в двух режимах: экспрессном — от 15 мин. до 72 ч; длительном от 24 ч до 30 сут.

Общий алгоритм автоматизированного биотестирования состоит в циклическом подсчете инфузорий во всех заданных и загруженных пробами емкостях (лунках). На основании всех произведенных подсчетов инфузорий по каждой пробе вычисляются относительные количества выживших тест-организмов и в соответствии с принятыми критериями оценивается степень безопасности исследуемого продукта. Продолжительность первого этапа биотестирования составляет 1—4 ч.

Далее возможно проведение уточняющего второго этапа в течение времени от 24 ч и выше. Длительность экспозиции зависит от вида инфузорий и от выбранной методики исследования.

Критерии для оценки полученных результатов вырабатываются в процессе разработки методики и, как правило, такие критерии имеют 3—4 градации, например: очень токсичный, токсичный, слаботоксичный и нетоксичный (объект).

При комплексном исследовании качества пищевых продуктов биотестирование на инфузориях в ряде случаев целесообразно сочетать с титриметрическим методом определения антиоксидантной активности.

Сущность метода заключается в определении кислотного числа путем нейтрализации свободных жирных кислот (например, в нутряном салe) спиртовым раствором КОН с добавлением индикатора фенолфталеина, который меняет окраску в пределах рН 8,2—10.

Результаты определения кислотного числа для различных антиоксидантов в зависимости от времени представлены на рис. 4. При интерпретации этих данных необходимо учитывать, что чем ниже кислотное число, тем выше антиоксидантная активность пищевой добавки. Из этого следует:

- синтетический антиоксидант БОТ обладает высокой антиоксидантной активностью;
- почти такой же антиоксидантной активностью обладает чеснок натуральный;
- CO_2 -экстракт чеснока имеет антиоксидантную активность в течение первых 20 сут процесса окисления;
- тмин натуральный провоцирует окислительную порчу жира;
- действие CO_2 -экстракта тмина аналогично действию CO_2 -экстракта чеснока.

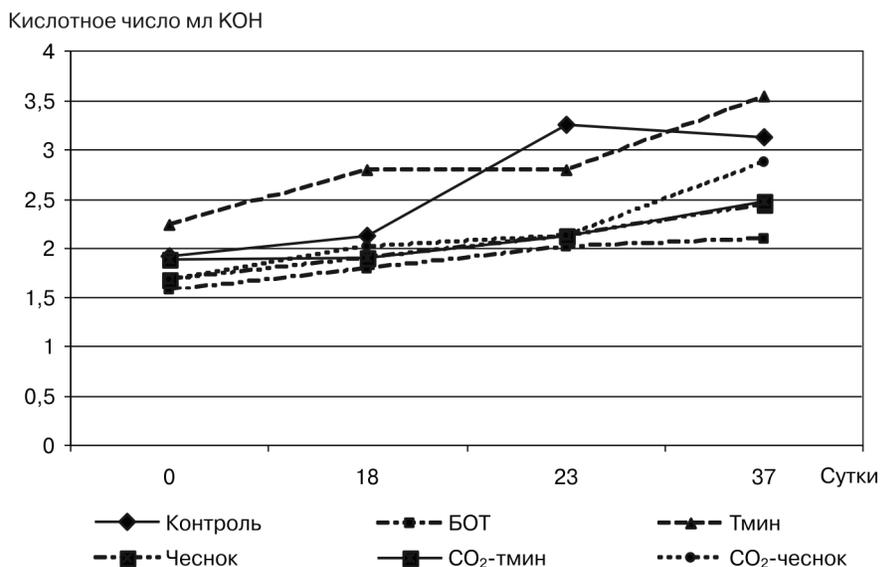


Рис. 4. Зависимость кислотного числа различных антиоксидантов от времени

Синтетический антиоксидант БОТ показывает высокую токсичность для тест-объектов — инфузорий *Paramecium caudatum*. Пищевые добавки — чеснок и CO_2 -экстракты чеснока и тмина — обладают низкой токсичностью при высоких показателях антиоксидантной активности. Натуральный тмин обладает антимикробными свойствами со средними показателями токсичности (рис. 5).

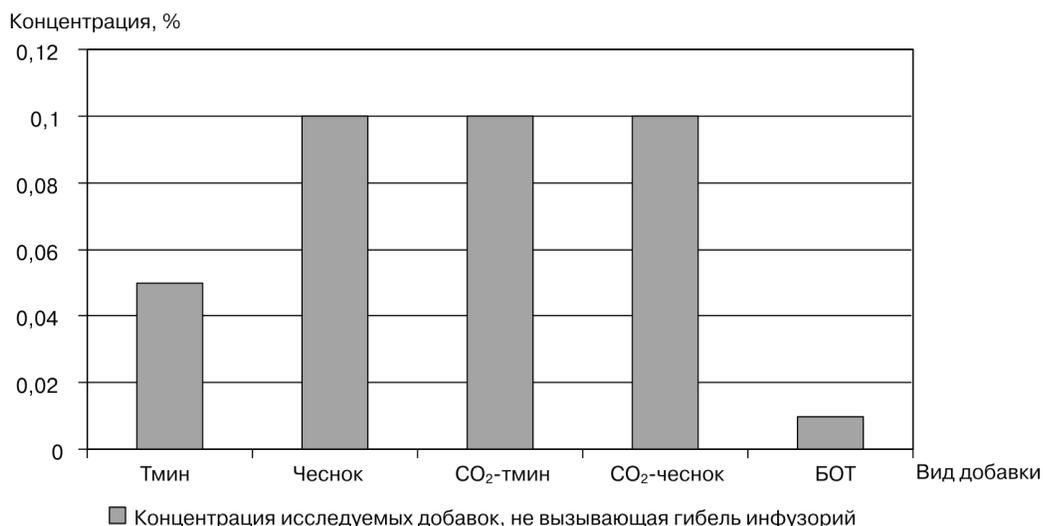


Рис. 5. График токсичности пищевых добавок на *Paramecium caudatum*

В работе изучена временная зависимость жизнеспособности популяции инфузорий. Опыт основан на росте и развитии колонии инфузорий *Tetrahymena pyriformis* при определенной концентрации пищевых добавок (рис. 6).

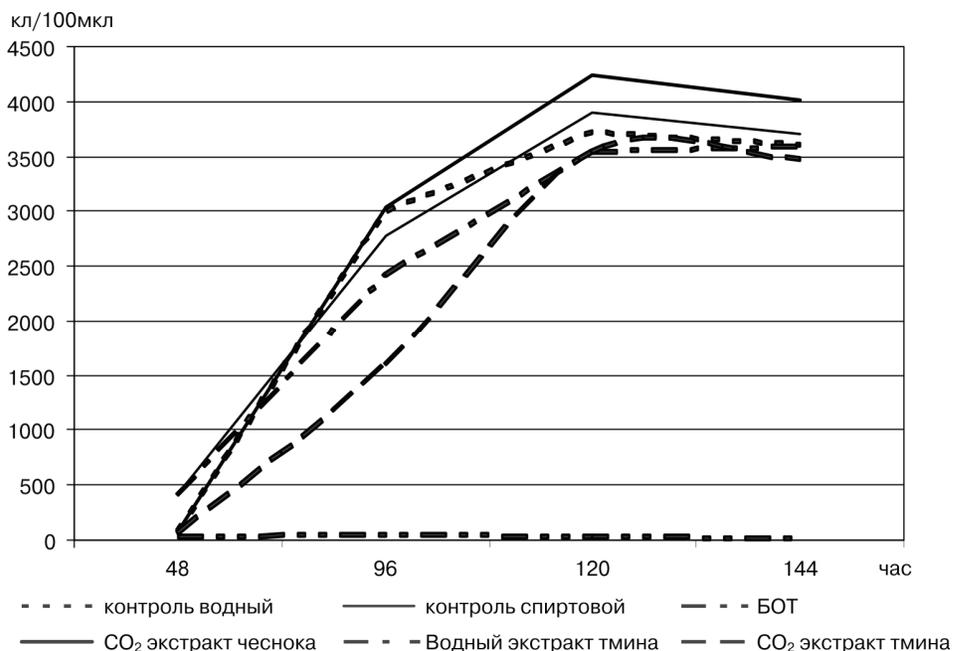


Рис. 6. График жизнеспособности инфузории *Tetrahymena pyriformis* в течение 6 сут

Оценка биологической активности исследованных препаратов на инфузориях *Tetrahymena pyriformis* также показал высокую токсичность БОТ.

Следует отметить положительное действие CO₂-экстракта чеснока, заключающееся в увеличении количества клеток культуры в стабильной фазе.

По представленным результатам CO_2 -экстракты чеснока и тмина обладают высокой антиоксидантной активностью и безвредны для эукариотических клеток.

Таким образом, в работе выявлено негативное действие на живые клетки синтетического антиоксиданта БОТ. Натуральные пищевые добавки — экстракты чеснока и тмина — не вызывают уменьшение метаболической активности простейших, интегральной оценкой которой является динамика роста культуры в пробе исследуемого объекта.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] *Богдан А.С.* Комплексная биологическая оценка объектов природного и искусственного происхождения на *Tetrahymena pyriformis*: Метод. рекомендации // МЗ РБ. — Мн., 1998.
- [2] *Виноходов Д.О., Виноходов В.О.* *Colpoda steinii* как тест-организм // Инфузории в биотестировании: Тезисы докладов международной заочной научно-практической конференции. — СПб., 1998. — С. 85—87.
- [3] *Черемных Е.Г.* Прибор для биотестирования — БиоЛаТ // Экология и промышленность. — 2004. — № 3.
- [4] *Черемных Е.Г., Симбирева Е.И.* Инфузории пробуют пищу // Химия и жизнь. — 2009. — № 1. — С. 28—31.
- [5] *Williams S.B., Stewart V.* Functional similarities among two-component sensors and methyl-accepting chemotaxis proteins suggest a role for linker region amphipathic helices in transmembrane signal transduction // *Molecular Microbiology*. — 1999. — 33. — P. 1093—1102.

SCREENING OF FOODS ADDITIVES ON INFUSORIA

**E.G. Cheremnykh, A.V. Kuleshin,
O.N. Kuleshina**

MSU of Applied Biotechnology
Talalikhin str., 33, Moscow, Russia, 109316

In the paper shows possibility of using the bioassay of food additives on the ciliates. The experiment was performed on an automated instrument BioLaT.

Key words: bioassay, dietary supplements, ciliates, toxicological evaluation, automating the biological research.