

# Реакции инфузории *Stylonychia mytilus* на содержание бенз(а)пирена как фактор безопасности рыбных стерилизованных консервов

Д-р техн. наук **О. Я. МЕЗЕНОВА**, **П. П. ПОТАПОВ**,  
Калининградский государственный технический университет  
236011, Калининград, Советский пр., 1  
Канд. техн. наук **Т. Н. РУЛЕВА**  
Атлантический научно-исследовательский институт  
рыбного хозяйства и океанографии  
236000, Калининград, ул. Дмитрия Донского, 3

---

**The analysis of physiology of a feed and specificity of biological development of infusorians *Stylonychia mytilus* is lead. Features of revealing of a level of safety of the sterilized fish canned food potentially containing in quantity benz(a)pyren, exceeding a normative level, by a method of biotesting on infusorians *Stylonychia mytilus* are proved in view of influence of accompanying substances. Conclusions about impossibility of the control of a level benz(a)pyren in the limits established by normative documents, with use *Stylonychia mytilus* are made at a daily exposition.**

**Key words:** benz(a)pyren, control, biotesting, infusorians, *Stylonychia mytilus*.

**Ключевые слова:** бенз(а)пирен, контроль, биотестирование, инфузории, *Stylonychia mytilus*.

---

## Введение

Экспресс-контроль безопасности пищевых продуктов, многие из которых являются скоропортящимися, приобретает все более важное значение при оценке их качества. При анализе биологической безопасности кормов и сырья для их производства нормативно используются инфузории *Stylonychia mytilus*, что позволяет в относительно короткие сроки давать заключение о качестве продукции. В работе проведены исследования по оценке возможности использования данных инфузорий для анализа безопасности рыбных стерилизованных консервов, потенциально содержащих химические токсиканты, поступающие по технологической цепочке из сырья, пищевых ингредиентов, тары. Целью работы являлось изучение ответных реакций стилонихий по отношению к бенз(а)пирену, содержащемуся в некоторых видах рыбных консервов из копченой рыбы. Для достижения данной цели проанализировали особенности физиологии пищеварения инфузорий стилонихий, установили чувствительность тест-организмов к бенз(а)пирену, обосно-

вали параметры пробоподготовки с учетом влияния шумовых (сопутствующих) факторов технологии рыбных консервов.

## Материалы и методы

С учетом свойства бенз(а)пирена растворяться в органических растворителях при приготовлении модельной пробы к тестированию использовали водный раствор ацетонового экстракта.

При проведении исследований в качестве тест-реакции была выбрана реакция ингибирования размножения при суточной экспозиции инфузорий. Этот выбор основан на следующих трех факторах. Тест-система представляет собой совокупность клеток, физиологическое состояние которых в каждый момент времени в общем случае не одинаково, их ответная реакция происходит не одновременно, а с некоторым временным разбросом. Второй фактор обусловлен длительностью процесса пищеварения (12–18 ч), основан на предположении о том, что для переваривания эмульсии (водный раствор смеси

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

бенз(а)пирен—ацетон) требуется относительно длительный период времени. Третий фактор связан со свойством бенз(а)пирена, называемым биоаккумуляцией, т. е. проявлением своего воздействия лишь спустя длительное время.

Методическая основа проведения суточного эксперимента и методика приготовления водного раствора ацетонового экстракта в модифицированном виде были заимствованы из нормативной документации [1, 2]. Источником бенз(а)пирена был выбран государственный стандартный образец «Бенз(а)пирен в гексане» (ГСО 7515–98) с концентрацией 100 мг/кг. Гексан выпаривался при его температуре кипения (69 °С), сухой остаток растворялся в ацетоне в том же объеме (2 мл). В качестве модельной навески применялись сухие пекарские дрожжи (2,5 г), разведенные в 7,5 г 2,7 %-м раствором уксусной кислоты. Концентрация кислоты была выбрана исходя из ее минимально нормируемого присутствия в консервах, потенциально содержащих в себе бенз(а)пирен. Из основного раствора бенз(а)пирена готовилась серия разведений (25; 10 мг/кг). Таким же образом тестировался основной раствор (100 мг/кг). После растворения дрожжей модельная 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 мин, 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 отбиралось по 20 мкл среды с клетками в количестве 2–5 штук. Учет производился при помощи микроскопа марки МБС-10 производства «ЛЗОС» (Россия). 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 контроле (в процентах).

Прирост численности клеток 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 в процентах рассчитывали по формуле

где  $\Delta N_{\text{оп}}$  — прирост численности инфузорий в опыте в конце анализа, шт.;

$\Delta N_{\text{к}}$  — прирост численности инфузорий в контроле в конце анализа, шт.

Проведены исследования по определению порога выживаемости стилонихий по отношению к поваренной соли на серии растворов различной концентрации. При этом из суточной культуры отбирали по 20 мкл среды с инфузориями и помещали их в ячейки блока луночных аквариумов в количестве 5–15 штук. В лунки вносился исследуемый раствор в количестве 200 мкл. Продолжительность исследования составила 3 ч. Установлено, что при тестировании 3 %-го раствора NaCl выживаемость инфузорий составила 100 %, а при тестировании 4 %-го раствора и далее выживаемость начала снижаться.

При выявлении уровня влияния на выживаемость инфузорий шумовых (технологических) факторов изучали реакции тест-организмов в зависимости от содержания уксусной кислоты. Для этого была подготовлена серия растворов с различной концентрацией уксусной кислоты. При проведении исследований из суточной культуры отбирали по 20 мкл среды с инфузориями и помещали их в ячейки блока луночных аквариумов в количестве 5–15 штук. Для анализа использовали исследуемый раствор в количестве 200 мкл.

По описанному выше методу проводились исследования по установлению влияния на выживаемость инфузорий водного раствора ацетона различной концентрации.

## Результаты и их обсуждение

При изучении биологических особенностей выбранных тест-объектов было установлено, что инфузории *Stylonychia mytilus* питаются преимущественно бактериями и прочими микроорганизмами, клетки которых они в состоянии заглотить. Крупные виды могут заглатывать клетки микроводорослей и различных простейших, в том числе и более мелких инфузорий. 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. После отшнуровки в пищеварительной вакуоли начинается процесс биодеструкции,  $pH$  в ней резко снижается, и внутрь поступают пищеварительные ферменты. Через некоторое время  $pH$  среды в вакуоли повышается, и пищеварение продолжается в слабощелочной среде. Двигаясь в эндоплазме по четко определенному пути, пище-

варительная 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 цитопига, после некоторой трансформации поступают к цитостому и переносят мембранный материал [3].

Таким образом, пищеварение инфузории по своему механизму можно характеризовать как приближенное к млекопитающим и использовать в качестве модельного по отношению к человеку.

Наряду с общими с другими инфузориями-сидераторами чертами пищеварительного процесса, *Stylonychia mytilus* имеет ряд отличительных особенностей. Внутри клетки существуют взаимосвязанные пищеварительные структуры, позволяющие ей переварить большой объем пищи. При этом скорость поглощения пищи и вместительная способность у стилонихий весьма высоки (до 70–80 % объема клетки). Поглощенные пищевые частицы распределяются в три условно выделенные области — зоны *A*, *B* и *C*. При попадании пищи внутрь клетки зона *A* всегда остается пустой, а пища при этом скапливается в зоне *B*. Зона *C* заполняется лишь после того, как заполнена зона *B*.

Ультраструктурные исследования *Stylonychia 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 *A*, в то время как максимальная концентрация их наблюдается в зоне *B*. В процессе пищеварения пищевая частица всегда следует по пути из каналов и всегда окружена трубчатыми телами. Внутри каналов она лишена мембраны, образующей пищеварительную вакуоль. При этом захваченные инфузорией клетки, изначально имеющие мембрану, теряют ее при входе в систему каналов [4].

Исследования ученых Харбинского университета показали наличие кислой фосфатазы в трубчатых телах пищеварительных каналов, что говорит о ее роли в процессе пищеварения. Установлено, что выделение кислой фосфатазы в клетках *Stylonychia mytilus* из молодой (примерно 100 делений) и стареющей (примерно 2000 бесполок делений) культуры различается по времени выделения фермента после поглощения пищевой частицы клеткой.

Пик действия фермента наступает на 1,5 ч раньше в клетках из молодой культуры. Весь пищеварительный процесс в клетках из молодой культуры занимает около 12 ч по сравнению с 18 ч в клетках из стареющей культуры. Исследователи также делают предположение, что в стареющих клетках *Stylonychia mytilus* активность кислой фосфатазы понижена [5].

Из особенностей биологического развития данных организмов следует отметить, что большинство инфузорий, в том числе и стилонихии, размножаются агамно, т. е. делением надвое. Агамное размножение одной клетки приводит к образованию клона, в пределах которого относящиеся к нему особи имеют идентичный генотип, если не принимать во внимание относительно редкие мутации. Таким образом, можно считать, что популяция инфузорий, полученная из одной клетки в результате агамного размножения, «изогенна». Время от времени у большинства видов инфузорий можно наблюдать половой процесс — конъюгацию. Две клетки сближаются, локально сливаются друг с другом и обмениваются генетическим материалом. Следует отметить, что не все инфузории, относящиеся к одному виду, способны конъюгировать между собой. Для этого они должны принадлежать к комплементарным типам спаривания, число которых может достигать нескольких десятков.

При длительном наблюдении отдельных агамно размножающихся клонов инфузорий было замечено, что в них происходят некоторые возрастные изменения. Клон инфузории, подобно высшим организмам, проходит ряд стадий: молодость, зрелость, старение и смерть. Начало новому циклу дает конъюгация, приводящая к омоложению макронуклеуса. Первые агамные поколения, произошедшие от эксконъюгантов, не способны к половому процессу [3].

Физиологическое состояние также определяется фазой роста культуры и стадией жизненного цикла каждой отдельной клетки. При этом 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 специально культивировать инфузорий в периодическом режиме до определенной фазы роста [3].

Также важной характеристикой инфузорий как тест-объектов является стадия жизненного цикла. Установлено, что наибольшую чувствительность к токсичным веществам имеют только что разделившиеся клетки, в процессе дальнейшего развития клетки ее резистентность к токсичным веществам возрастает до следующего деления [3].

При использовании в качестве тест-объектов свободнo-живущих инфузорий-сидиментаторов токсичные вещества попадают в клетку как через поверхность клетки, так и в результате фагоцитоза. Таким образом, осуществляется комбинация обоих способов нанесения возмущающего воздействия на тест-систему. Это является большим преимуществом инфузорий как тест-объектов. Во-первых, за счет фагоцитоза существенно увеличивается скорость проникновения токсичных веществ в клетку, и без того довольно большая за счет большой удельной поверхности клетки. Во-вторых, некоторые вещества, сами по себе малотоксичные, в желудочно-кишечном тракте животного могут претерпевать химические изменения, в результате чего их токсичность возрастает многократно. В методиках, в которых используется наружный способ воздействия на тест-систему, такие вещества могут оказаться невыявленными. В то же время, как в опытах на инфузориях, которые имеют пищеварительную систему, в некотором отношении подобную высшим организмам, эти вещества проявят свое действие. При этом нерастворимые в воде токсичные вещества, образующие в ней эмульсии, могут заглатываться инфузориями подобно пищевым частицам [3].

Сказанное выше обуславливает рациональность применения выбранных тест-организмов для анализа потенциальных факторов безопасности в технологии стерилизованных рыбных консервов.

Результаты экспериментов по определению зависимости выживаемости стилонихий (критерия токсичности) от концентрации бенз(а)пирена в модельных образцах на основе сухих пекарских дрожжей, выбранных в качестве модельного продукта, показаны на рис. 1.

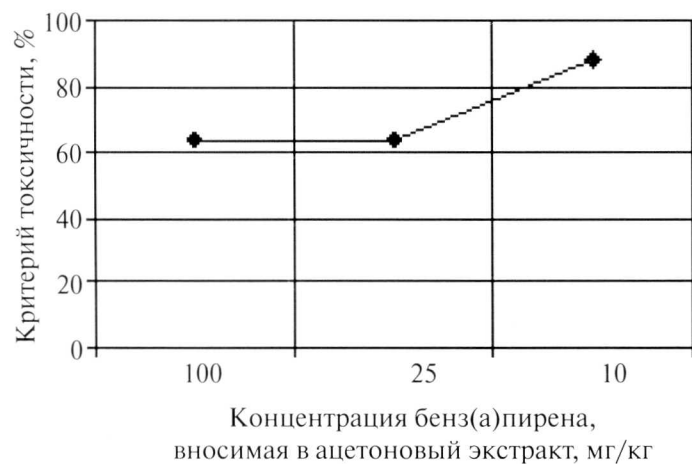


Рис. 1. Зависимость выживаемости стилонихий от концентрации бенз(а)пирена в образцах на основе сухих пекарских дрожжей

Видно, что при добавлении бенз(а)пирена с пошаговым увеличением концентрации критерий токсичности начинает падать, а прирост клеток, соответственно, увеличи-

вается. При этом необходимо учитывать, что минимальная концентрация (10 мг/кг) превышает в 2000 раз допустимую норму, установленную действующим САНПиН на пищевую продукцию. Это позволяет предположить, что задолго до достижения концентрации бенз(а)пирена, соответствующей 0,005 мг/кг (норма безопасности), прирост клеток в опыте и контроле окажется схожим. Из этого можно сделать вывод, что использование *Stylonychia mytilus* в качестве тест-организма при контроле ПДК бенз(а)пирена в рыбных консервах не является рациональным.

Эксперименты по выявлению влияния концентрации поваренной соли, применяемой в консервах в качестве вкусового ингредиента, на реакцию клеток проводились при трехчасовой экспозиции. Исследования показали, что при тестировании 3 %-го раствора NaCl выживаемость инфузорий составила 100 %, а при тестировании 4 %-го раствора и далее выживаемость начала резко снижаться (рис. 2).

При этом под выживаемостью понимается количество инфузорий в конце экспозиции по отношению к изначальному, выраженное в процентах.

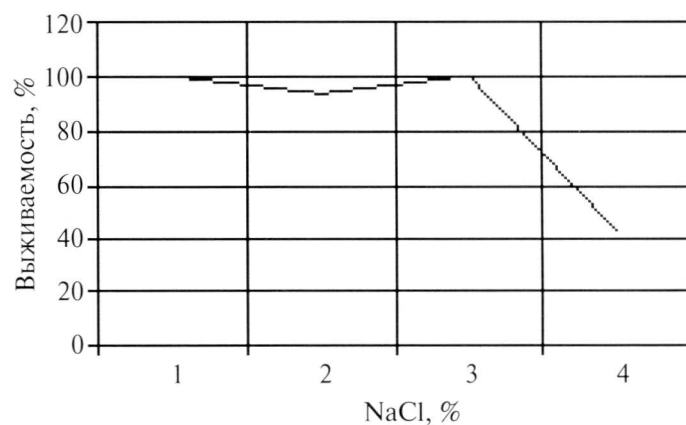


Рис. 2. Влияние концентрации поваренной соли на реакцию стилонихий

Из полученных данных следует, что содержание поваренной соли, которое нормируется в консервах типа «Шпроты в масле» на уровне 1,0–2,0 %, в приготовленных экстрактах влияет на выживаемость инфузорий незначительно. При этом следует принять во внимание, что в процессе приготовления экстракта происходит снижение в нем содержания поваренной соли в результате разбавления.

При тестировании растворов уксусной кислоты различной концентрации в целях установления ее влияния на выживаемость тест-организмов было показано, что ответная реакция клеток наблюдалась уже в течение 0,5 ч после постановки опыта. Установлено, что уксусная кислота даже в малых количествах резко угнетает жизнедеятельность инфузорий (рис. 3).



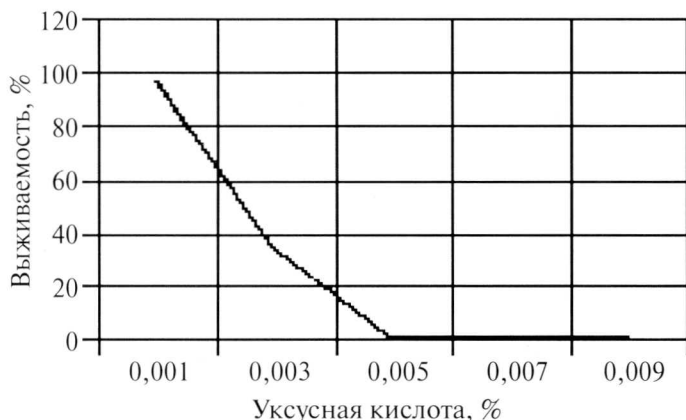


Рис. 3. Влияние концентрации раствора уксусной кислоты на реакцию стилонихий

При подсчете выживаемости (по количеству оставшихся в живых клеток через один 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 %, несмотря на тот факт, что в тестируемом растворе содержание уксусной кислоты оставалось летальным и составляло 0,0062 %. Таким образом, можно предположить, что отрицательное воздействие кислоты на выживаемость стилонихий, установленное в чистом эксперименте, нивелируется в рыбных консервах. Это можно объяснить буферным воздействием полифункциональных белков, входящих в состав рыбных пищевых систем.

В эксперименте по определению порога выживаемости инфузорий по отношению к ацетону нами было установлено, что при концентрации ацетона 3,3 % (соотношение ацетона с раствором Лозина-Лозинского 1:30) при трехчасовой экспозиции выживаемость стилонихий составила 100 %. При повышении концентрации ацетона до 5 % (соотношение 1,5:30) выживаемость падала до 0 %. С учетом того что максимально нормируемое соотношение ацетонового экстракта с раствором Лозина-Лозинского составляет 1:80 (при концентрации ацетона в растворе 1,25 %) [5], оценку тест-реакции стилонихий на бенз(а)пирен осуществляли при обоснованном соотношении ацетонового экстракта с раствором Лозина-Лозинского 1:30.

### Заключение

1. Инфузории *Stylonychia mytilus* имеют уникальную систему пищеварения, функционирование которой, как и в случае использования других инфузорий, схоже

с функционированием пищеварительной системы человека, что позволяет их использовать в качестве тест-организмов для контроля безопасности пищевых продуктов, включая рыбные консервы.

2. Результаты исследования по определению порога выживаемости стилонихий относительно уксусной кислоты показали негативное воздействие на организмы тест-систем даже малых доз при модельном внесении в систему. Данный факт, проверенный в реальных условиях пищевой среды рыбных консервов, не подтвердил такой закономерности, что свидетельствует о возможности использования стилонихий в качестве тест-систем на токсичность по другим факторам в консервах, имеющих кислую среду.

3. Выживаемость стилонихий по отношению к поваренной соли и ацетону начинает снижаться при повышении концентраций данных веществ, соответственно, более 4 и 3,3 %, что позволяет использовать стилонихий для контроля безопасности продуктов по другим нормируемым токсикантам с учетом данного уровня шумовых факторов.

4. Реакции на выживаемость стилонихий в зависимости от содержания бенз(а)пирена в рыбных консервах, полученные методом суточного биотестирования, свидетельствуют о том, что даже при концентрировании ацетонового экстракта и последующем уменьшении его разведения в целях повышения токсичного воздействия на клетки достоверных зависимостей в их поведении нет. Это объясняется как биологическими особенностями размножения стилонихий, так и биоаккумуляцией бенз(а)пирена, проявляющейся в специфике его воздействия на живые организмы. Таким образом, нерационально использовать *Stylonychia mytilus* для объективного тест-контроля на безопасность рыбных консервов по содержанию бенз(а)пирена.

### Список литературы

- ГОСТ 29136–91. Мука кормовая из рыбы, морских млекопитающих, ракообразных и беспозвоночных. Метод определения общей токсичности. Введ. 01.01.93. — М.: Изд-во стандартов, 1992.
- ГОСТ Р 52337–2005. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения общей токсичности. Введ. 30.05.2005. — М.: Изд-во стандартов, 2005.
- Виноходов Д. О. Научные основы биотестирования с использованием инфузорий: Дис. ... д-ра биологических наук.: СПб., 2007.
- Kaul N., Sapa G. R., Dass C. M. S. Intracellular digestive channel system in the ciliate *Stylonychia mytilus* Ehrenberg // Arch. Protistenk. 1982. N 126.
- Chen Ying, Guang Ping, Qiu Zi-Jian. Intracellular digestive process of food in a fresh water ciliate *Stylonychia mytilus* (Protozoa, Ciliophora, Hypotrichida) // Acta Zoologica Sinica. 2008. N 54 (3).